

UACM

Universidad Autónoma
de la Ciudad de México

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE LA CIUDAD DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS GENÓMICAS

**IDENTIFICACIÓN DE LAS POLI(A) RIBONUCLEASAS
DE *Entamoeba histolytica* Y ESTUDIO FUNCIONAL
DE LA POLI(A) RIBONUCLEASA EhCAF1**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRA EN CIENCIAS GENÓMICAS

P R E S E N T A
Q.F.B. ITZEL LÓPEZ ROSAS

COMITÉ TUTORIAL

DIRECTOR

Dr. Mario César López Camarillo
Profesor Titular. Posgrado en Ciencias Genómicas.
Universidad Autónoma de la Ciudad de México.

CO- DIRECTORA

Dra. Laurence A. Marchat
Profesora Titular. Programa Institucional en Biomedicina Molecular.
Escuela Nacional de Medicina y Homeopatía del IPN.

ASESORES

Dra. Esther Orozco
Profesora Titular. Departamento de Patología Experimental.
CINVESTAV-IPN.

Dra. Elisa Irene Azuara Liceaga.
Profesora Titular. Posgrado en Ciencias Genómicas.
Universidad Autónoma de la Ciudad de México.

M. en C. Mavil López Casamichana
Posgrado en Ciencias Genómicas.
Universidad Autónoma de la Ciudad de México.

SISTEMA BIBLIOTECARIO DE INFORMACIÓN Y DOCUMENTACIÓN



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE LA CIUDAD DE MÉXICO COORDINACIÓN ACADÉMICA

RESTRICCIONES DE USO PARA LAS TESIS DIGITALES

DERECHOS RESERVADOS[©]

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

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

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

El presente trabajo se realizó en el laboratorio 2 del Posgrado en Ciencias Genómicas de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México, con el apoyo del laboratorio de la Dra. Esther Orozco del Departamento de Patología Experimental del CINVESTAV-IPN. Esta tesis forma parte del proyecto “Análisis de los mecanismos de degradación del RNAm en *Entamoeba histolytica*” el cual ha sido apoyado por la Universidad Autónoma de la Ciudad de México (UACM, México), el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT, México), y la Dirección de Estudios de Posgrado e Investigación del IPN (DEPI, México).

AGRADECIMIENTOS

A mi Madre y hermanos por que ellos son y siempre serán mi apoyo y mi motivación más preciada. Gracias por toda la paciencia y confianza para mí. Los quiero mucho.

Gracias César por tus enseñanzas, tu paciencia, tu confianza y por brindarme tu amistad.

A la Dra. Laurence por el apoyo y las observaciones realizadas para la realización de este proyecto

A mis amigas que siempre estuvieron presentes y me ayudaron mucho a lo largo de la maestría. Gracias Jacque y Are.

A Olga y Mavil por la valiosa amistad, observaciones, ayuda y por todos y cada uno de los momentos compartidos en el laboratorio.

A mis compañeros del laboratorio 2 con los que pase buenos momentos
Helios, Eric, Fer, Roberto

A mis amigos Jonnatan, Sergio por los comentarios, la paciencia y observaciones hechas a mi trabajo.

A mis compañeros de generación por su amistad y por los momentos compartidos en el aula.

Muchas gracias a la Dra. Esther Orozco por todas las facilidades y apoyo brindados para la realización de una parte de este proyecto en el laboratorio 2 de Patología Experimental del CINVESTAV.

A los chicos del laboratorio de Patología Experimental del CINVESTAV,
Lalo, Israel, Máximo.

A todos los profesores del Posgrado en Ciencias Genómicas por que cada uno me dio algo especial.

INDICE GENERAL

LISTA DE ABREVIATURAS	i
LISTA DE FIGURAS	iv
LISTA DE TABLAS	vi
RESUMEN	vii
I. INTRODUCCIÓN	1
1. ANTECEDENTES GENERALES DEL TEMA	1
1.1. Epidemiología de la amibiasis	2
1.2. Morfología de <i>E. histolytica</i>	3
1.3. Ciclo de vida de <i>E. histolytica</i>	5
1.4. Filogenia del genero <i>Entamoeba</i>	10
1.5. Regulación de la expresión génica en eucariontes	14
1.6. Degradación de RNAm en eucariontes	15
1.6.1 Proteínas que participan en la de degradación del RNAm	17
1.7. Poli (A) ribonucleasas de eucariontes	19
1.8. El complejo CCR4-POP2-NOT	23
1.9. Estructura y función de la poli (A) ribonucleasa POP2/CAF1	25
1.10. Poli (A) ribonucleasas POP2/CAF1 y ciclo celular	27
1.11. Poli (A) ribonucleasas POP2/CAF1 y CCR4 en respuesta al daño del DNA	28
1.12. Estructura y función de la ribonucleasa CCR4	29
2. ESTADO DEL ARTE	29
2.1. Mecanismos de degradación del RNAm en parásitos protozoarios	29

2.2 Mecanismos de degradación del RNAm en <i>E. histolytica</i>	30
3. ANTECEDENTES PARTICULARES DEL PROYECTO	31
4. IMPORTANCIA DE CONTINUAR EL ESTUDIO DEL TEMA	32
II. OBJETIVOS	33
1. OBJETIVO GENERAL	33
2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	33
III. MATERIALES Y MÉTODOS	34
1. Identificación de las poli(A) ribonucleasas de <i>E. histolytica</i>	34
2. Cultivos de trofozoítos	35
2.1 Choque térmico de los trofozoítos a 42° C	36
2.2 Irradiación de los trofozoítos con luz ultravioleta (UV-C)	36
3. Obtención del DNA total de la clona A de <i>E. histolytica</i>	36
4. Diseño, síntesis y cuantificación de los oligonucleótidos	37
5. Amplificación de los genes <i>Ehcaf1</i> , <i>Ehcaf1-like</i> y <i>Ehccr4</i> a partir de DNA genómico de trofozoítos de <i>E. histolytica</i>	38
6. Análisis del RNA	38
6.1. Extracción y cuantificación del RNA total de alta calidad	38
6.2. Síntesis de la cadena complementaria de DNA (cDNA)	39
6.3. Tratamiento del RNA total con DNasa I	40
6.4. Retrotranscripción	40
6.5. Amplificación de los genes <i>Ehcaf1</i> , <i>Ehcaf1-like</i> , <i>Ehccr4</i> y <i>actina</i> por PCR	41
6.6. Análisis del DNA por electroforesis en geles de poliacrilamida al 12%	42
7. Subclonación del gen <i>Ehcaf1</i> en el vector pGEX-6P-1	42

7.1. Amplificación por PCR del gen <i>Ehcaf1</i>	42
7.2. Purificación de los fragmentos de DNA	43
7.3. Digestión del vector pGEX-6P-1 y el inserto <i>Ehcaf1</i>	44
7.4. Ligación del gen <i>Ehcaf1</i> en el vector pGEX-6P-1	44
7.5. Preparación de las células competentes de <i>E. coli</i> DH5 α	44
7.6. Transformación de las células competentes mediante choque térmico	45
7.7. Obtención de DNA a pequeña escala (miniprep)	45
7.8. Digestión del plásmido pGEX-6P- <i>Ehcaf1</i>	47
7.9. Secuenciación automática del gen <i>Ehcaf1</i>	47
8. Expresión y purificación de la proteína recombinante rEhCAF1-GST	48
8.1. Preparación de células competentes <i>E. coli</i> BL21 (DE3) pLysS frescas	48
8.2. Trasformación de células competentes <i>E. coli</i> BL21 (DE3) pLysS mediante choque térmico	48
8.3. Expresión de la proteína recombinante rEhCAF1-GST	49
8.4. Cuantificación de proteínas por el método de Bradford	49
8.5. Electroforesis en geles de poliacrilamida no nativos	50
8.6. Tinción de los geles de poliacrilamida con azul de Comassie	51
8.7. Transferencia de proteínas a membranas de nitrocelulosa	52
8.8. Ensayos de Western blot	52
8.9. Análisis de solubilidad de la proteína recombinante rEhCAF1-GST	53
8.10. Solubilización de la proteína recombinante rEhCAF1-GST	54
8.11. Purificación de la proteína recombinante rEhCAF1-GST	54

9. Análisis de la interacción de la proteína recombinante	
rEhCAF1-GST con RNA	55
9.1. Amplificación del templado de DNA de 284 pb por PCR	55
9.2. Transcripción <i>in vitro</i> de la sonda de RNA de 284pb	56
9.3. Ensayo de retardamiento de la movilidad electroforética (EMSA)	57
IV. RESULTADOS	58
1. Identificación y análisis <i>in silico</i> de las posibles poli(A)	
ribonucleasas de <i>E. histolytica</i>	58
2. Análisis de la expresión de RNAm de los genes que codifican las	
poli(A) ribonucleasas de <i>E. histolytica</i> en respuesta al daño	
del DNA	70
3. Clonación del gen <i>Ehcaf1</i> en el vector pGEX-6P-1	75
4. Expresión y purificación de la proteína recombinante	
rEhCAF1-GST	79
5. Análisis de la interacción de la proteína recombinante	
rEhCAF1-GST con RNA	89
V. DISCUSIÓN	92
VI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	94
VII. CONCLUSIONES	100

I. INTRODUCCION.

1. Antecedentes generales del tema.

La amibiasis es la infección parasitaria causada por el protozoario entérico *Entamoeba histolytica*. La amiba es el nombre común del parásito, el cual presenta dos fases morfológicamente distinguibles durante su ciclo de vida: i) el quiste, infectivo, inmóvil y resistente a cambios medioambientales y ii) el trofozoíto, móvil, sensible a los cambios ambientales y capaz de invadir tejidos y fagocitar células del hospedero. Este microorganismo vive usualmente como comensal en el lumen del intestino grueso del hombre, provocando una amibiasis luminal benigna. Sin embargo, bajo ciertas condiciones del huésped que incluyen la desnutrición, la presencia de un estado inmunológico débil y otras causas no bien entendidas aun, el parásito es capaz de invadir la mucosa intestinal y provocar la disentería amibiana. De manera interesante, estos eventos correlacionan con cambios en la expresión de genes de virulencia de los trofozoítos invasivos. Una vez invadido el epitelio intestinal, el parásito puede diseminarse a través de la sangre y tejidos, originando la amibiasis invasiva en donde los trofozoítos son capaces de causar lesiones extraintestinales, principalmente en el hígado y con menos frecuencia en el pulmón, cerebro, piel, órganos genitales, bazo y riñón (Martínez-Palomo, 1989).

Esta infección prevalece principalmente en los países en vías de desarrollo, donde las condiciones socioeconómicas y de sanidad e higiene son deficientes. Aunado a la desnutrición de la población se propicia un estado inmunológico deficiente en los individuos, los cuales constituyen factores de predisposición y riesgo muy importantes frente a las infecciones, en especial a aquellas producidas por protozoarios parásitos que habitan en el tracto

gastrointestinal como lo es *E. histolytica* (Cook, 1980; Martínez-Palomo, 1987; Ravdin y col., 1988).

1.1 Epidemiología de la amibiasis.

La infecciones producidas por *E. histolytica* presentan una alta incidencia, convirtiendo a la amibiasis humana en uno de los problemas más serios de salud a escala mundial. La infección ocurre por la ingestión de alimentos contaminados con quistes y se considera que los seres humanos son la única fuente directa o indirecta de transmisión del parásito ya sea por medio de las manos, los alimentos y las bebidas contaminadas con heces humanas. La mayor parte de los individuos infectados son portadores asintomáticos. Su alta prevalencia es el resultado de condiciones socioeconómicas precarias, así como estándares de higiene y sanidad deficientes, lo cual es muy frecuente en las comunidades de los países en vías de desarrollo. Aproximadamente, el 10% de la población mundial es portadora del parásito aunque solo un bajo porcentaje sufre la enfermedad (WHO, 1997). En algunos países, la amibiasis se coloca entre las diez primeras causas de muerte, siendo la tercera enfermedad parasitaria de mayor importancia en el ámbito mundial, precedida únicamente por la malaria y la esquistosomiasis (Walsh, 1988). Los estudios serológicos usados para estimar la proporción de la población que ha tenido contacto con el parásito o bien que sufre de amibiasis actualmente, sugieren que uno de cada diez individuos infectados presenta invasión de la mucosa intestinal o hepática (Walsh, 1982).

En México, la amibiasis es una enfermedad endémica considerada como un serio problema de salud pública ya que se ha estimado que existe una

proporción de un paciente con amibiasis invasiva por cada 4 o 5 portadores asintomáticos (Sepúlveda, 1982). Se estima que de la población mexicana total, el 20% son portadores, el 2% se encuentran enfermos y entre 0.1-0.2% de los enfermos muere (Conde-Bonfil y De la Mora, 1992). En México, Caballero-Salcedo y col, (1994) realizaron un estudio de hemaglutinación indirecta con anticuerpos específicos dirigidos contra *E. histolytica* y encontraron que el 8.4% de la población examinada fue seropositiva, siendo la zona norte donde se presentó menor incidencia de amibiasis. Los resultados señalan una fuerte relación entre la frecuencia de amibiasis y factores económico-sociales tales como el hacinamiento, la carencia de servicios públicos, los malos hábitos higiénicos y el analfabetismo. El Boletín Epidemiológico publicado por la Secretaría de Salud (<http://www.ssa.gob.mx>), reportó los casos acumulados de amibiasis intestinal y abscesos hepáticos amibianos por entidad federativa para el periodo 1999-2000 (Fig. 1).

1.2. Morfología de *E. histolytica*.

La membrana plasmática de los trofozoítos de *E. histolytica* semeja a las membranas celulares de eucariontes superiores (Martínez-Palomo, 1986). En esta estructura celular se organizan diversas moléculas de superficie que modulan diversos eventos importantes para el establecimiento del parásito en su huésped tales como: i) la formación del casquete (Vargas *et al*, 1996); ii) la adhesión a la célula blanco (Petri *et al.*, 1987; Rosales-Encina *et al.*, 1987; Arroyo-Orozco., 1987); iii) la fagocitosis (Rodríguez y Orozco., 1986); iv) el daño a la membrana de la célula blanco por medio de las proteínas formadoras

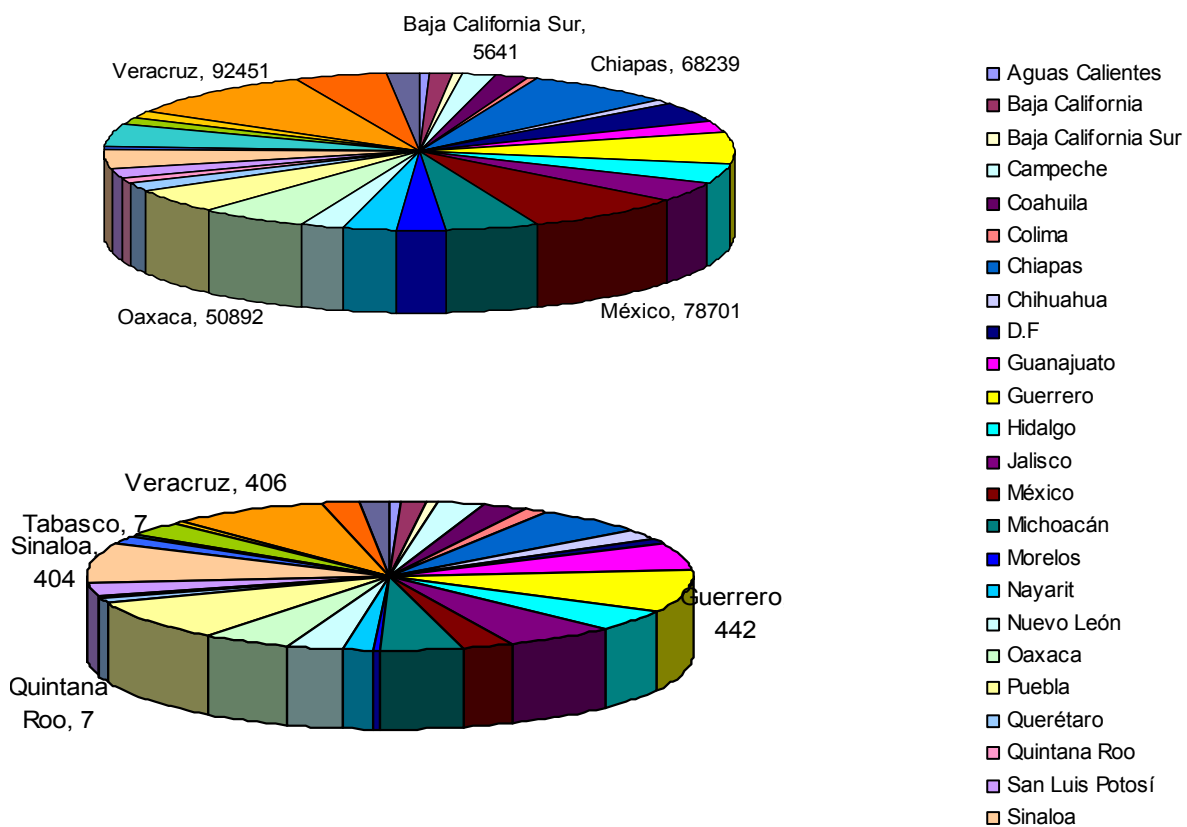


Figura 1. Numero de casos reportados de amibiasis por entidad federativa. Se muestran los casos acumulados para el periodo 1999-2000. Se resaltan las entidades federativas con mayor número de casos.

de poros o amebaporos (Lynch *et al.*, 1982) y, v) la secreción de proteasas (Keene *et al.*, 1990). En conjunto estos eventos le permiten a la amiba colonizar e invadir tejidos en su hospedero. Otra característica interesante en *E. histolytica* es que su material genético está confinado por una membrana nuclear muy semejante a la de otros eucariontes. El trofozoíto generalmente tiene un núcleo de 4 a 7 μm y aproximadamente el 20% de las células presentan dos o más núcleos, por lo que la presencia de multiploidia es una característica genética común en este parásito (Martínez-Palomo, 1993).

1.3. Ciclo de vida de *E. histolytica*.

Durante su ciclo de vida, el parásito presenta dos estadios morfológicos claramente distinguibles: el quiste y el trofozoíto. El quiste se presenta ligeramente ovalado con un diámetro de 8 a 20 μm , cuatro núcleos y una pared celular de aproximadamente 125 a 150 nm de espesor. Los quistes maduros, los cuales son muy resistentes al medio ambiente y a cambios ambientales drásticos, al ser ingeridos por el ser humano se desplazan por el estómago llegando hasta el íleon donde ocurre el desenquistamiento. Los mecanismos moleculares que controlan la reacción de desenquistamiento aun no han sido abordados debido a la falta de un sistema *in vitro* que reproduzca el fenómeno de manera eficaz. De cada quiste emergen ocho trofozoítos uninucleados los cuales posteriormente se dividen rápidamente por fisión binaria en el lumen del intestino estableciendo la infección (Martínez-Palomo, 1989). Reciente, se ha reportado el análisis global de la expresión de genes a escala genómica, donde se analizaron los quistes. De manera interesante se definió que genes tales

como diversas sintetisas de quitina se sobreexpresan en los quistes, modulando de manera importante la reacción de enquistamiento (MacFarland *et al*, 2007).

Una vez que los trofozoítos se han adherido a la mucosa intestinal, estos pueden alojarse como comensales alimentándose de bacterias o de *detritus* celulares provenientes del intestino. La fase activa del parásito es el trofozoíto, el cual, en contraste con el quiste, es extremadamente sensible al medio ambiente y muere rápidamente por desecación. El trofozoíto tiene un diámetro de 10 a 60 μm , posee una gran actividad motora y un pleomorfismo característico por la forma ameboide. El trofozoíto es esencialmente anaerobio, aunque puede crecer en presencia de oxígeno. Mediante mecanismos moleculares aún no caracterizados, los trofozoítos atraviesan la mucosa intestinal invadiendo los vasos sanguíneos de los tejidos más próximos, diseminándose hacia los diferentes órganos del cuerpo provocando abscesos, principalmente en el hígado (Fig. 2). Este proceso está determinado por la expresión de algunos genes de virulencia los cuales se expresan a bajos niveles en condiciones de no invasión o bien cuando los trofozoítos se crecen en condiciones de laboratorio. Los trofozoítos se pueden desprender de la mucosa intestinal y en la luz del intestino grueso e iniciar nuevamente el proceso de enquistamiento, durante el cual las células pierden movilidad, toman una forma esférica, se deshidratan y excretan parte de las reservas alimenticias presentes en las vacuolas digestivas, asumiendo la forma de prequiste.

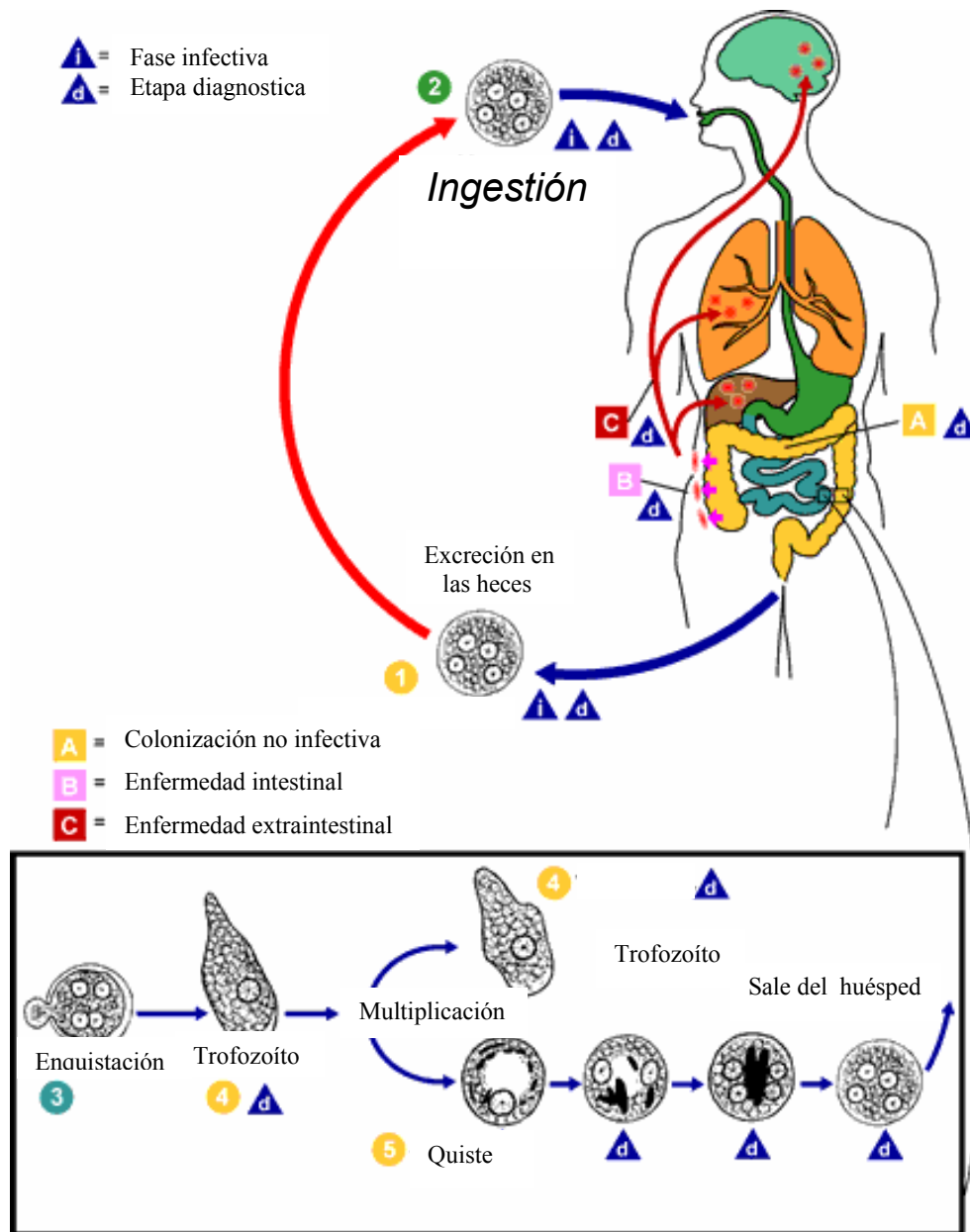
Posteriormente, secretan una pared quítica y forman pilas de ribosomas que forman los cuerpos cromidiales, transformándose en quistes uninucleados inmaduros (Despommier y Karapelou, 1987). El quiste

uninucleado presenta sucesivas divisiones nucleares y origina nuevamente al quiste maduro tetranucleado cerrando el ciclo de vida (Fig. 2). Finalmente, resulta importante resaltar que un alto porcentaje de los individuos infectados de esta forma, pueden permanecer como portadores asintomáticos.

Por otra parte, se sabe que los trofozoítos pueden duplicar su genoma varias veces incluso antes de que ocurra la citocinesis, generando de esta manera poblaciones de trofozoítos multiploides. El fenómeno podría ocurrir a través de una desacoplamiento del ciclo celular con la replicación del DNA (Das y Lohia, 2002). Esto podría explicar también las diferencias en el contenido de DNA observados previamente en algunas cepas de *E. histolytica* (López-Revilla y Gómez, 1978).

Figura 2. Ciclo de vida de *E. histolytica*. El ser humano se infecta al ingerir quistes (2). El desenquistamiento (3) ocurre en el intestino delgado y los trofozoítos liberados migran al intestino grueso. Los trofozoítos se multiplican por fisión binaria y producen quistes (4), los cuales pueden salir por las heces. Debido a la protección conferida por las paredes de quitina, los quistes pueden sobrevivir días o semanas en el medio externo y transmitir la infección, iniciando nuevamente el ciclo (1). En muchos casos los trofozoítos se mantienen en el lumen intestinal presentándose una infección asintomática (A). En algunos pacientes, los trofozoítos invaden la mucosa intestinal (B), produciendo desde síntomas leves hasta disentería grave, o bien, puede producirse una enfermedad extraintestinal,(C), con manifestaciones patológicas cuando por el torrente sanguíneo, los trofozoítos invaden otros órganos como hígado, cerebro o pulmones.

Tomado del URL (<http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/HTML/Amebiasis/>)



1.4 Filogenia del genero *Entamoeba*.

El estudio de la filogenia del genero *Entamoeba* ha sido controversial y a la vez interesante debido al lugar que ocupa en la escala evolutiva. En los primeros estudios filogenéticos realizados en *E. histolytica*, se compararon secuencias codificantes de la subunidad pequeña del RNA ribosomal, tal como se realiza de manera rutinaria en la mayoría de los organismos para comparar las distancias evolutivas, debido a que se considera que estas secuencias nucleotídicas se encuentran en todo el *phyllium* y han cambiando muy poco en la escala evolutiva. Los autores establecieron que *E. histolytica* pertenece a un linaje que divergió entre los primeros eucariontes, situándola dentro de los organismos sin mitocondria (Sogin, 1989; Kabnick y Peattie, 1991; Cavalier-Smith, 1991; Knoll, 1992; Hasegawa y col, 1993). Por lo que se ha sugerido que *E. histolytica* pertenece a un linaje que, junto con otros flagelados, divergió muy temprano dentro de la evolución de los eucariontes, solamente es precedida por *Microsporidia*, *Trichomonas* y *Giardia*. Clark G *et al*, (1997) utilizaron riboprints y construyeron un árbol filogenético con la finalidad de comparar distancias genéticas para el genero *Entamoeba*. Sus datos muestran que *E. histolytica* se encuentra mas relacionada con *E. dispar* y *E. moshkovskii* que con *E. coli* y *E. invadens* (Fig. 3).

Sin embargo, contrario a los datos de Sogin *et al*, (1989), obtenidos a partir de las parsimonias predichas utilizando las secuencias nucleotídicas de la subunidad pequeña del RNAr (Fig. 4), Hasewaga y col (1993) reportan que *E. histolytica* divergió de la línea principal hacia el tronco de los primeros eucariontes mitocondriados antes de que se separaran en varios reinos. Esto indica que la *E. histolytica* es una reliquia viviente de la fase temprana de la

evolución de los eucariontes, que ocurrió antes de que la simbiosis de la promitocondria emergiera. Ellos predicen un árbol filogenético, utilizando la secuencia de aminoácidos del factor EF-1 α , el cual se ha usado previamente como marcado filogenético para trazar los pasos iniciales de la evolución de la vida, debido a su ocurrencia universal en todos los organismos vivientes (en procariontes es denominado EF-Tu) y a la característica de que presenta una lenta tasa evolutiva. Por ejemplo, solo uno de sus 462 aminoácidos, difiere entre la secuencia proteica de humano y la de hámster chino, corroborando la baja proporción de sustituciones en esta proteína.

En otro estudio, Bakker-Grunwald y Wostman (1993), basados en la estructura, el metabolismo, así como en la organización del DNA y RNA, sugieren que *E. histolytica* al igual que *Giardia*, es probablemente uno de los eucariontes más primitivos que existen, por lo que se le considera un protoeucarionte. *E. histolytica* pertenece al reino *Protocista*, un grupo formado principalmente por linajes de microorganismos provenientes de los primeros eucariontes (Margulis y col., 1990).

En la clasificación taxonómica de *E. histolytica* (Tabla I), varios autores concuerdan en que pertenece a los llamados *Rhizopodos*, pues presentan pseudópodos por lo menos en uno de los estadios de su ciclo de vida (Corliss, 1987) y a los *Entamoebidae*, cuyos miembros son parásitos.

Figura 3. Filogenia del genero *Entamoeba* de acuerdo a la comparación de secuencias nucleotídicas del rRNA.

Reino	Protoctista
Phylum	Rhizopoda
Clase	Loposea
Subclase	Gymnamoebida
Orden	Amoebida
Suborden	Tubulina
Familia	Entamoebidae
Género	<i>Entamoeba</i>
Especie	<i>Histolytica</i>

Tabla I. Clasificación taxonómica de *E. histolytica*

1.5 Regulación de la expresión génica en eucariontes.

En eucariontes los procesos de transcripción y traducción se encuentran compartimentalizados y el destino y modificaciones que sufre el RNA después de ser sintetizado ha sido sujeto de extensa investigación en los últimos años. La complejidad que representan los eventos nucleares requeridos para generar un RNAm exportable y traducible, permite que el control del flujo de la información genética se regule en múltiples puntos de control.

La regulación de la expresión genética modula procesos vitales para la célula tales como el crecimiento, la división, la diferenciación, la replicación del material genético, etc. También regula la expresión de genes en respuesta a estímulos externos. En general, la expresión genética se regula a tres niveles: i) transcripcional, ii) postranscripcional y, iii) traduccional. En el primer nivel, la expresión es regulada por proteínas denominadas factores de transcripción que interaccionan con secuencias específicas presentes en la región 5' no traducida (5' UTR), río arriba del sitio de inicio de la traducción de los genes, también llamadas regiones promotoras. Estas interacciones determinan si un gen se va expresar en un RNA mensajero precursor (pre-RNAm) y en que cantidad y tiempo. Posteriormente que se sintetiza la molécula de pre-mRNA en el núcleo, esta sufre una serie de modificaciones que forman parte del nivel de regulación postranscripcional produciendo un RNA mensajero maduro (RNAm). En este nivel de modulación de la expresión genética, los mecanismos celulares operan directamente sobre la molécula de RNA. El correcto procesamiento del RNAm es importante para el desarrollo de los organismos, ya que de él depende la síntesis de las proteínas (nivel de regulación traduccional) necesarias para el buen funcionamiento de las células.

El pre-RNAm experimenta diversos eventos de procesamiento nucleares tales como la adición de la estructura de *cap* (7-metil-guanosina) mediante la reacción de *capping* en el extremo 5' UTR, la eliminación de secuencias no codificantes o intrones mediante *splicing*, y el procesamiento del extremo 3' UTR, que incluye las reacciones de corte y poliadenilación. Esta serie de reacciones de procesamiento del pre-RNAm da origen a RNAm maduros que son transportados de manera eficiente hacia el citoplasma para su traducción a proteínas (Fritz *et al*, 2004).

En particular, el procesamiento del extremo 3' UTR del pre-RNAm que incluye las reacciones de corte y poliadenilación, es un evento de suma importancia debido a que se ha reportado que alteraciones en este paso pueden modificar la viabilidad, el crecimiento y el desarrollo celular (Zhao *et al*, 1999). La adición y presencia de un tracto de adeninas (proceso conocido como poliadenilación) en el extremo 3' del RNAm regula la expresión génica debido a que favorece el transporte del RNAm del núcleo al citoplasma, provee de estabilidad al RNAm en el citoplasma y promueve de manera considerable la traducción (Colgan *et al*, 1997). Por otra parte, la eliminación del tracto de poli(A) es el primer paso para iniciar la degradación del RNAm.

1.6 Degradación de RNAm en eucariontes.

El RNA es usualmente considerado una molécula muy inestable y es químicamente más lábil que el DNA. De esta manera, es sorprendente que el estado estacionario o basal del RNAm en organismos eucariontes es relativamente estable. La principal razón parece ser debido a que la degradación es catalizada casi exclusivamente por proteínas conocidas como

exoribonucleasas que degradan al RNAm desde sus extremos, los cuales están protegidos generalmente por estructuras específicas y proteínas asociadas a las mismas. Un ejemplo de estas secuencias y estructuras las representa el *cap* en el extremo 5' UTR y la presencia de un tracto de adeninas en el extremo 3' UTR del RNAm, por lo que la remoción de estas estructuras es considerado el paso limitante para iniciar la degradación o decaimiento del RNAm (Meyer *et al*, 2004). El control de la degradación de RNAm es un componente importante en la regulación de la expresión de genes (Parker *et al*, 2004). Los niveles basales del RNAm están determinados por las tasas de síntesis y degradación del mismo, las cuales regulan la expresión final de los genes al proveer de RNA mensajeros a la maquinaria traduccional. Debido a esto, el estudio de la síntesis y degradación del RNAm ha tomado gran importancia en años recientes.

Dos rutas generales de degradación del RNAm han sido descritas en organismos eucariontes. Ambas vías comparten como primer evento, la remoción exonucleolítica del tracto de poli(A) o desadenilación. En una de las rutas, la desadenilación es seguida por la hidrólisis de la estructura *cap* y la posterior degradación del cuerpo del RNAm en dirección 5'-3' por una exonucleasa. En la segunda ruta, posterior a la desadenilación, el RNAm es degradado por un complejo de exonucleasas en dirección 3'-5' y finalmente la estructura de *cap* es hidrolizada (Meyer *et al*, 2004). En ambas rutas participan proteínas específicas las cuales han sido estudiadas en diversos organismos.

1.6.1 Proteínas que participan en la de degradación del RNAm.

A la fecha se han identificado en eubacterias y eucariontes diversas exoribonucleasas que participan en la degradación específica del RNAm (Zuo *et al*, 2001), las cuales se han clasificación en seis superfamilias en base a sus estructuras proteicas (Tabla 2). De este grupo numeroso de proteínas, requiere especial atención el subgrupo de las RNAsas D, debido a que incluye a las desadenilasas involucradas en el inicio de la degradación del RNAm. En *Saccharomyces cerevisiae*, el principal complejo de poli(A) ribonucleasas se encuentra formando parte del complejo transcripcional CCR4-POP2-NOT, el cual contiene dos ribonucleasas de trectos de poli(A) denominadas POP2 (conocida también como CAF1) y CCR4, además de 5 factores de transcripción denominados NOT1-NOT5 y dos proteínas accesorias CAF 4 y CAF130. Dicho complejo también se ha descrito en otros organismos tales como *Homo sapiens*, *Drosophila melanogaster* y *Mus musculus*. Otro complejo enzimático que cataliza la reacción de desadenilación citoplasmática del RNAm esta formado por las proteínas PAN2 y PAN3 y ha sido descrito en levadura y humano. Existe otra enzima que también participa en la desadenilación de RNAm llamada PARN, la cual se ha identificado en organismos eucariontes como humano, a excepción de *S. cerevisiae* y *D. melanogaster*.

Superfamilia	Miembros en <i>E. coli</i>	Miembros en <i>S. cerevisiae</i>	Distribución en otros organismos	Características catalíticas
RNR	RNasa II RNasa R	-	Muchas eubacterias	Degradación en dirección 3'-5'
		Rrp44 (Dis3) Msu (Dss1) Ssd1	Todos los eucariontes	
DEDD	RNasa D	Rrp6 POP2 CAF1	Todos los eucariontes Ciertas eubacterias	Degradación en dirección 3'-5' Algunos tienen actividad de DNasa
	RNase T	-	γ -protobacterias	
	Oligoribonucleasa	Ynt20(Rex2)	Todos los eucariontes Ciertas eubacterias	
	-	Pan2 Rex1,3,4	Todos los eucariontes	
RBN	RNase BN	-	Ciertas eubacterias	Degradación en dirección 3'-5'
PDX	PNPasa	-	Muchas eubacterias Ciertos eucariontes	Degradación en dirección 3'-5' Actividad dependiente de fosfatos
	RNasa PH	Rrp41-43, 45, 46 Mtr3	En todos los reinos	Degradación en dirección 3'-5' Actividad dependiente de fosfatos
RRP4	-	Rrp4, 40 Cs14	Todos los eucariontes Muchas archeas	Degradación en dirección 3'-5'
5XP	-	Xrn1 Rat1	Todos los eucariontes	Degradación en dirección 5'-3'

Tabla II. Superfamilia de exoribonucleasas identificadas en eubacterias y eucariontes (Zuo *et al*, 2001).

Como se mencionó anteriormente, el mecanismo propuesto para degradación del RNAm involucra la participación de diversas proteínas. Cuando el tracto de poli(A) es reducido por digestión enzimática producto de la actividad de las desadenilasas, a un tamaño de aproximadamente 10 adeninas, la proteína de unión al tracto de poli(A) (PAB por sus siglas en ingles, poli (A) binding protein) es liberada, lo que favorece el *decapping* del extremo 5' UTR el cual esta mediado por la actividad del complejo de exoribonucleasas DCP1/DCP2, (por sus siglas en ingles Decapping Protein 1 y 2). Una vez removida la estructura de *cap*, se lleva a cabo una rápida degradación nucleolítica en dirección 5'-3' del resto del mensajero por una enzima llamada XRN1 (Fig. 4). En la ruta alterna posterior a la desadenilación, el RNAm es degradado en dirección 3'-5' por el complejo enzimático llamado exosoma que comprende al menos 10 diferentes exoribonucleasas del tipo Rrp y algunas RNA helicasas. Por último la estructura de *cap* restante es degradada por la enzima DCPs (por sus siglas en ingles, Decapping Protein Scavenger).

En el presente trabajo nos enfocaremos en el análisis de las exoribonucleasas que degradan el tracto de poli (A), debido a que la desadenilación es el paso inicial y limitante en la degradación del RNAm.

1.7 Poli (A) ribonucleasas de eucariontes.

Las poli(A) ribonucleasas o desadenilasas son enzimas que degradan de manera específica los trectos de adeninas presentes en el RNAm de células eucariotas. En levadura se han descrito 4 poli(A) ribonucleasas: PAN2, PAN3, CCR4 y POP2. Por otra parte, en humano existen proteínas homólogas a

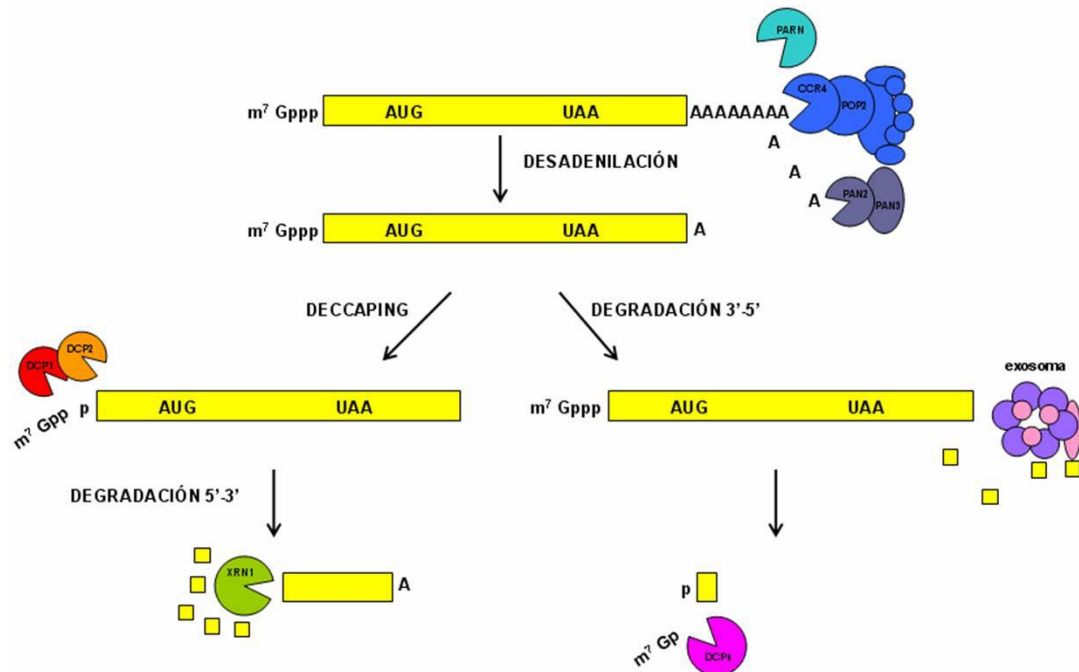


Figura 4. Vías de degradación del RNAm. El inicio de la degradación de RNAm comienza con la desadenilación en la que participan al menos 5 ribonucleasas diferentes conocidas como CCR4, POP2, PARN, PAN2 y PAN3. Una vez degradado el tracto de poli(A) puede seguirse la ruta de degradación en dirección 3'-5 o en dirección 5'-3' por diferentes exoribonucleasas.

PAN2, PAN3, CCR4, POP2, además de tener otras desadenilasas exclusivas de mamíferos representadas por las proteínas PARN y CALIF (CAF1-like) (Meyer *et al*, 2004; Parker *et al*, 2004). Estas enzimas se han integrado por su estructura molecular dentro de diversas familias tales como la familia RNAsa D y Exo III (Fig. 5) perteneciente a la superfamilia DEDD.

De manera interesante, las RNAsas de la familia RNAsa D comparten dominios con las DNA polimerasas y todas comparten diversos residuos acídicos conservados representados por 3 aspartatos (D) y un glutamato (E) que conforman el dominio DEDD, los cuales son los responsables de la unión de 2 iones metálicos involucrados en la catálisis (Fig. 5). Las desadenilasas CAF1, POP2, PAN2, PAN3 y PARN pertenecen a esta subfamilia de ribonucleasas.

La familia Exo III esta compuesta por nucleasas dependientes de Mg^{2+} . La proteína CCR4 pertenece a esta familia y posee una similitud en secuencia con la exonucleasa III de *Escherichia coli*. Todas las proteínas pertenecientes a este grupo tienen un dominio de unión a proteínas con 5 repetidos ricos en leucina (LRR), cercano al extremo carboxilo terminal y dos dominios transactivadores de la transcripción cercanos al extremo amino terminal (Draper *et al*, 1995; Dupressoir *et al*, 2001) (Fig. 5).

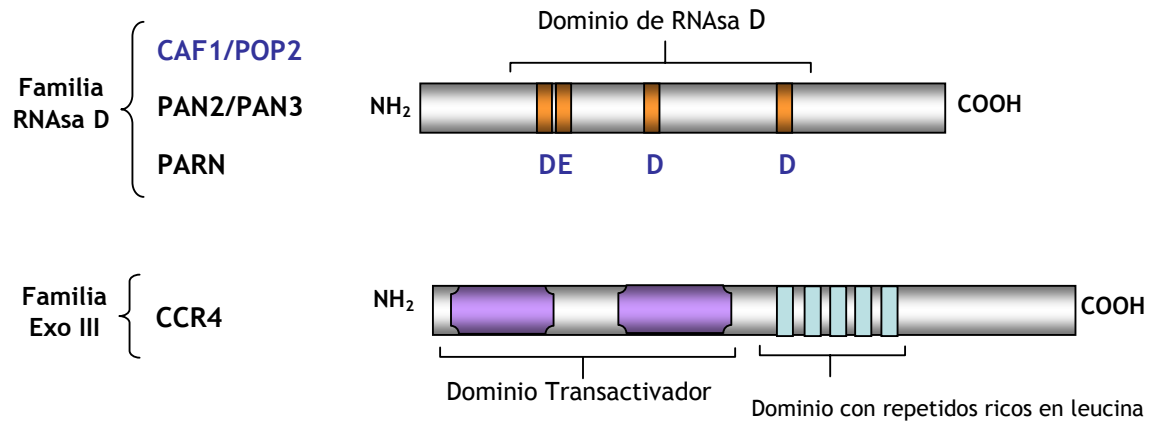


Figura 5. Estructura de los dominios que conforman las poli(A) ribonucleasas de eucariontes. Las desadenilasas POP2, CAF1, PAN2, PAN3 y PARN pertenecen a la familia de RNAsa D la cuál tiene un arreglo estructural donde se localiza un dominio de RNAsa D. La proteína CCR4 pertenece a la familia de exoribonucleasas Exo III que poseen con una región central con motivos con repetidos ricos en leucina (LRR) y dos dominios transactivadores de la transcripción cercanos a la región amino terminal.

En la figura 6 se esquematiza la participación de las diferentes poli(A) ribonucleasas PARN, PAN2, PAN3, POP2/CAF1 y CCR4 en la desadenilación de los RNAm y se muestra el papel primordial que juega la PAB al inhibir o estimular la actividad de las desadenilasas. De estas interacciones se define que cada una de las proteínas posee mayor preferencia por diversos sustratos de RNAm probablemente debido a la presencia de la estructura de *cap* en el extremo 5' UTR, la estructura secundaria del mRNA y/o la unión de la PAB (Parker, *et al*, 2004).

1.8 El complejo CCR4-POP2-NOT.

El complejo CCR4-POP2-NOT de *S. cerevisiae* esta compuesto de dos subunidades unidas física y funcionalmente. La primera contiene los polipéptidos con actividad de desadenilasa CCR4 y POP2, y las proteínas accesorias Caf40p y Caf130p, mientras que la otra subunidad comprende los cinco factores transcripcionales NOT1-NOT5 (Chen *et al*, 2001). La proteína POP2 es indispensable para la formación del complejo proteico ya que sirve como puente entre las proteínas NOT y la proteína CCR4 (Bai, 1999). El complejo CCR4-POP2-NOT interactúa con el complejo de inicio de la transcripción y puede inducir una regulación positiva o negativa de diversos genes. Las proteínas NOT1-5 interactúan con TBP y los factores asociados a TBP (TAFs) para llevar a cabo su función represora o estimulante de la transcripción. (Alberts *et al*, 2000; Deluen *et al*, 2002; Badarinarayana *et al*, 2000).

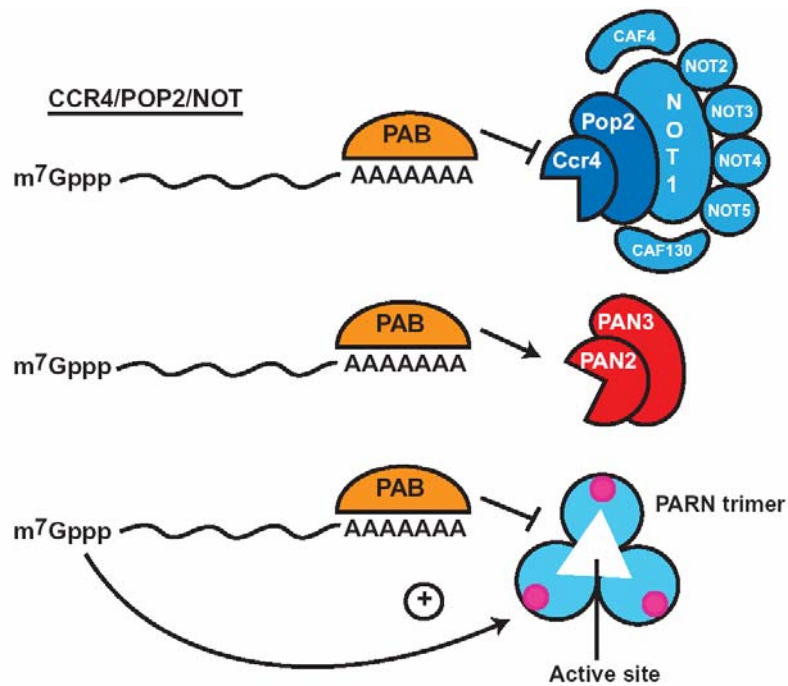


Figura 6. Poli(A) ribonucleasas de organismos eucariontes. Las diferentes desadenilasas tienen preferencia por sustratos de RNAm y su actividad se ve inhibida o activada en presencia de la proteína PAB en el tracto de poli (A), así como por la presencia de la estructura de *cap* en el extremo 5' UTR.

En la figura 7 se muestra la estructura del complejo CCR4-POP2-NOT y se esquematizan las interacciones proteína-proteína que ocurren con el complejo de inicio de la transcripción. Sin embargo, actualmente se desconoce el papel exacto que pudieran tener las desadenilasas CCR4 y POP2 en el inicio de la transcripción.

1.9 Estructura y función de la poli(A) ribonucleasa POP2.

La desadenilasa POP2 de levadura, también llamada CAF1 en humano, es la desadenilasa mas caracterizada en eucariontes. Daugeron *et al* (2001) realizaron un análisis *in silico* y mediante alineamientos con proteínas homólogas en humano, hongos y animales, observó que la secuencia de la proteína POP2 tiene un dominio DEDD divergente careciendo del primer y tercer aspartato (D), los cuales son remplazados por una serina y una glutamina. Sin embargo ensayos funcionales con la proteína POP2 recombinante muestran que posee actividad de desadenilasa *in vitro* (Daugeron *et al*, 2001, Thore *et al* 2003). En estos trabajos se demostró que la proteína recombinante POP2 expresada en bacteria, es una poli(A) ribonucleasa activa. Los autores utilizaron un fragmento de la proteína recombinante POP2 que contenía los dominios catalíticos de la enzima y observaron que era capaz de degradar sustratos de RNA que contenían trectos de poli(A), así como trectos de poli (G) y poli (C), lo que sugiere que esta desadenilasa no tiene alta especificidad por los sustrato que degrada *in vitro*. Actualmente se conoce la estructura cristalina de esta enzima en la cual se observa que el dominio de RNAsa D tiene un conformación terciaria similar al dominio catalítico de la DNA polimerasa III (Thore, 2003).

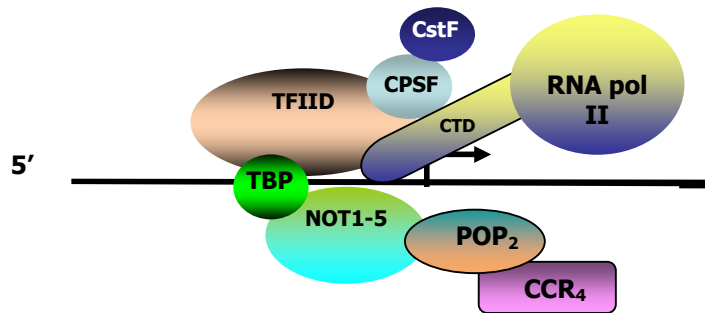


Figura 7. Interacciones de las proteínas NOT1-NOT5 del complejo CCR4-POP2-NOT con algunos factores del complejo de inicio de la transcripción.

1.10 Poli(A) ribonucleasas POP2/CAF1 y ciclo celular.

Existen diversos estudios en los que se ha determinado que existe una interacción de la proteína POP2 de levadura con proteínas que regulan el ciclo celular. En el trabajo de Liu *et al* (1997) se reportó que la proteína DBF2 que es necesaria para la progresión del ciclo celular en levadura es un componente adicional del complejo CCR4-POP2-NOT. Se determinó que DBF2 interactúa con POP2 y concluyeron que ambas proteínas están involucradas en la regulación de la transcripción durante la mitosis tardía del ciclo celular, debido que al observar defectos en la proteína DBF2 existía una alteración en la transcripción, además de que mutaciones en *caf1* y *ccr4* afectaban la progresión del ciclo celular.

En el año 2001, Prévot *et al* demostraron la asociación *in vitro* e *in vivo* de las proteínas BTG1 y BTG2 con la proteína CAF1 de humano. Posteriormente, en el trabajo de Morel *et al* (2003) también se corroboró que las proteínas BTG2 y BTG1 interactúan con CAF1 mediante ensayos de inmunoprecipitación y experimentos de filtración en gel. Este grupo de estudio también reportó que la localización celular de CAF1 cambia en el transcurso del ciclo celular. En las fases G0 y G1, la mayor parte de CAF1 fue detectada en el núcleo de las células, pero a medida que éstas entraban en la fase S, la proteína CAF1 se trasladaba al citoplasma, lo que sugiere que CAF1 podría ejercer dos funciones: factor de transcripción cuando su localización es nuclear y desadenilasa cuando se localiza en citoplasma. Existen antecedentes de que la proteína BTG2 esta involucrada en crecimiento, diferenciación y control del ciclo celular en levadura y participa en arresto del ciclo celular en las fases G2 y M en respuesta al daño del DNA, por lo que su interacción directa con la

desadenilasa CAF1 sugiere que podría tener una participación importante en estos eventos celulares.

1.11 Poli(A) ribonucleasas POP2/CAF1 y CCR4 en respuesta al daño del DNA.

El daño inducido de las cadenas del DNA activa diversos puntos de chequeo celulares los cuales detienen la progresión del ciclo celular. De manera conjunta, se induce la expresión de muchos genes que participan en la reparación del daño genotóxico la cual esta modulada tanto a nivel transcripcional como postranscripcional. Algunos componentes del complejo CCR4-POP2-NOT se han asociado a la respuesta al daño del DNA, pero aún no están claros los mecanismos involucrados. En el año 2004, Traven *et al* demostraron que los genes *ccr4* y *pop2* tienen interacciones genéticas complejas con genes que participan en los puntos de chequeo del ciclo celular tales como *DUN1*, *MRC1*, *RAD9* y *RAD17* en respuesta al daño del DNA inducido con hidroximetilurea y metilmetano sulfonato. Ellos analizaron levaduras mutantes para los genes *ccr4*, *caf1* y *dun1* y mutantes dobles *ccr4:dun1* y *caf1:dun1*. Al analizar los perfiles de sensibilidad de las dobles mutantes en respuesta al daño al DNA se observó un incremento en la sensibilidad de ambas mutantes dobles *ccr4:dun1* y *caf1:dun1* y una disminución de su sobrevivencia a diferencia de los mutantes en un solo gen. Estos datos sugieren que las funciones del complejo CCR4-POP2-NOT en conjunto con otras proteínas tales como DUN1 contribuyen en la respuesta al daño del DNA.

1.12 Estructura y función de la ribonucleasa CCR4.

La proteína CCR4 de levadura es una desadenilasa involucrada en la degradación del RNAm a diferencia de otros miembros de la familia exo III. Esta proteína posee un dominio con repetidos ricos en leucinas (LRR) en la región central, los cuales son necesarios para su interacción con la desadenilasa POP2 y otros factores como la proteínas CAF4 y CAF16 que son también componentes del complejo CCR4-POP2-NOT. La LRR esta caracterizada por arreglos en *tandem* de secuencias consenso, que en levadura se distribuye en cinco arreglos completos con una longitud de 23 aminoácidos. La proteína CCR4 de levadura, a diferencia de su homólogo de humano, posee en la región amino terminal dos dominios de transactivación requeridos para la activación transcripcional de diversos genes involucrados en crecimiento no fermentativo, en la integridad de la pared celular y en la biosíntesis de metionina (Dupressoir *et al*, 2001; Clark *et al*, 2004).

2. ESTADO DEL ARTE.

2.1 Mecanismos de degradación del RNAm en parásitos protozoarios.

Mucho de lo que se conoce acerca de las rutas de degradación en eucariontes ha sido por su estudio en *S. cerevisiae* y en *H. sapiens*. Sin embargo, a pesar de la importancia de los eventos postranscripcionales en la regulación de la expresión génica, los mecanismos de degradación del RNAm en parásitos protozoarios no han sido ampliamente estudiados. Existe un estudio reciente realizado por Li *et al*, (2006) en el parásito protozoario *Trypanosoma brucei* donde identificaron y caracterizaron cuatro diferentes proteínas denominadas XRNA, XRNA, XRNC y XRND que degradan el RNAm

en dirección 5'-3' y que son homólogas a las exoribonucleasas Xrn1p y Xrn2p de *S. cerevisiae*. La proteína XRND se localizó en núcleo, mientras que las proteínas XRNB y XRNC se localizaron en citoplasma y la proteína XRNA en ambos compartimentos. También se determinó que la actividad de XRND y XRNA es esencial para el crecimiento del parásito.

Sin embargo, actualmente no se han caracterizado otras proteínas que participen en la degradación del RNAm como son las diversas RNAsas, enzimas de *decapping* ni posibles desadenilasas en otros parásitos protozoarios de importancia médica.

2.2 Mecanismos de degradación del RNAm en *E. histolytica*.

En nuestro grupo de trabajo estamos interesados en estudiar los mecanismos y proteínas participantes en la degradación del RNAm. En este parásito se han estudiado algunas secuencias y proteínas que participan en la regulación de genes a nivel transcripcional, sin embargo se conoce muy poco acerca de los mecanismos de regulación a nivel postranscripcional. En nuestro grupo hemos iniciado el estudio de algunos elementos y factores que participan en el procesamiento del extremo 3' UTR del pre-mRNA. En una publicación previa, reportamos que *E. histolytica* presenta una maquinaria de procesamiento del extremo 3' UTR del pre-mRNA homóloga, a la descrita en levadura y humano (López Camarillo *et al*, 2005; García Vivas *et al*, 2005). Sin embargo, los mecanismos y las proteínas que participan en el procesamiento del RNAm aun no han sido bien caracterizados en este parásito.

3. ANTECEDENTES PARTICULARES DEL PROYECTO.

Previamente, en nuestro grupo definimos la importancia que tiene la estabilidad del mRNA y la longitud del tracto de poli(A) en la regulación de la expresión del gen de resistencia a múltiples fármacos *EhPgp5* de *E. histolytica*. En dicho trabajo se describe un modelo hipotético que propone que el aumento en la longitud del tracto de poli(A) del RNAm del gen *Ehpgp5* en los trofozoítos crecidos a altas concentraciones de emetina, es debido a alteraciones en el mecanismo de degradación de la cola de adeninas, provocando un aumento en la estabilidad del transcrito. En consecuencia, se propuso la existencia de posibles poli(A) ribonucleasas cuya actividad podría estar afectada en los trofozoítos crecidos a altas concentraciones de emetina. Sin embargo, la existencia de los genes que codificaran para tales proteínas se desconocía en ese momento.

En su trabajo de Tesis de Maestría (2007), la Maestra en Ciencias Beatriz Gallo identificó, clonó y expresó el gen que codifica para la proteína EhCAF1 de *E. histolytica*, que es homóloga a POP2 y CAF1 de levadura y humanos, respectivamente. Sin embargo, actualmente no se conoce si existen otras posibles poli(A) ribonucleasas en el genoma de *E. histolytica* ni las características funcionales de la proteína EhCAF1 descrita.

4. IMPORTANCIA DE CONTINUAR EL ESTUDIO DEL TEMA.

La amibiasis sigue siendo un problema de salud pública en México y a nivel mundial, por lo que el estudio de los mecanismos que regulan la expresión de genes, incluyendo aquellos involucrados en la virulencia del parásito toma especial importancia. En *E. histolytica* se conoce muy poco acerca del procesamiento del pre-RNAm y de las proteínas que participan en la degradación del RNAm por lo que su estudio merece especial interés.

En el presente trabajo proponemos que la identificación de nuevas poli(A) ribonucleasas en el genoma de *E. histolytica* y la caracterización funcional de la posible desadenilasa EhCAF1, nos permitirán entender los mecanismos de degradación del RNAm y su importancia en la regulación de la expresión génica en este parásito.

II. OBJETIVOS.

1. OBJETIVO GENERAL.

Identificar las poli(A) ribonucleasas de *E. histolytica* y realizar el estudio funcional de la posible poli(A) ribonucleasa EhCAF1.

2. OBJETIVOS ESPECIFICOS.

- 1.- Identificar y analizar *in silico* las posibles poli(A) ribonucleasas de *E. histolytica*.
- 2.- Analizar la expresión del RNAm de los genes que codifican las poli(A) ribonucleasas de *E. histolytica* en respuesta al daño al DNA.
- 3.- Amplificar y subclonar el gen *EhCaf1* en el vector de expresión pGEX-6P-1.
- 4.- Expresar y purificar la proteína recombinante rEhCAF1-GST.
- 5.- Analizar la interacción de rEhCAF1-GST con RNA.

III. MATERIALES Y MÉTODOS.

1. Identificación de las poli(A) ribonucleasas de *E. histolytica*.

Mediante el uso de herramientas bioinformáticas, se obtuvo la secuencia de aminoácidos de las poli(A) ribonucleasas CAF1, CAF1-like, CCR4 y PARN de *H. sapiens* y sus homólogos POP2, CCR4, PAN2 y PAN3 de *S. cerevisiae*, a partir la base de datos del Gen Bank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) Posteriormente, con las secuencias obtenidas se llevó a cabo una búsqueda de las proteínas homólogas en el banco de datos del genoma de *E. histolytica* en el URL (<http://pathema.tigr.org/tigr-cripts/Entamoeba/PathemahomePage.cgi>) correspondiente a la base de datos del Pathema. Para corroborar la identidad de las secuencias, nuevamente se realizó una búsqueda de proteínas homólogas en otros organismos en la base de datos del Gen Bank mediante BLAST (<http://ca.expasy.org/tools/blast>). Para definir dominios conservados en las proteínas de los diversos organismos analizados, se realizó un alineamiento múltiple utilizando el programa CLUSTALW (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>). A partir del alineamiento obtenido, se realizó un análisis filogenético de las secuencias por el método de *Neighborn joining* mediante el programa MEGA versión 3.1 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis). La secuencia de aminoácidos de las posibles poli(A) ribonucleasas de *E. histolytica* se utilizó para hacer la predicción de dominios estructurales utilizando los programas en línea InterProScan (<http://www.ebi.ac.uk/interpro/index.html>) y Pfam (<http://www.sanger.ac.uk/Software/Pfam>). La predicción de las estructuras secundarias y terciarias de las proteínas, se realizó con el programa SWISS MODEL (<http://www.expasy.org/swissmod/SWISS-MODEL.html>). El modelaje y

visualización de las estructuras terciarias de las proteínas se realizó con el programa Pymol (<http://pymol.sourceforge.net/>).

2. Cultivos de trofozoítos de *E. histolytica*.

Los trofozoítos de la clona A cepa HMI:IMSS de *E. histolytica* se cultivaron axénicamente 37° C en medio TYI-S-33 (biosate, glucosa anhidra, NaCl, KH₂PO₄, K₂HPO₄, L(+) ácido ascórbico, L-cisteína, citrato férrico, agua desionizada, pH 6.8), complementado con 15% de suero bovino (Biofluds), 3% de mezcla de vitaminas de Diamond (Diamond *et al.*, 1978) y los antibióticos 0.25 U/ml de bencilpenicilina (Laboratorios Pisa) y 35 µg/ml de estreptomicina (Lakeside). Para realizar los experimentos, los trofozoítos en fase logarítmica de crecimiento se cosecharon mediante incubación en hielo durante 15 min. y se agitaron suavemente hasta ser despegados de las paredes del recipiente. Las células se empastillaron mediante centrifugación a 3000 rpm durante 10 min. en una centrifuga Sorvall Biofuge *primo R* a 4° C en tubos Falcon (Nalgene) de 50 ml. El sobrenadante se eliminó y el paquete celular se lavó por centrifugación con solución salina amortiguadora de fosfatos PBS (NaCl 140 mM, KCl 2.7 mM, Na₂PO₄ 8 mM, KH₂PO₄ 8 mM, pH 7.2) durante 5 min. a 4° C. Durante el último lavado, se tomó una alícuota de la suspensión y se contaron las amibas en una cámara de Neubauer. Los trofozoítos se utilizaron de manera inmediata para los subsecuentes experimentos.

2.1. Choque térmico de los trofozoítos a 42° C.

Una caja mediana de cultivo confluyente de trofozoítos (6×10^6 células) de la clona A se incubó a 42° C durante 4 h. (Weber *et al*, 2006) y posteriormente se realizó la extracción de RNA total con la técnica de Trizol (Gibco BRL).

2.2. Irradiación de los trofozoítos con luz UV-C.

Los trofozoítos de la clona A se incubaron durante 15 min. en cajas Petri de vidrio, posterior a lo cual se les retiró el medio y las células no adheridas. Las células pegadas al fondo de las cajas fueron sometidas a irradiación con una dosis de 150 J/m^2 de luz UV-C durante 8 seg. en un Stratalinker 1800 (Stratagene). Posteriormente, se les añadió medio TYI-S33 completo previamente calentado y se incubaron durante 30 min. y 3 h a 37°C (López-Casamichana *et al*, 2007), tiempos en los cuales se realizó la extracción del RNA total.

3. Obtención del DNA total de la clona A de *E. histolytica*.

Para la obtención del DNA total a partir de trofozoítos de la clona A, se utilizó el protocolo de extracción de DNA mediante el uso del kit Wizard Genomic DNA purification (Promega). Se cosechó una caja mediana (6×10^6 células) por centrifugación a 3000 rpm durante 10 min. en la centrifuga Sorvall Biofuge *primo R* a 4° C en tubos Falcon (Nalgene) de 50 ml. Se eliminó el sobrenadante y las células se resuspendieron y lisaron con la adición de 1200 μl de amortiguador de lisis (Nuclei Lysis Solution), la suspensión se distribuyó en tubos Eppendorf nuevos de 1.5 ml (800 μl a cada tubo), se les adicionaron 200 μl de solución de precipitación de proteínas (Protein Precipitation Solution)

y se incubaron por 5 min. en hielo. Los tubos se centrifugaron a 13000 rpm durante 4 min., se recuperó el sobrenadante y se transfirió a tubos Eppendorf de 1.5 ml y se adicionaron 600 µl de isopropanol, mezclando cuidadosamente por inversión. Se centrifugaron los tubos a 13000 por 5 min. a temperatura ambiente, se decantó el sobrenadante y se dejó secar la pastilla por 15 min. Por último, se adicionaron 30 µl de agua grado biología molecular (SIGMA) para rehidratar el DNA. El DNA se cuantificó por espectrofotometría a 260 nm. Las alícuotas se almacenaron a -20° C para su posterior uso.

4. Diseño, síntesis y cuantificación de los oligonucleótidos.

Después de realizar los alineamientos y determinar cuales eran las regiones más conservadas entre las proteínas, se diseñaron oligonucleótidos específicos con el programa Oligo para amplificar la región más divergente de los genes. Los oligonucleótidos óptimos predichos por el programa se muestran a continuación:

EhCaf1 sentido (5'-CAATAATGCCACCCAAT -3')

EhCaf1 antisentido (5'-ACTGTTGATGGATTTATTAAA -3')

EhCaf1-like sentido (5'-CTTTCAAGATGTTAGTTTCCCAA - 3')

EhCaf1-like antisentido (5'-TTCTATTGATGATTTCTTTACAAAA -3')

EhCcr4 sentido (5'-ATGGGAGCTAAAGGATCAAA -3')

EhCcr4 antisentido (5'-GCTCTTAAATTCTTAGAATTGG - 3')

Actina sentido (5'-AGCTGTTCTTTCATTATATGC-3')

Actina antisentido (5'-TTCTCTTTCAGCAGTAGTGGT-3').

Todos los oligonucleótidos utilizados, se generaron por síntesis química (Invitrogen) y fueron cuantificados a través de visualización por UV en geles de

agarosa teñidos con bromuro de etidio y espectrofotométricamente mediante la absorción a una longitud de onda de 260 nm (Biomate 3 Thermo Spectronic). Para determinar la concentración de los oligonucleótidos se utilizó la siguiente fórmula: ($\mu\text{g/ml}$)= Abs 260 nm x 33 x factor de dilución.

5. Amplificación de los genes *Ehcaf1*, *Ehcaf1-like* y *Ehccr4* a partir de DNA genómico de trofozoítos de *E. histolytica*.

Para la estandarización de las condiciones de amplificación de cada uno de los genes de las posibles poli (A) ribonucleasas identificadas en el genoma de *E. histolytica*, se amplificaron por PCR fragmentos internos para cada uno de ellos usando DNA genómico como templado. Los programas utilizados para las reacciones de amplificación fueron los siguientes: para el gen *Ehcaf1* el programa consistió de 30 ciclos a 94° C durante 30 seg., 45° C durante 30 seg., 72° C durante 1 min. y una extensión final a 72° C por 7 min., para la amplificación de un fragmento de 594 pb. Para el gen *Ehcaf1-like* fueron 30 ciclos de: 94° C durante 30 seg., 52° C durante 30 seg., 72° C durante 1 min y una extensión final a 72° C por 7 min. produciendo un fragmento de 556 pb y para el gen *Ehccr4* el programa se diseñó de la siguiente manera: 94° C durante 30 seg., 50° C durante 30 seg., 72 ° C durante 1 min y una extensión final a 72° C por 7 min. para la obtención de un amplicón de 626 pb.

6. Análisis del RNA.

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

La extracción del RNA total se realizó utilizando el reactivo comercial TRIzol (mezcla de fenol- isotiocianato de guanidina). La extracción del RNA se

realizó según el protocolo sugerido por el proveedor. Se cosechó una caja mediana (4×10^6 células) por centrifugación a 3000 rpm durante 10 min. en la centrifuga Sorvall Biofuge *primo R* a 4° C en tubos Falcon (Nalgene) de 50 ml. Se eliminó el sobrenadante y las células se resuspendieron y se lisaron con 400 µL de TRIzol. Se incubó la mezcla a temperatura ambiente durante 5 min. y se le agregaron 300 µl de cloroformo. Después de mezclar por inversión suave para homogenizar, se incubó durante 3 min. a temperatura ambiente. Se centrifugó a 8000 rpm durante 5 min. para obtener la fase acuosa y el RNA de la fase acuosa se precipitó con 800 µl de isopropanol incubando durante 10 min. a temperatura ambiente. Se centrifugó a 8000 rpm durante 15 min. para precipitar el RNA, se eliminó el sobrenadante por decantación y la pastilla de RNA se lavó con etanol al 75%, se centrifugó nuevamente y se eliminó el sobrenadante. Finalmente, la pastilla de RNA se secó durante 10 min. a temperatura ambiente y se resuspendió en agua libre de ribonucleasas tratada con DEPC al 0.1%. El RNA se cuantificó en un espectrofotómetro (Biomate 3 Thermo Spectronic) y se visualizó en un gel de agarosa al 1% en TBE 1X. El RNA en forma pura exhibe una relación lineal entre la concentración y la absorbancia a 260 nm. Dado que una unidad de absorbancia a 260 nm corresponde a 44 µg/ml de RNA de cadena sencilla, la concentración de RNA pudo estimarse de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$[\text{RNA } \mu\text{g/ml}] = A_{260 \text{ nm}} \times 44.19 \times \text{factor de dilución.}$$

6.2. Síntesis de la cadena complementaria de DNA (cDNA).

Con la finalidad de realizar la cuantificación de los transcritos de los genes *EhCaf1*, *EhCAf1-like*, *EhCcr4* y *actina* en diversas condiciones,

implementamos la técnica de transcripción reversa seguida de amplificación mediante la PCR en dos pasos. Para la síntesis de las cadenas de cDNA se realizó el protocolo experimental que se describe a continuación.

6.3. Tratamiento del RNA total con Dnasa I.

Se procedió a mezclar 1 μ g de RNA, 1U de la enzima DNasa I (Gibco BRL) y el volumen necesario de agua libre de RNAsas para completar a 7 μ l la reacción. Se incubó la muestra por 15 min. a 37° C. Posteriormente se adicionó 1 μ l de EDTA 25 mM y se incubó 10 min. a 65° C para desactivar la enzima. Se prosiguió con el protocolo para realizar el proceso de síntesis del cDNA por retrotranscripción.

6.4. Retrotranscripción.

Primeramente determinamos la cantidad de RNA total inicial óptima para lograr detectar diferencias en las concentraciones de los transcritos de interés, de manera tal que no se saturara la reacción de PCR. Para esto se procedió a mezclar diferentes concentraciones de RNA en el rango de 50 ng a 5 μ g previamente tratados con la DNasa I, con 100 ng de oligo (dT) en un volumen de 9 μ l el cual se completó mediante la adición de agua tratada con DEPC al 0.1%. Las muestras se desnaturalizaron a 64°C por 10 min. Posteriormente, a temperatura ambiente se les adicionó el buffer de reacción de la Superscript IITM (Tris-HCl 250 mM pH 8.3, KCl 375 mM, MgCl₂ 1mM), 2 μ l de la mezcla de dNTPs 10 mM (10 mM de dATP, dCTP, dGTP y dTTP), 2 μ l DTT 100 mM y 1 μ l de inhibidor de RNAsas (RNAsin Gibco BRL) en un volumen final de 20 μ l. Las mezclas se incubaron a 25° C durante 5 min. Finalmente, se agregaron 200 U

de SuperscriptTM II y se incubaron a 42° C por 1 h. Transcurrido este tiempo se le adiciono 1 µl de RNasa H- con la finalidad de obtener un mayor rendimiento en la reacción de PCR debido a que se elimina el RNA templado y se impide la formación de moléculas dúplex DNA-RNA, que disminuyen el número de hebras cDNA libre que sirven de templado en la reacción de PCR. Para algunos templados, la incubación del RNA y el iniciador a 65° C en ausencia de amortiguador y sales, seguida de enfriamiento en hielo, elimina la mayoría de las estructuras secundarias y permite el perfecto alineamiento del iniciador. Con la finalidad de eliminar la posibilidad de que durante la reacción de síntesis de cDNA existieran o se formaran nuevas estructuras secundarias, realizamos una curva de calibración utilizando las temperaturas 37° C, 42° C y 45° C para determinar la temperatura optima de síntesis de cDNA. La retrotranscripción a 42° C fue la óptima para lograr una adecuada amplificación por PCR de ambos transcritos, por lo que los ensayos los realizamos a esta temperatura. La enzima SuperscriptTM II que utilizamos es una transcriptasa reversa dependiente de RNA la cual es capaz de generar una mayor eficacia en la síntesis de moléculas de cDNA de hasta 12.3 kb y no presenta actividad residual de RNasa H.

6.5. Amplificación de los genes *EhCaf1*, *EhCaf1-like*, *EhCcr4* y *actina* por PCR.

Utilizamos 1/5 del volumen de reacción de síntesis del cDNA para la amplificación por PCR de los transcritos *EhCaf1*, *EhCaf1-like*, *EhCcr4* y *actina*. Se adicionó el amortiguador de reacción, 10 mM de cada dNTP, 5 mM de MgCl₂, 1.2 U de *Taq* DNA polimerasa (Invitrogen) y los oligonucleótidos

específicos para cada gen. Los programas de amplificación usados se detallan en la sección del diseño, síntesis y cuantificación de los oligonucleótidos.

6.6. Análisis del DNA por electroforesis en geles de poliacrilamida al 12%.

Las reacciones de amplificación por PCR se analizaron mediante electroforesis en geles de poliacrilamida al 12% en amortiguador TBE 1X. Para preparar los geles, se mezclaron 2.4 ml de bis-acrilamida 30%, 1.2 ml de TBE 5X, 42 μ l persulfato de amonio al 10%, 2.1 μ l TEMED y 2.4 ml de agua destilada. Posteriormente, la solución se vació en los moldes para geles a los cuales se les puso un peine de 10 pozos de 1 mm. de espesor. Una vez solidificado el gel, éste se colocó en la cámara de electroforésis y se agregó la solución amortiguadora de corrida TBE 1X. El DNA se mezcló con 0.1 volumen de solución de carga preparada con Ficoll 400 al 25%, azul de bromofenol al 0.25% y xilen cianol al 0.25%. Las muestras se corrieron a 100 V durante 2 h. Los productos de PCR resueltos en los geles de poliacrilamida se visualizaron por irradiación con luz ultravioleta de 310 nm y se registraron en el fotodocumentador Fujifilm FLA 5100.

7. Subclonación del gen *Ehcaf1* en el vector pGEX-6P-1.

7.1. Amplificación por PCR del gen *Ehcaf1*.

Se diseñaron los oligonucleótidos *EhCaf1*-sentido (5'-CGGGATCCTTTA TGAATATTAACGCCTCA-3') y *EhCaf1* antisentido (5'-CGCTCGAGAAATTTC AATACAAGGCTAAT -3') que contienen los respectivos sitios de restricción para las enzimas *Bam*HI y *Xho*I (subrayados en las secuencias). Ambos iniciadores flanquean el gen *Ehcaf1* completo de 936 pb. Mediante la reacción

en cadena de la polimerasa, se amplificó el fragmento deseado usando como molde 50 ng de DNA genómico, una mezcla de dNTPs 10mM, $MgCl_2$ 2.5 mM, 100 ng de cada oligonucleótido y 1 U de *Taq* DNA polimerasa. Se utilizó un programa de 30 ciclos: desnaturalización a 94° C durante 35 seg., alineamiento de los oligonucleótidos a 45° C por 35 seg., extensión a 72° C por 1 min. y finalmente una extensión a 72° C por 7 min. El control negativo consistió en una mezcla de reacción carente de DNA molde.

7.2. Purificación de fragmentos de DNA.

Los fragmentos de DNA amplificados correspondientes al gen *Ehcaf1* se purificaron del gel por absorción a perlas de silica utilizando el kit Geneclean II (BIO 101). Los fragmentos de DNA se separaron por electroforesis en geles de agarosa al 1% en TAE 1X y la banda correspondiente al DNA se cortó del gel, se pesó y se mezcló con 3 volúmenes de NaI 6 M. Para disolver la agarosa, el tubo se incubó por 10 min. a 55° C, enseguida se le agregaron 5 µl de perlas de silica y se incubó toda la noche a 4° C. Al día siguiente, la muestra se centrifugó a alta velocidad en una microcentrifuga Eppendorf por 30 seg. y la pastilla se lavó 3 veces con 500 µl de solución de lavado (etanol 50% (Merck); NaCl 0.1 M; Tris-HCl 10 mM; pH 7 y EDTA 1mM). Después del último lavado, la pastilla se resuspendió en 20 µl de agua grado biología molecular y el DNA se eluyó de las perlas de silica por incubación durante 10 min a 55° C. La suspensión se centrifugó de nuevo a alta velocidad en una centrífuga Sorvall Biofuge *primo R* por 3 min. y el DNA purificado se almacenó a -20° C hasta su uso.

7.3. Digestión del vector pGEX-6-P1 y el inserto *Ehcaf1*.

El producto de PCR de 933 pb puro correspondiente al gen *Ehcaf1* y el vector pGEX-6P-1(Amersham) se digirieron paralelamente con las enzimas *Bam*HI y *Xho*I (New England, BioLabs) usando 5 U de cada enzima en el buffer 2 de reacción (NaCl 150 mM, Tris-HCl 10 mM, MgCl₂ 10 mM, DTT 1 mM, pH 7.9) durante toda la noche a 37° C. Al día siguiente, se analizaron los productos de digestión en un gel de agarosa al 1% en TAE 1X. Tanto el inserto como el vector se purificaron mediante el kit QIAEX II Gel Extraction (Qiagen) y nuevamente se analizaron en un gel de agarosa al 1% para su cuantificación.

7.4. Ligación del gen *Ehcaf1* en el vector pGEX-6P-1.

El gen *Ehcaf1* se clonó en el vector de expresión pGEX-6P-1. Este vector tiene la característica de tener el gen de resistencia a la ampicilina y de agregar como etiqueta la proteína GST en el extremo amino de la proteína recombinante. La reacción de ligación se realizó utilizando una proporción molar vector:inserto de 1:5, 5µl de amortiguador de la enzima en presencia de ATP y 1 U de enzima T4 DNA ligasa (Invitrogen) en un volumen de reacción de 20 µl. La mezcla se incubó durante toda la noche a 16° C. Como control se realizó una mezcla de ligación similar que carecía del inserto.

7.5. Preparación de las células competentes de *E. coli* DH5α frescas.

Para la obtención de células competentes, bacterias *E. coli* cepa DH5α se sembraron en una placa de medio LB y se incubaron a 37° C toda la noche. Al día siguiente, una colonia se sembró en 5 ml de medio LB líquido y se incubó a 37° C hasta que alcanzó una densidad óptica (DO) de 0.4 a 560 nm,

entonces se realizó una dilución 1:20 de este cultivo en 50 ml de medio LB líquido fresco y se permitió que creciera a 37° C hasta alcanzar una DO a 600 nm de 0.4. Posteriormente, las células se incubaron en hielo durante 20 min. y se centrifugaron a 7000 rpm durante 5 min. en la centrifuga Sorvall Biofuge *primo R* por 5 min. a 4° C. La pastilla se resuspendió en 20 ml de solución de CaCl₂ 1 mM se incubó por 5 min. en hielo y se centrifugó a 7000 rpm durante 5 min a 4° C. Finalmente, la pastilla se resuspendió en 4 ml de solución de CaCl₂ 1 mM y se guardó a 4° C por un tiempo no mayor a 1 semana.

7.6. Transformación de células competentes mediante choque térmico.

100 µl de bacterias DH5α competentes se mezclaron con la mezcla de ligación pGEX-6P-*Ehcaf1*. Se incubaron por 30 min en hielo y después se les dio un choque térmico durante 90 seg. a 42° C en un termobloque. Las células se pasaron inmediatamente a hielo en donde permanecieron 3 min. Después, se agregaron 200 µl de medio LB líquido y las bacterias se incubaron por 1 h a 37° C en agitación a 250 rpm. Por último, la mezcla se espatuló sobre cajas Petri con medio LB sólido complementado con 100 µg/ml de ampicilina. Las cajas se incubaron invertidas durante toda la noche a 37° C.

7.7. Obtención de DNA a pequeña escala (miniprep).

Para la obtención de DNA plasmídico a pequeña escala se siguió la técnica descrita por Sambrook y col (1989). Las colonias bacterianas que crecieron en las placas de medio LB ampicilina después de la transformación se sembraron en 5 ml de medio LB líquido complementado con 50 µg/ml de ampicilina y se incubaron toda la noche a 37° C en agitación a 250 rpm. Al día

siguiente, se tomaron, 1.5 ml de cada cultivo, se colocaron en un tubo Eppendorf, y se centrifugaron durante 30 seg. en una microfuga a 4° C para empastillar las bacterias. Las pastillas se resuspendieron en 100 µl de solución I (glucosa 50 mM, Tris HCl 25 mM pH 8, EDTA 10 mM pH 8). Se agregaron a la mezcla 200 µl de solución II (NaOH 0.2 N, SDS 1%), mezclando suavemente por inversión e incubando 5 min. en hielo. Luego, se agregaron a la muestra 150 µl de solución III (acetato de potasio 5 M), los tubos se agitaron suavemente y se incubaron 5 min. adicionales en hielo. Los tubos se centrifugaron 5 min. a 12000 rpm en una microfuga a 4° C. Los sobrenadantes que contienen el DNA plasmídico se recuperaron decantándolos a un tubo nuevo. Posteriormente, se les agregó 1 ml de etanol absoluto frío y se centrifugaron por 5 min. a 4° C en una microfuga para precipitar el DNA. Las pastillas se lavaron cuidadosamente con 1 ml de etanol al 70% y nuevamente se centrifugaron por 2 min. a 4° C. El DNA plasmidico se dejó secar a temperatura ambiente y finalmente se resuspendió en 30 µl de agua desionizada estéril.

7.8. Digestión del plásmido pGEX-6P-*Ehcaf1*.

Los plásmidos obtenidos de la minipreparacion de DNA se digirieron con las enzimas *Bam*HI y *Xho*I durante 3 h. a 37° C en presencia de 2 µl de solución amortiguadora 2 y 1 µl de BSA en un volumen final de reacción de 20 µl. El producto de la digestión se resolvió en un gel de agarosa al 1% en TAE 1X para verificar la presencia y el tamaño del inserto.

7.9. Secuenciación automática del gen *Ehcaf1*.

Una vez seleccionada la clona positiva que contenía el inserto correspondiente al gen *Ehcaf1*, se procedió a secuenciar la construcción para confirmar que el inserto estuviera en marco de lectura con el vector y que no tuviera mutaciones. Se realizó la secuenciación utilizando el kit ABI Prism BigDye Terminator, v2.0 y el secuenciador de DNA automático 31300 Genetic Analyzer (Applied Biosystem). La reacción de secuenciación de DNA se llevó a cabo por el método enzimático de Sanger, el cual se basa en la síntesis de DNA en presencia de terminadores de cadena dideoxinucleósidos trifosfatados (ddNTPs). Cada terminador de cadena está marcado con una molécula fluorescente. La adenina contiene dicloro R6G (verde), la citosina está teñida con dROX (rojo), la guanina con dR110 (azul) y la timina con dTAMRA (amarillo). La reacción se llevó a cabo en presencia del 500 ng DNA molde, 10 pm de un oligonucleótido complementario al extremo 3'UTR del gen *Ehcaf1* y una mezcla del kit que contiene la enzima AmpliTaq DNA polimerasa y $MgCl_2$. La DNA polimerasa al sintetizar la cadena complementaria no hace distinción entre los dNTPs y ddNTPs, pero cada vez que un ddNTP se incorpora, la síntesis de la cadena se detiene por la falta del grupo hidroxilo. Debido a que en la reacción existen millones de moléculas de DNA molde, las cadenas de DNA sintetizadas van a terminar en diferentes puntos en la secuencia. Estos fragmentos sintetizados se separaron por su tamaño y con un láser se excitó el fluorocromo del ddNTP. Los datos obtenidos fueron interpretados en la computadora la cual asignó un pico de fluorescencia correspondiente a un nucleótido específico y el resultado se desplegó gráficamente en un electroferograma.

8. Expresión y purificación de la proteína recombinante rEhCAF1-GST.

8.1. Preparación de las células competentes *E. coli* BL21 (DE3) pLysS frescas.

Para la obtención de células competentes, bacterias de la cepa BL21(DE3)pLysS fueron sembradas en una placa de medio LB y se incubaron a 37° C toda la noche. Al día siguiente, una colonia se sembró en 5 ml de medio LB líquido y se incubó a 37° C hasta que alcanzó una DO a 600 nm de 0.4. Entonces se realizó una dilución 1:20 de este cultivo en 50 ml de medio LB líquido fresco y se permitió que creciera a 37° C hasta una DO de 0.4 a 600 nm. Posteriormente, las células se incubaron en hielo durante 20 min. y se centrifugaron a 7000 rpm en la centrifuga Sorvall Biofuge *primo R* por 5 min. a 4° C; la pastilla se resuspendió en 20 ml de solución de CaCl₂ 1 mM, se incubó por 5 min. en hielo y se centrifugó a 7000 rpm durante 5 min. a 4° C. Finalmente, la pastilla se resuspendió en 4 ml de solución de CaCl₂ 1 mM. Las células se utilizaron inmediatamente.

8.2. Transformación de células competentes mediante choque térmico.

100 µl de bacterias *E. coli* BL21 (DE3) pLysS competentes se transformaron con 1 µg del plásmido pGEX-6P-*Ehcaf1*. Se incubaron por 30 min. en hielo y después por 90 seg. a 42° C en un termobloque. Las células se pasaron inmediatamente a hielo en donde permanecieron 3 min. Después, se agregaron 200 µl de medio LB y las bacterias se incubaron por 1 h. a 37° C en agitación a 225 rpm. Por último, la mezcla se espatuló sobre cajas Petri con

medio LB sólido con 100 µg/ml de ampicilina y 34 µg/ml de cloranfenicol. Las cajas se incubaron a 37° C durante toda la noche.

8.3. Expresión de la proteína recombinante rEhCAF1-GST.

Se transformaron bacterias *E. coli* BL21 (DE3) pLysS competentes con 1 µg de la construcción pGEX-6P-*Ehcaf1*, se espatularon en placas de LB sólido con ampicilina 100 µg/ml y cloranfenicol 34 µg/ml y se incubaron durante toda la noche a 37° C. Al día siguiente, se inoculó una colonia en 100 ml de medio LB con ampicilina 100 µg/ml y cloranfenicol 34 µg/ml a 37° C en agitación a 225 rpm hasta alcanzar una D.O. a 600 nm entre 0.4 y 0.6. En este momento se tomó una muestra de bacterias correspondiente al tiempo 0. Posteriormente, se agregó isopropil-β-D-tiogalactósido (IPTG) a una concentración final de 1 mM y se dejó el cultivo crecer durante 3 y 6 h. adicionales a 37° C. Se cosecharon las bacterias a 7000 rpm durante 5 min. y la pastilla se guardó a -20° C hasta su uso.

8.4. Cuantificación de proteínas por el método de Bradford.

Para determinar la cantidad de proteínas obtenidas se siguió el método de cuantificación descrito por Bradford (Ausubel y col., 1994). Para esto, se realizó una curva patrón de la siguiente manera. En tubos Eppendorf de 1.5 ml de volumen se colocaron 0, 5, 10, 15 y 20 µl correspondiente a 0, 2.5, 5, 7.5 y 10 µg, respectivamente de albúmina sérica de bovino (BSA) (New England Biolabs). A cada tubo se le agregó la cantidad necesaria de NaCl 150 mM para tener un volumen final de 100 µl. Luego se agregó 1 ml del reactivo de Bradford (100 mg de azul de Coomassie G-50, 50 ml de etanol al 95%, 100 ml de ácido

fosfórico al 85%). Los tubos se agitaron vigorosamente y se incubaron 3 min. a temperatura ambiente. Después, se determinó la absorbancia de las muestras al medirlas a una longitud de onda de 595 nm, en la región visible del campo electromagnético, utilizando un espectrofotómetro automático (Biomate 3 Thermo Spectronic). Los datos obtenidos se graficaron realizando una regresión lineal, obteniendo así los valores de la pendiente (m) y la ordenada al origen (b). Para medir la concentración de las proteínas de interés, se tomaron alícuotas de 5 μ l de cada muestra y se siguió el mismo procedimiento. Los datos obtenidos se interpolaron empleando los valores de m y b en la curva patrón, determinando así las cantidades exactas de proteínas en cada muestra.

8.5. Electroforesis en geles de poliacrilamida no nativos.

Se colocó un volumen de muestra correspondiente a 50 μ g de proteínas en un tubo Eppendorf de 1.5 ml y se les adicionó un volumen igual de solución amortiguadora de muestra Laemmli 2X (125 mM de Tris-HCl pH 6.8, dodecil sulfato de sodio al 4% y glicerol al 20%), posteriormente se le agregó 14 μ l/ml del agente reductor, β -mercaptoetanol al 5%. Las mezclas se hirvieron por 5 min. en baño María y se colocaron en hielo hasta el momento de cargarse en el gel. Las proteínas se resolvieron electroforéticamente mediante SDS-PAGE al 10%. Para preparar los geles se empleó el sistema de Bio-Rad (Mini-Protean II System). Todas las soluciones fueron preparadas en agua destilada estéril y filtradas a través de una membrana de 0.45 μ m (Millipore). La solución de monómero contiene acrilamida al 29.2% (Bio-Rad), bis-N, N' metilen-bis-acrilamida 0.8% (Bio-Rad); solución amortiguadora de corrida que contiene Tris (Sigma) 1.5 M, pH 8.8 ajustado con HCl. La solución amortiguadora

concentradora, contiene Tris 0.5 M, pH 6.8 ajustado con HCl; SDS al 10%; persulfato de amonio (Bio-Rad) al 10% y como catalizador TEMED (Bio-Rad). Se prepararon dos geles, uno separador y otro concentrador. El gel separador se preparó con acrilamida al 10%, bis acrilamida 1.08%; Tris-HCl 375 mM pH 8.8, SDS 0.1%, persulfato de amonio 0.05% y TEMED al 0.003%. El gel concentrador se preparó con acrilamida al 4%, bis 0.01%; Tris-HCl 125 mM pH 6.8, SDS 0.1%, persulfato de amonio 0.05% y TEMED al 0.005%. Tanto el persulfato de amonio como el TEMED se añadieron a la solución de los geles inmediatamente antes de vaciarla a los moldes. Los geles se prepararon en moldes de vidrio de 10 x 8.2 cm, con separadores de 1.5 mm. de espesor. Una vez armado el molde y sellado, se vaciaron 10 ml de la solución del gel separador; después se adicionaron 2 ml de agua para aplanar el gel. Cuando el gel polimerizó ($\approx$ 20 min.) se retiró el agua y se agregó en el espacio restante del molde la solución del gel concentrador e inmediatamente se colocó el peine, formador de pozos en los cuales se inyectaron las muestras y se dejó polimerizar por 20 min. adicionales. Después, el gel se montó en la cámara de electroforesis (Bio-Rad) y se le agregó solución amortiguadora de corrida 1X preparada con 25 mM Tris, glicina 192 mM y SDS al 0.1%. A las muestras de proteínas se les adicionó buffer de muestra para proteínas a una concentración final 1X. En cada pozo se colocaron las alícuotas correspondientes y los geles se corrieron durante 2 h 30 min. a 100 V.

8.6. Tinción de los geles de poliacrilamida con azul de Coomasie.

Para visualizar las proteínas separadas por electroforesis en los geles de poliacrilamida, estos se tiñeron durante 20 min. en una solución que contenía

azul de Coomassie R-250 al 0.25% (BioRad) preparado en metanol al 45% y ácido acético al 10%. Después del tiempo de tinción y para poder observar claramente las bandas de proteínas, el gel se contrastó con una solución desteñidora (metanol al 30% y ácido acético al 10%) durante toda la noche en agitación ligera. Como marcadores de peso molecular se utilizaron los marcadores preteñidos Precision Plus Protein Standards Dual color (BioRad) del rango entre 10-250 kDa.

8.7. Transferencia de proteínas a membranas de nitrocelulosa.

Las proteínas separadas por SDS-PAGE al 10%, se transfirieron a membranas de nitrocelulosa (Supported nitrocelulose-1, Gibco, BRL). Los geles, las membranas de nitrocelulosa y los papeles Whatman se preincubaron por 5 min en solución de transferencia de proteínas (20% metanol, 10% Tris-Glicina). Posteriormente, se armó y conectó la cámara de transferencia para permitir a las proteínas migrar del polo negativo al positivo, de esta manera pasan del gel de poliacrilamida a la membrana de nitrocelulosa. Una vez armado el dispositivo la cámara de electrotransferencia se llenó con solución de transferencia de proteínas y se corrió a 400 mA por 45 min. a 4° C. Por último, la presencia de las proteínas en la membrana se confirmó por tinción con rojo Ponceau (100 mg/ml). Después las membranas se lavaron con agua bidestilada para retirar el colorante y se realizaron los ensayos de Western blot.

8.8. Ensayos de Western blot.

Una vez transferidas las proteínas a las membranas, éstas se incubaron durante 2 h. en solución bloqueadora con 5% de leche descremada en PBS 1X.

Posteriormente, se agregó el anticuerpo primario anti-GST (Amersham) en una dilución 1:10000 en PBS 1X y 2% de leche descremada por 2 h. a temperatura ambiente en agitación constante. Después las membranas se lavaron tres veces con PBS-Tween 20 al 0.05% y se les agregó el anticuerpo secundario anti-IgG de cabra acoplado a peroxidasa (eBioscience) en una dilución 1:6000 en PBS 1X y leche descremada al 2% por 1 h. a temperatura ambiente en agitación. Por último, las membranas se lavaron tres veces con PBS-Tween 20 al 0.05% y se revelaron por quimioluminiscencia con el reactivo ECL plus (Amersham Pharmacia Biotech) utilizando placas de autoradiografía (Kodak).

8.9. Análisis de la solubilidad de la proteína recombinante rEhCAF1-GST.

Se cosecharon las bacterias BL21(DE3)pLysS correspondientes a una inducción de 3 h. a 7000rpm durante 5 min. La pastilla se resuspendió en 5 ml de PBS pH 7.4 y se adicionó lisozima en una concentración de 1 mg/ml. La muestra se sonicó a 60 % de amplitud con pulsos de 10 seg con descansos de 10 seg. en un sonicador automático (Ultrasonic Processor). Posteriormente, la muestra se centrifugo a 8000 rpm durante 45 min. a 4° C en una centrifuga Sorvall Biofuge *primo R* para separar y recuperar las proteínas solubles en el sobrenadante. Las proteínas insolubles permanecieron en los cuerpos de inclusión que quedaron en la pastilla la cuál se resuspendió en PBS pH 7.4. Una vez obtenidas las muestras se procedió a analizarlas mediante SDS-PAGE al 10% y por ensayos de Western blot utilizando como anticuerpo primario el anti-GST y como secundario el anticuerpo anti-IgG de cabra acoplado a peroxidasa como se describió previamente.

8.10. Solubilización de la proteína recombinante rEhCAF1-GST.

Para purificar la proteína recombinante rEhCAF1-GST que se encontraba en los cuerpos de inclusión, implementamos un protocolo de solubilización de la proteínas fusionadas a GST con la adición de sarcosil al 1.5% (Frangioni *et al*, 1993). Las bacterias inducidas durante 3 h., se cosecharon por centrifugación a 7000 rpm durante 5 min., se eliminó el sobrenadante y la pastilla obtenida se resuspendió en 5 ml de PBS pH 7.4. Se adicionó lisozima en una concentración de 1 mg/ml y se incubó en hielo durante 15 min. Pasado este tiempo se adicionó DTT a una concentración de 5 mM y sarcosil al 1.5%. Posteriormente, la muestra se sonicó a 60 % de amplitud con pulsos de 10 seg. con descanso de 10 seg. en un sonicador automático (Ultrasonic Processor). Pasado este tiempo, la muestra se centrifugó a 8000 rpm durante 45 min. a 4° C en una centrifuga Sorvall Biofuge *primo R*. Se recuperaron las fracciones solubles e insolubles y se resolvieron mediante SDS-PAGE al 10% para analizar la solubilidad de la proteína recombinante rEhCAF1-GST en ambas fracciones por ensayos de Western blot utilizando como anticuerpo primario el anti-GST y como secundario el anticuerpo anti-IgG de cabra acoplado a peroxidasa como se describió previamente.

8.11. Purificación de la proteína recombinante rEhCAF1-GST.

La proteína recombinante rEhCAF1-GST se purificó de acuerdo al protocolo en *batch* descrito en el manual de la resina Glutathione Sepharose High Performance (Amersham). La fracción soluble obtenida después de una inducción de 3 h. y solubilizada con sarcosil, se incubó durante 1 h. a 4° C con

la resina de glutation sefarosa previamente activada con la adición de PBS 1X pH 7.4 con agitación constante y suave. Posteriormente, la sefarosa fue empaquetada en una jeringa de 1 ml con un tapón de fibra de vidrio y se hizo pasar el sobrenadante en tres ocasiones. Luego se realizaron 3 lavados con PBS 1X pH 7.4 frío para eliminar las proteínas de bacteria unidas de manera inespecífica a la resina de glutation sefarosa y por último la proteína recombinante se eluyó con el amortiguador de elusión (HEPES 175 mM, NaCl 150 mM, glutation reducido 15 mM, DTT 5 mM y tritón al 0.1%) con pH 7.4, recuperando 3 fracciones de elusión. Para confirmar la identidad de la proteína recombinante purificada las fracciones fueron analizadas mediante SDS-PAGE al 10% y mediante ensayos de Western blot utilizando el anticuerpo primario anti-GST y como secundario anti-IgG de cabra acoplado a peroxidasa como se describió previamente.

9. Análisis de la interacción de la proteína recombinante rEhCAF1-GST con RNA.

9.1. Amplificación del templado de DNA de 284 pb mediante PCR.

El fragmento de DNA de 284 pb correspondiente la región 3'UTR del gen *EhPgp5* se amplificó por PCR a partir del plásmido 5'Pgp1-CAT-3'Pgp5, el cual contiene 100 pb de la región 3' del marco de lectura abierto del gen *EhPgp5* y 700 pb de la secuencia 3'UTR (López-Camarillo *et al*, 2003). Se utilizó el par de oligonucleótidos en sentido: 5'-GCGTAATACGACTC ACTATAGGGATTATACACTTGCTATGC-3' y antisentido, 5'-AAACTGATTAT ATAATTAT-3'. Amplificamos un fragmento de DNA que corresponde a las ultimas 100 pb de la región codificante del gen *EhPgp5* mas 180 de la región

3'UTR. El fragmento se amplificó por PCR en un volumen de 50 μ l que contenía la siguiente mezcla: amortiguador de PCR 1X (Tris-HCL 20 mM pH 8.4, KCl 50 mM); $MgCl_2$ 4 mM; dATP, dCTP, dGTP y dTTP a 10 mM cada uno de ellos (Invitrogen), 1.2 U de enzima *Taq* DNA polimerasa, 100 ng de cada uno de los oligonucleótidos y 50 ng del DNA plasmídico. Las reacciones de PCR se llevaron a cabo en el termociclador PX2 Thermal Cycler (Thermo Electrón Corporation) bajo las siguientes condiciones experimentales: 5 min. a 94° C para la desnaturalización del DNA y posteriormente 30 ciclos de polimerización y extensión (35 seg. a 94° C, 45 seg. a 52° C, 45 seg. a 72° C), seguidos de una extensión final de 7 min. a 94° C y una ultima rampa a 4° C por tiempo indefinido. (López-Camarillo *et al*, 2003). Los productos de PCR se resolvieron en un gel de agarosa al 1% en TAE 1X y se purificó el fragmento de DNA mediante el uso del kit GenClean II, de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

9.2. Transcripción *in vitro* de la sonda de RNA de 284pb.

La síntesis de RNA se realizó empleando el kit de transcripción *in vitro* RiboprobeTM RNA Production System-T7 (Promega). Las reacciones se realizaron en un volumen final de 20 μ l, con 1 μ g de DNA templado previamente purificado, 0.5 mM de cada una de los ribonucleótidos rCTP, rGTP, rUTP y α -³²P[rATP], 10 U de inhibidor de ribonucleasas y 20 U de RNA polimerasa T7 (Promega). Las mezclas se incubaron durante 1h 30 min. a 42°C. Posteriormente, se adicionó 1 U de DNasa I libre de RNasas para eliminar el templado de DNA y se incubó durante 15 min. a 37° C. Por último se inactivó la DNasa con calor incubando por 10 min. a 65° C. Para la purificación

la reacción de marcaje se pasó a través de una columna de Sephadex G-50 previamente equilibrada con TE (Tris-EDTA). La columna se preparó en una jeringa de plástico de 1 ml con un tapón de fibra de vidrio en el fondo. La columna se empacó con Sephadex G-50 y se lavó por centrifugación en una centrífuga clínica (Head-Safety Centrifuge) durante 2 min. Inmediatamente, después de pasar la reacción de marcaje en la columna se centrifugó por 2 min., para recolectar el RNA marcado el cual se cuantificó en un contador de centelleo (Beckman) y se almacenó a -20° C hasta su uso.

9.3. Ensayo de retardamiento de la movilidad electroforética.

Para analizar la interacción de la proteína rEhCAF1-GST con el RNA, realizamos los ensayos de retardamiento de la movilidad electroforética (EMSA). El experimento se llevó a cabo en un volumen final de 20 µl en un amortiguador de unión (HEPES 10 mM, KCl 40 mM, DTT 1 mM, MgCl₂ 4 mM, espermidina 4 mM y glicerol 5%) en presencia de 10 µg de la proteína rEhCAF1-GST nativa. Las reacciones se iniciaron con la adición de la sonda radioactiva (10000 cpm) a los tubos previamente preparados se incubaron durante 15 min. 4° C. Como control se sustituyó la proteína rEhCAF1-GST por la fracción purificada de la proteína GST. También se realizaron competencias específicas e inespecíficas mediante la adición de la sonda fría y RNA de transferencia en un exceso de 50X veces, respectivamente. Finalmente, los complejos RNA-proteína se resolvieron en geles no desnaturizantes de poliacrilamida al 6% para DNA, los cuales fueron secados en vacío a 80° C y expuestos a una pantalla sensible a radiactividad. Los complejos formados se visualizaron en un Phosphor Imager (BioRad).

IV. RESULTADOS.

1. Identificación y análisis *in silico* de las posibles poli(A) ribonucleasas de *E. histolytica*.

Mediante las búsquedas en las bases de datos del genoma de *E. histolytica* encontramos tres diferentes genes que codifican para posibles poli(A) ribonucleasas los cuales denominamos como *Ehcaf1*, *Ehcaf1-like* y *Ehccr4* en base a sus homólogos en otros organismos. No encontramos genes homólogos a PAN2, PAN3 y PARN. De acuerdo a estos resultados podemos concluir que *E. histolytica* presenta una pequeña familia de genes que codifican para posibles desadenilasas, las cuales poseen diversos grados de homología e identidad con sus proteínas homólogas en levadura y en humano (Tabla 3).

Los tres genes identificados carecen de intrones y codifican para proteínas altamente conservadas. El gen *Ehcaf1* contiene 933 pb que codifican para una proteína de 311 aminoácidos, con un peso molecular predicho de 35.6 kDa. El gen *Ehcaf1-like* consta de 912 pb y codifica para una proteína de 303 aminoácidos con un peso molecular 34.7 kDa. Por último, el gen *Ehccr4* consta de 1527 pb y codifica para una proteína predicha de 508 aminoácidos con un peso molecular de 56.3 kDa. De manera interesante, las proteínas EhCAF1 y EhCAF1-like son muy parecidas (Fig. 8) y comparten el 79% de identidad y el 87% de homología en su secuencia de aminoácidos. Para corroborar que estas proteínas parálogas son codificadas por genes diferentes, procedimos a determinar su localización en el genoma de *E. histolytica*. Los resultados muestran que el gen *Ehcaf1* se localizó en el *scaffold* 000108 (Fig. 9) y adyacente a el se encontraron genes que codifican para proteínas homólogas al factor 3b de *splicing* y una proteína de unión al RNA.

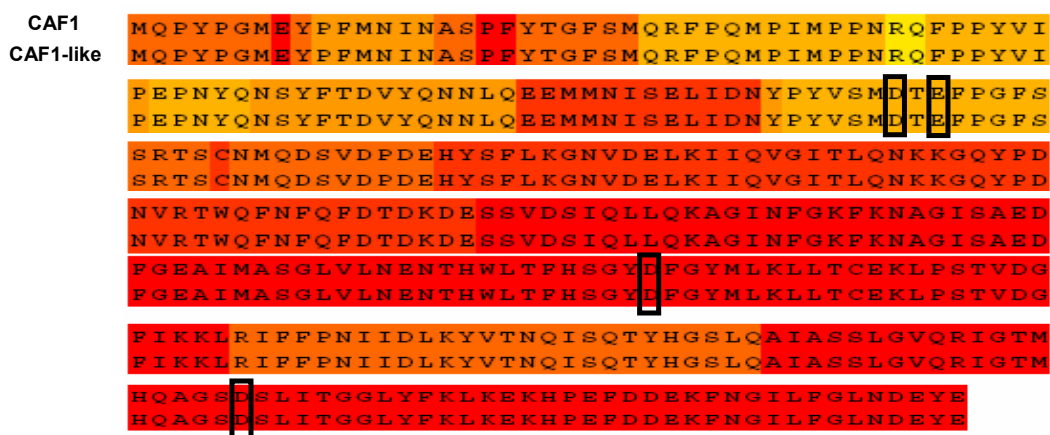


Figura 8. Representación esquemática de las regiones conservadas de las proteínas EhCAF1 y EhCAF1-like. Los rectángulos en color negro indican los residuos DEDD importantes del sitio catalítico de la familia de RNAsa D presentes en las desadenilasas.

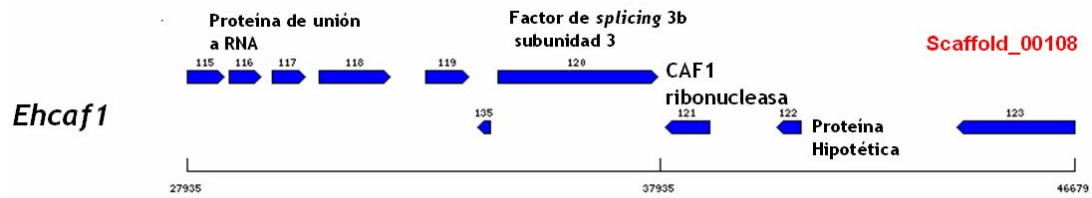


Figura 9. Localización del gen *Ehcaf1* en el genoma de *E. histolytica* en el *scaffold* 000108. Adyacente a el se encuentran genes que codifican para proteínas que potencialmente participan en *splicing* y en la unión al RNA.

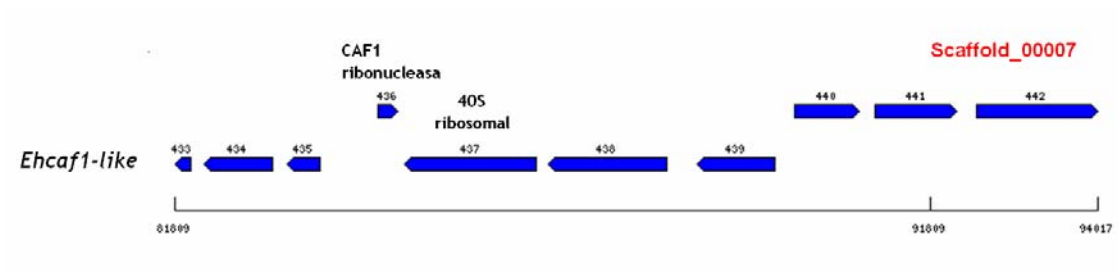


Figura 10. Localización del gen *Ehcaf1-like* en el genoma de *E. histolytica* en el *scaffold* 00007. Adyacente a él se pueden identificar genes que codifican para una proteína ribosomal y una translocasa SEC61.

Por otra parte, el gen *Ehcaf1-like* se ubicó en el *scaffold* 00007 (Fig. 10) y adyacente a él se pueden identificar genes que codifican para una proteína ribosomal y una translocasa SEC61. Estos resultados corroboraron que *Ehcaf1* y *Ehcaf1-like* son genes únicos dado que difieren en su ubicación en el genoma de *E. histolytica*. Es probable que estos genes hayan surgido por duplicación génica, además de que el hecho de que contengan un alto grado de homología a nivel de aminoácidos sugiere la existencia de redundancia génica en este parásito.

Posteriormente, realizamos un alineamiento múltiple con las secuencias de aminoácidos de las proteínas EhCAF1, EhCAF1-like, HsCAF1, HsCALIF y ScPOP2 para conocer si las proteínas de amiba comparten similitudes con sus homólogos en humano y levadura. De manera general, observamos que existe una conservación a lo largo de las secuencias de aminoácidos de las desadenilasas alineadas. Estas proteínas poseen tres residuos de aspartato (D) y un glutamato (E) característicos del dominio de RNasa D de las proteínas de la superfamilia de exoribonucleasas DEDD, a excepción de la proteína POP2 de levadura que carece de dos residuos de aspartato que son reemplazados por serinas (Fig. 11). Adicionalmente, el análisis con los programas Pfam, Prosite y ProScan permitieron identificar el dominio de RNasa D en las proteínas EhCAF1 y EhCAF1-like que se ubicó entre los aminoácidos 56 al 286 (Fig. 12).

Posteriormente, se realizó un análisis filogenético para estudiar la evolución de las proteínas CAF1 en diferentes organismos (Fig. 13). Los resultados obtenidos sugieren que las proteínas EhCAF1 y EhCAF1-like derivan de un ancestro común y que divergieron de manera mas temprana en

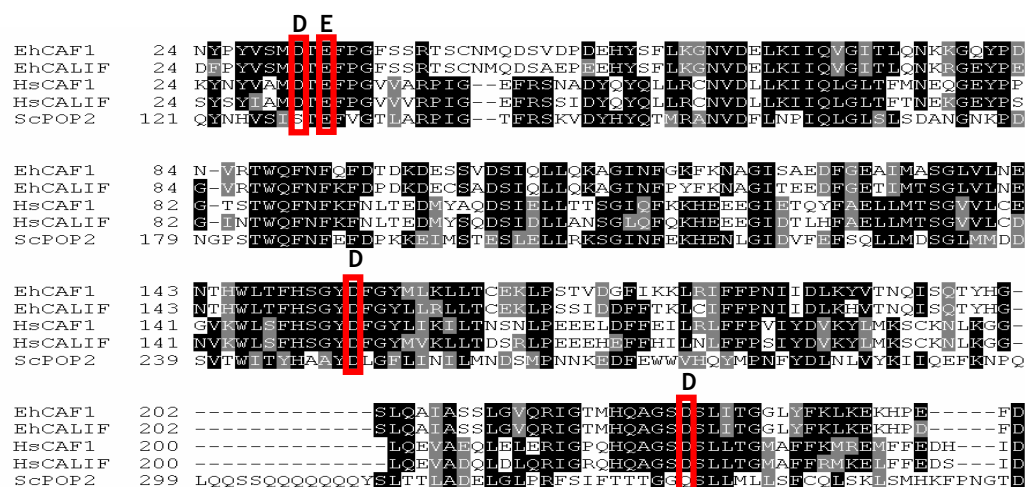


Figura 11. Representación esquemática de las regiones conservadas en las proteínas EhCAF1 y EhCAF1-like, CAF1 y POP2. Los rectángulos en color rojo indican los residuos DEDD del sitio catalítico característicos de la familia de RNasa D. En cajas sombreadas se muestran los aminoácidos idénticos entre la CAF1 y CAF1-like de *E. histolytica* y dos o tres de las secuencias homologas.

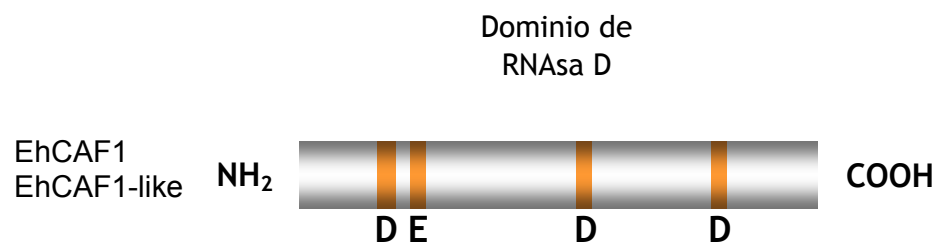


Figura 12. Estructura de los dominios de las proteínas EhCAF1 y EhCAF1-like predichos con los programas Pfam e InterProScan, donde se identifican a los cuatro aminoácidos DEDD característicos del dominio de RNAsa D.

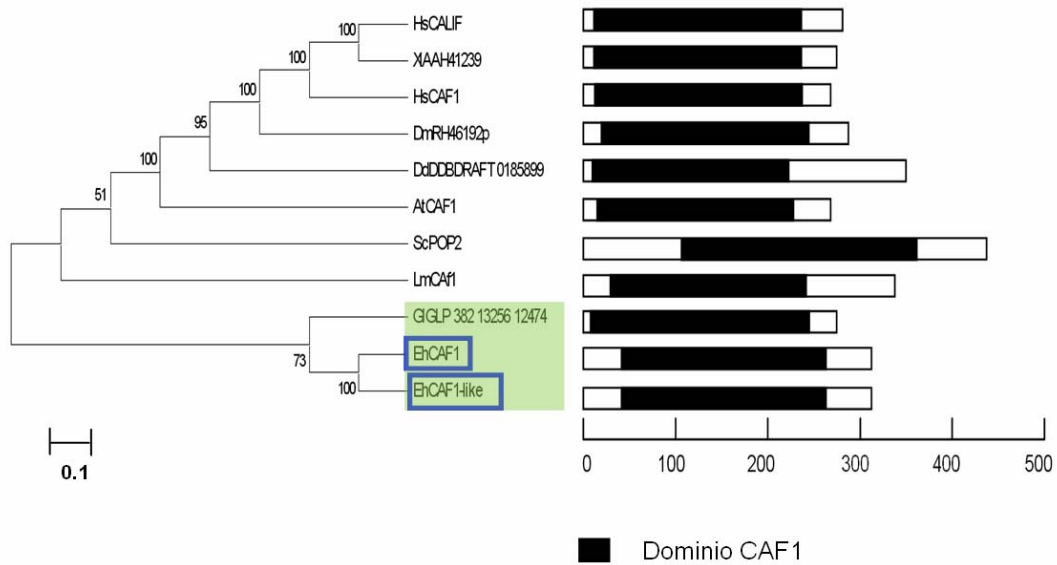


Figura 13. Análisis filogenético de las proteínas CAF1 en diferentes organismos. El árbol sin raíz de las proteínas CAF1 se obtuvo con el programa MEGA versión 3.1 utilizando las secuencias proteicas completas. Esquematización y comparación del dominio CAF1 identificado en las diferentes proteínas

comparación con sus homólogos de mamíferos y plantas. Ambas proteínas se encuentran agrupadas en un *cluster* donde también se puede encontrar la proteína homóloga a CAF1 del parásito *Giardia lamblia*.

Para la predicción de la estructura terciaria de las proteínas EhCAF1 y EhCAF1-like se utilizó como templatado la estructura terciaria del cristal del dominio DEDD de la proteína POP2 de levadura (Fig. 14). Los resultados muestran que las proteínas de *E. histolytica* poseen una conformación estructural semejante entre si y con respecto a POP2 de levadura. Después realizamos un análisis mas detallado del dominio de RNasa D de EhCAF1 y EhCAF1-like y encontramos que a pesar de que en la estructura primaria, los aminoácidos que conforman el dominio DEDD se encuentran alejados, al plegarse la estructura de las proteínas se acercan para ubicarse muy cercanos entre si lo cual permite la formación de una concavidad donde interacciona el RNA en el dominio catalítico (Fig. 15). Por otra parte, realizamos un análisis de los dominios presentes en las proteínas CCR4 de humano y levadura y los comparamos con los de EhCCR4. Observamos que las tres proteínas poseen el dominio LRR en la región central (Fig. 16). Sin embargo, la proteína de ameba carece del dominio de exonucleasa tipo Exo III y, al igual que la proteína CCR4 de humano, carece de los dominios de transactivación ubicados en la región carboxilo terminal de la proteína CCR4 de levadura. (Fig. 16A). Posteriormente, realizamos un análisis de los LRR y encontramos que esta región en la proteína EhCCR4 de ameba contiene la secuencia consenso descrita en sus homólogos de levadura y humano. Dicha secuencia contiene un patrón de aminoácidos conservados como son las prolinas (P), leucinas (L) y asparaginas (N) en posiciones específicas (Fig. 16B).

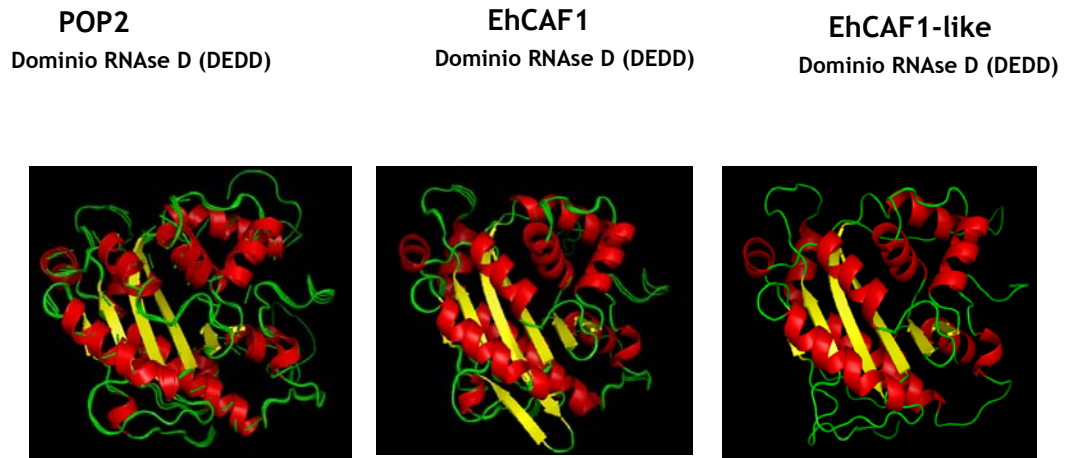


Figura 14. Estructura terciaria y conformación del dominio de RNasa D de las proteínas POP2, EhCAF1 y EhCAF1-like, donde se puede observar que comparten una conformación estructural en 3 dimensiones muy similar.

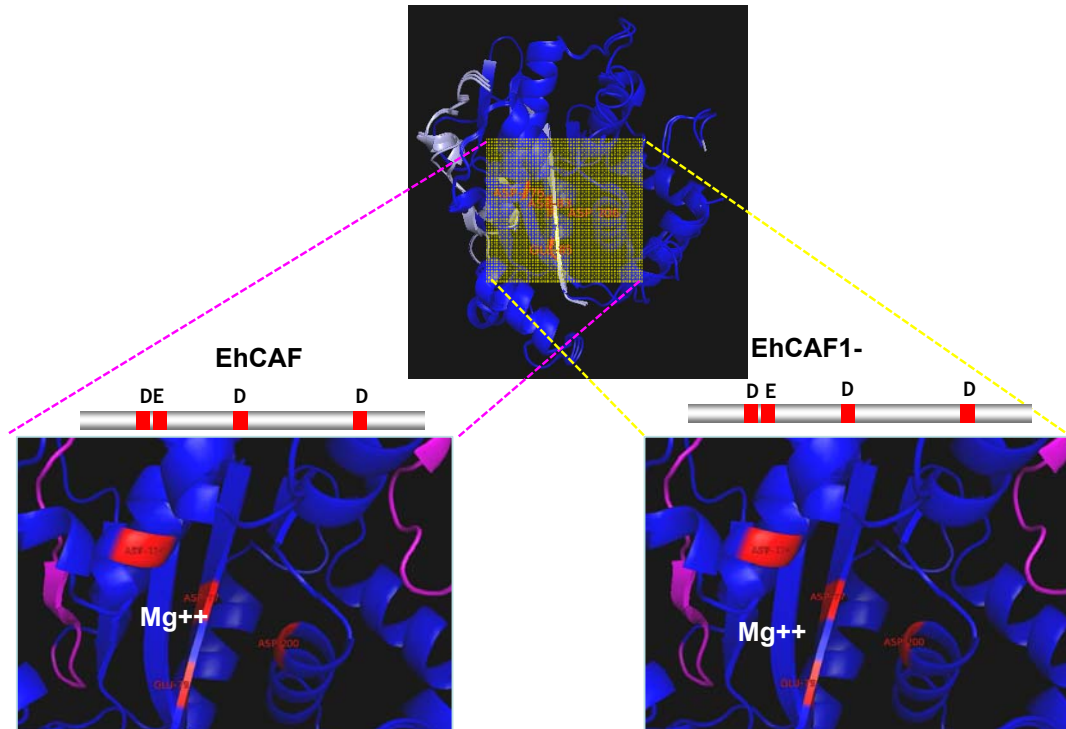


Figura 15. Localización del sitio catalítico DEDD de RNAsa D en la estructura terciaria de EhCAF1 y EhCAF1-like. Se muestra la presencia de un átomo de Mg^{++} el cual está involucrado en la activación de la función catalítica de las desadenilasas.

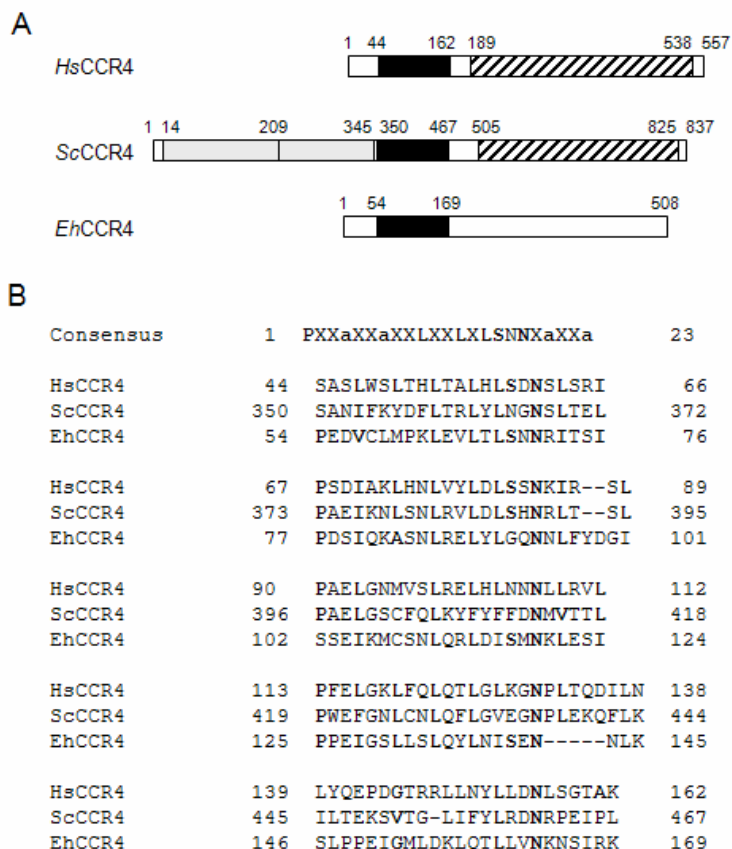


Figura 16. Representación esquemática de los dominios presentes en las proteínas CCR4. (A) Comparación de la estructura molecular de EhCCR4 con la de levadura y humano. Las tres proteínas poseen el dominio LRR en la región central. La proteína CCR4 de *E. histolytica* (Eh) carece del dominio de exonucleasa tipo Exo III y, al igual que la proteína CCR4 de humano (Hs), carece de los dominios de transactivación ubicados en la región carboxilo terminal de la proteína CCR4 de levadura (Sc). (B) Alineamiento de los repetidos ricos en leucina (LRR) de las proteínas CCR4 de humano, levadura y ameba. La proteína EhCCR4 contiene la secuencia consenso descrita en sus homólogos.

2. Análisis de la expresión de RNAm de los genes que codifican las poli(A) ribonucleasas de *E. histolytica* en respuesta al daño del DNA.

Con la finalidad de iniciar el estudio de las poli(A) ribonucleasas de *E. histolytica*, analizamos la expresión del mRNA de los genes en respuesta al daño del DNA, debido a que se ha reportado que los genes POP2 y CCR4 de levadura participan en la respuesta al daño genotóxico. Primero, se realizó el diseño de los oligonucleótidos que nos permitieran amplificar específicamente regiones internas de los genes *Ehcaf1*, *Ehcaf1-like*, *Ehccr4* y *actina*. Posteriormente, amplificamos estas regiones utilizando como templado DNA genómico de la clona A tal como se especifica en materiales y métodos. Los productos de PCR se analizaron mediante electroforesis en geles de agarosa al 1%, observándose la amplificación de las bandas del tamaño esperado que fueron de 594 pb para el gen *Ehcaf1*, 556 pb para *Ehcaf1-like* y 626 pb para *Ehccr4* (Fig. 17). Una vez estandarizadas las condiciones de amplificación por PCR para cada uno de los genes, procedimos a montar un modelo experimental que nos permitiera evaluar fácilmente cambios en la expresión de los genes *Ehcaf1*, *Ehcaf1-like* y *Ehccr4*. Elegimos el modelo de choque térmico a 42° C previamente reportado (Weber y col, 2006), en el cual se han analizado los cambios en la expresión global de genes mediante microarreglos. En este modelo se reportó una disminución masiva en la expresión de muchos genes, por lo que nos podría ser útil para estandarizar los ensayos de RT-PCR para nuestros genes de interés. Se extrajo el RNA total de los trofozoítos y se realizó la amplificación por RT-PCR. En el panel A de la figura 18, se muestra un gel de agarosa al 1% donde se observa la calidad del RNA total extraído de

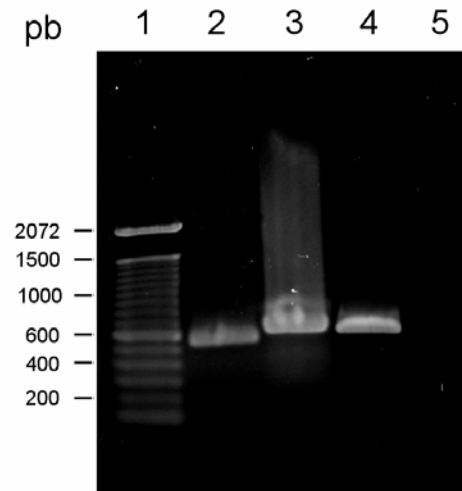


Figura 17. Amplificación de regiones internas de los genes *Ehcaf1*, *Ehcaf1-like* y *Ehccr4*. Carril 1 marcador de tamaño molecular 100 pb DNA ladder, carril 2 fragmento de 556 pb del gen *Ehcaf1*, carril 3 fragmento de 624 pb del gen *Ehcaf1-like*, carril 4, fragmento de 594 pb del gen *Ehccr4* y carril 5, control negativo de la PCR.

las células crecidas a 37°C y sometidas al choque térmico. En el panel B se muestran las condiciones de amplificación por PCR. Los productos de RT_PCR fueron resueltos mediante PAGE al 12% y teñidos con bromuro de etidio. El análisis densitométrico de las bandas obtenidas muestra que el gen *Ehcaf1* no cambió su expresión después del tratamiento. De manera interesante, los genes *Ehcaf1-like* y *Ehccr4* disminuyeron su expresión 4 y 3 veces respectivamente, en comparación con las células no sometidas al choque térmico (Fig. 18, paneles C y D). El control de *actina* no varió significativamente su expresión después del choque térmico a 42°C.

Posteriormente, analizamos el perfil de expresión de los genes *Ehcaf1*, *Ehcaf1-like*, *Ehccr4* y *actina* en respuesta al daño del DNA inducido por irradiación con luz UV-C. La inducción de rupturas de la doble cadena del DNA mediante la irradiación con luz UV-C en estos experimentos ha sido previamente demostrada mediante ensayos de TUNEL (Lopez Casamichana *et al.*, enviado). En la figura 19, se muestran los resultados obtenidos para la amplificación de los cuatro genes mediante RT-PCR. En el panel A, se muestra un gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio donde se observa la calidad del RNA total extraído de las células sometidas a la irradiación con UV-C y las no tratadas. En el panel B se muestran las condiciones de amplificación por PCR para cada uno de los genes. Los productos de RT-PCR fueron resueltos mediante PAGE al 12% y teñidos con bromuro de etidio. El análisis densitométrico de los productos de RT-PCR muestra que el gen *Ehcaf1* no cambió significativamente su expresión después de la irradiación. Por el contrario, el gen *Ehcaf1-like* disminuyó su expresión 4 veces a los tiempos de 30 min. y 3 h, después de la irradiación con luz UV-C en comparación con

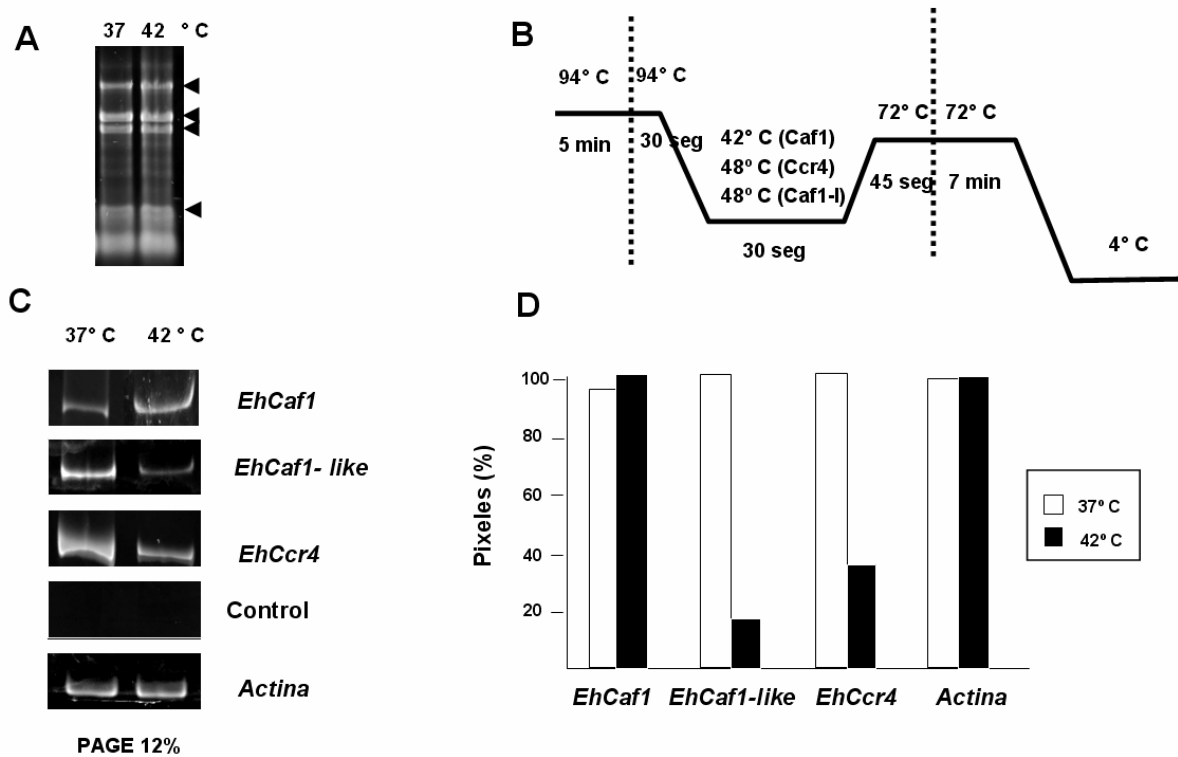


Figura 18. Análisis de la expresión de los genes *Ehcaf1*, *Ehcaf1-like*, *EhCCR4* y *actina* después del tratamiento por choque térmico. (A) Gel de agarosa al 1% en TBE 1X donde se observa la calidad del RNA total extraído de las células crecidas a 37°C y 42°C. (B) Condiciones de amplificación por PCR para cada uno de los genes. (C) Gel de poliacrilamida al 12% teñido con bromuro de etidio donde se muestran los productos de RT-PCR obtenidos a 37°C y 42°C para cada uno de los genes. (D) Análisis densitométrico de las bandas en C.

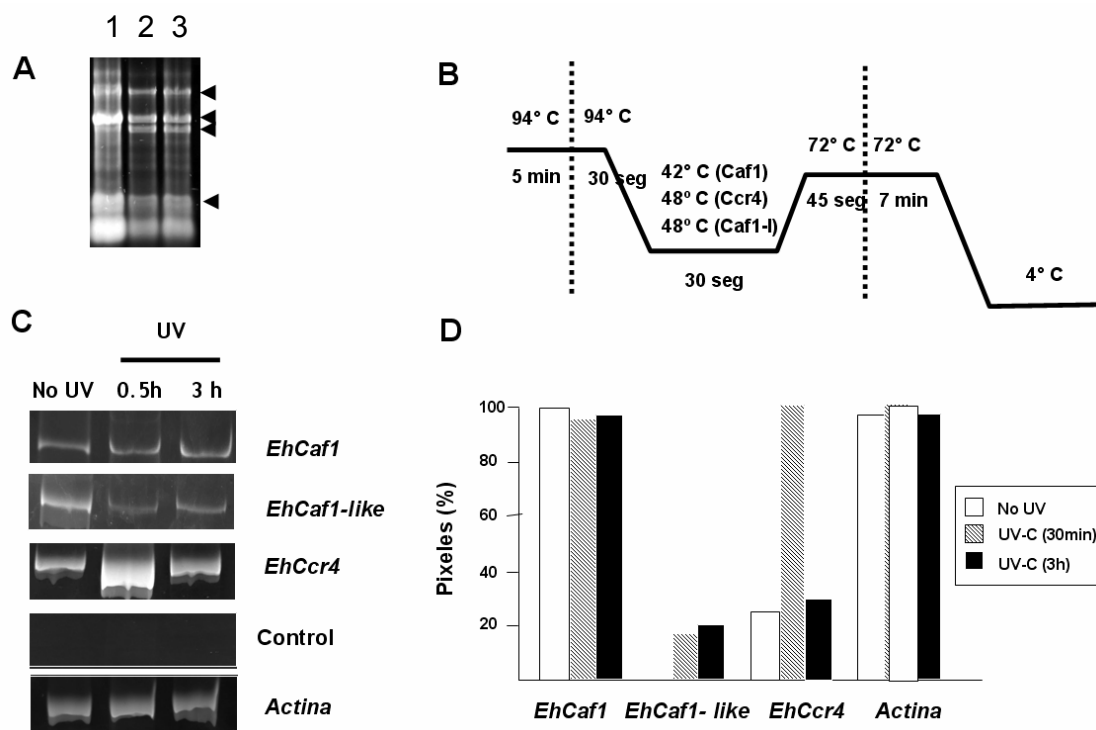


Figura 19. Análisis de la expresión de los genes *Ehcaf1*, *Ehcaf1-like*, *Ehccr4* y *actina* después de inducción de daño al DNA por irradiación UV-C. (A) Gel de agarosa al 1% donde se observa la calidad del RNA total extraído de las células no irradiadas (carril 1) y después de 30 min (carril 2) y 3 h (carril 3) de la irradiación con UV-C. (B) Condiciones de amplificación por PCR para cada uno de los genes. (C) Gel de poliacrilamida al 12% teñido con bromuro de etidio donde se muestran los productos de RT-PCR obtenidos en las condiciones descritas en A para cada uno de los genes. (D) Análisis densitométrico de las bandas en C.

las células sin tratamiento (Fig. 19, paneles C y D). De manera interesante, el gen *Ehccr4* aumentó su expresión hasta 5 veces a los 30 min. después de ser irradiadas y a las 3 h disminuyó gradualmente hasta alcanzar los niveles basales de expresión (Fig. 19, paneles C y D).

3. Clonación del gen *Ehcaf1* en el vector pGEX-6P-1.

Como ya se comentó previamente, el gen *Ehcaf1* ya había sido clonado en el vector de expresión pRESET-A. Sin embargo, en nuestras manos tuvimos dificultades para inducir la expresión de la proteína recombinante a partir de esta construcción, por lo que decidimos realizar la subclonación del gen *Ehcaf1* el vector de expresión pGEX-6P-1 (Fig. 20). Este vector posee un promotor inducible por análogos a la lactosa como el IPTG, lo cual nos permite expresar proteínas recombinantes fusionadas a la proteína glutatión-S-transferasa (GST). Primero amplificamos por PCR el gen *Ehcaf1* a partir del plásmido pRESET-*Ehcaf1* utilizando oligonucleótidos específicos, el cual se purificó y digirió con las enzimas *Bam*HI y *Xho*I. En el panel A de la figura 21, se muestra un gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio donde se resolvieron el vector pGEX-6P-1 y el gen *Ehcaf1* digeridos con *Bam*HI y *Xho*I los cuales se purificaron y utilizaron en la reacción de ligación. En el panel A de la figura 28, se muestra un candidato seleccionado producto de la ligación y digerido con las enzimas de restricción *Bam*HI y *Xho*I donde se observa la liberación del inserto de un tamaño de 933 pb correspondiente al gen *Ehcaf1*. Una vez seleccionada la clona positiva, se procedió a realizar la secuenciación automática. El electroferograma que corresponde a la secuencia del gen *Ehcaf1* muestra que este se encuentra en marco de lectura con la secuencia

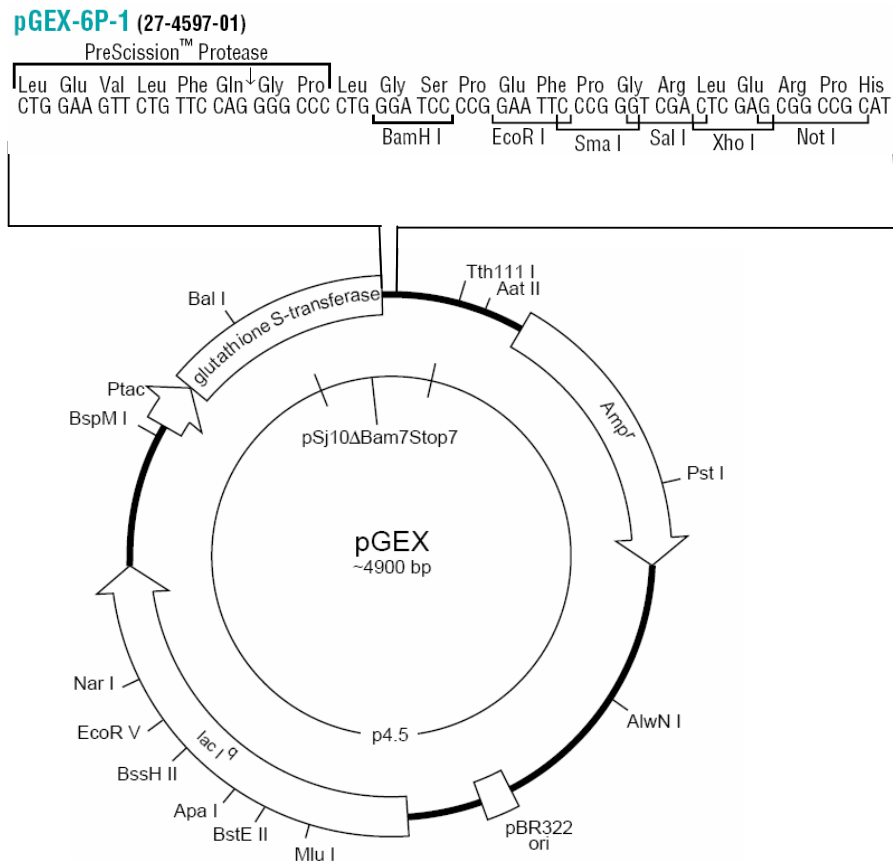


Figura 20. Mapa del plásmido pGEX-6P-1. El vector contiene un tamaño de aproximadamente 4900 pb, un sitio de clonación múltiple (MCS), un origen de replicación y el gen de resistencia a ampicilina. Este vector permite un alto nivel de expresión de proteína recombinante controlado por el promotor T7 inducible por IPTG.

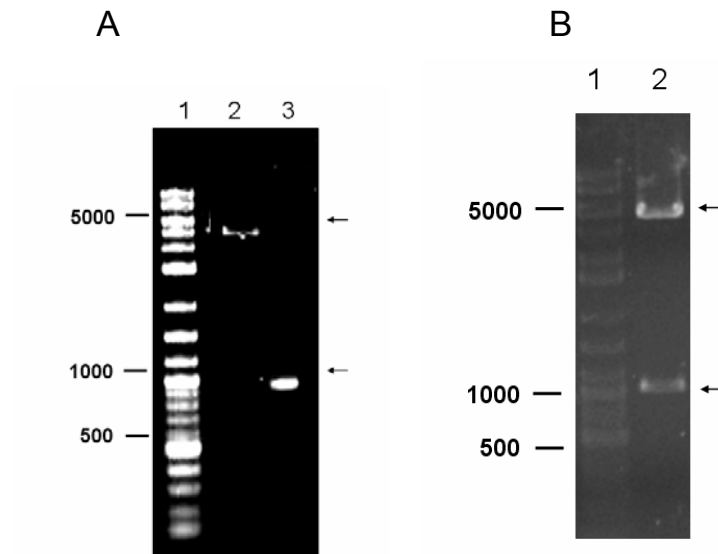


Figura 21. Subclonación de *Ehcaf1* en el vector de expresión pGEX-6P-1. (A) Gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio. Carril 1, vector pGEX-6P-1 (4900 pb) digerido con las enzimas *Bam*HI y *Xho*I. Carril 2, gen *Ehcaf1* (933 pb) digerido con *Bam*HI y *Xho*I. (B) Gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio donde se analizó el candidato seleccionado producto de la ligación de los productos en A y digerido con las enzimas *Bam*HI y *Xho*I donde se observa la liberación del inserto *Ehcaf1*.

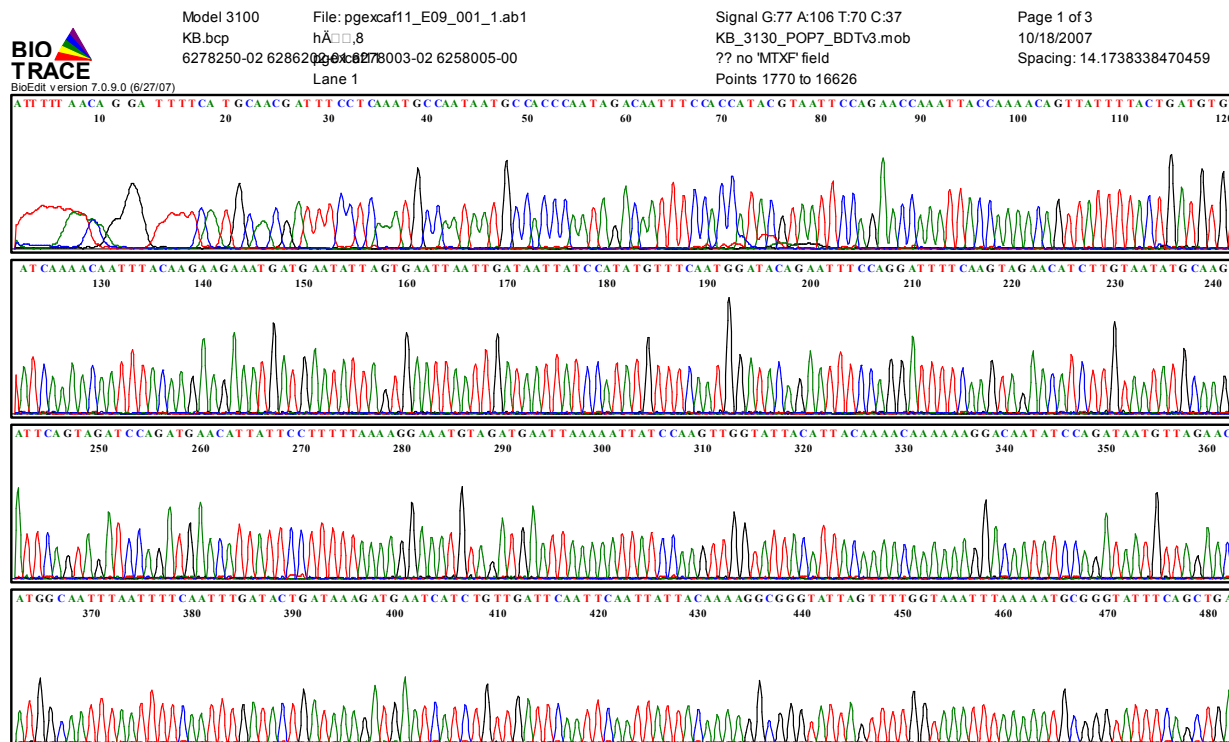


Figura 22. Electroferograma correspondiente a la secuencia del gen *Ehcaf1*.

del plásmido y que además no contiene mutaciones (Fig. 22). De esta manera se pudo confirmar que la secuencia del gen clonado es idéntica a la secuencia reportada en las base de datos TIGR y Pathema del genoma de *E. histolytica*.

4. Expresión y purificación de la proteína recombinante rEhCAF1-GST.

Para inducir la expresión de la proteína recombinante rEhCAF1-GST, se transformaron las células competentes de la cepa BL21(DE3)pLysS con el plásmido pGEX-6P-*Ehcaf1*. Una clona seleccionada de las placas de LB ampicilina se cultivo en medio LB ampicilina líquido, se le adicionó IPTG 1 mM y se creció durante 3 y 6 horas a 37° C, como se detalla en materiales y métodos. En la figura 23 se muestran las proteínas obtenidas a los diferentes tiempos de inducción (0, 3 y 6 h). En los carriles 2, 3 y 4 se muestran los extractos proteicos totales obtenidos de la inducción de las bacterias transformadas con el vector pGEX-GST sin inserto a las 0, 3 y 6 h, donde podemos observar la expresión de la proteína GST de 26 kDa en los tres tiempos analizados. En los carriles 5, 6 y 7 se muestran los extractos proteicos totales obtenidos de las bacterias transformadas con el vector pGEX-*Ehcaf1* e inducidas a las 0, 3 y 6 h, donde podemos observar la expresión de la proteína rEhCAF1-GST del peso esperado de 61.5 kDa después de 3 y 6 h de inducción.

Para corroborar la identidad de las proteínas inducidas se realizó un ensayo de Western blot utilizando un anticuerpo primario dirigido contra la proteína GST. En la figura 24, se muestran en los carriles 2, 3 y 4 los extractos proteicos totales obtenidos de las bacterias transformadas con el vector pGEX-GST e inducidas a las 0, 3 y 6 h, donde podemos observar el reconocimiento

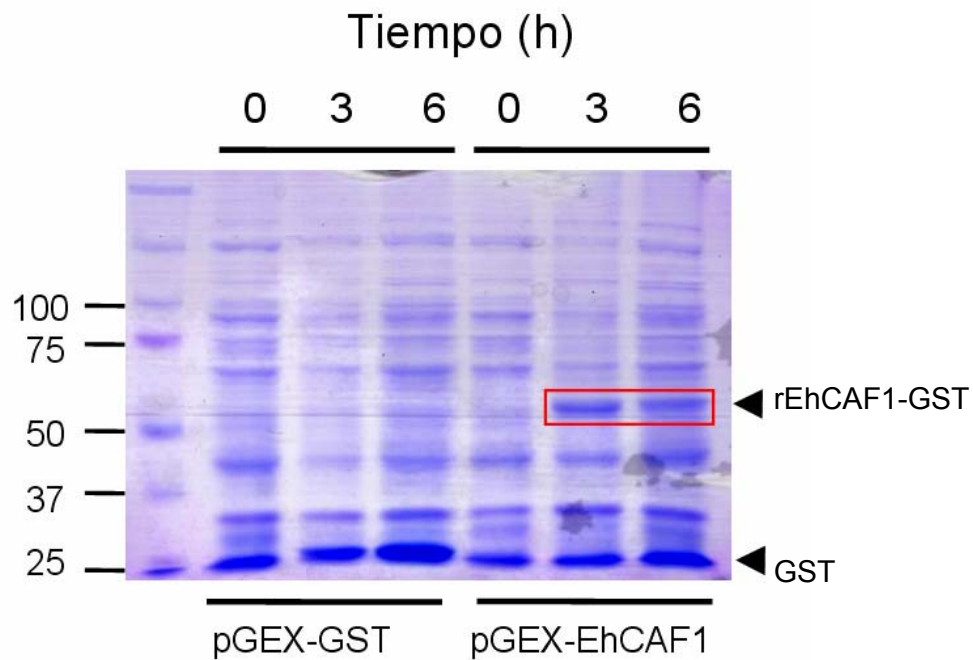


Figura 23. SDS-PAGE al 10% teñido con azul de Coomassie. Carril 1, marcadores de peso molecular preteñidos Dual color. Carriles 2, 3 y 4, extractos proteicos totales obtenidos de la inducción de las bacterias transformadas con el vector pGEX-GST a las 0, 3 y 6 h. Carriles 5, 6 y 7, extractos proteicos totales obtenidos de las bacterias transformadas con el vector pGEX-*Ehcaf1* e inducidas a las 0, 3 y 6 h. Las flechas señalan las proteínas GST de 26 kDa y la proteína EhCAF1 de 61.5 kDa.

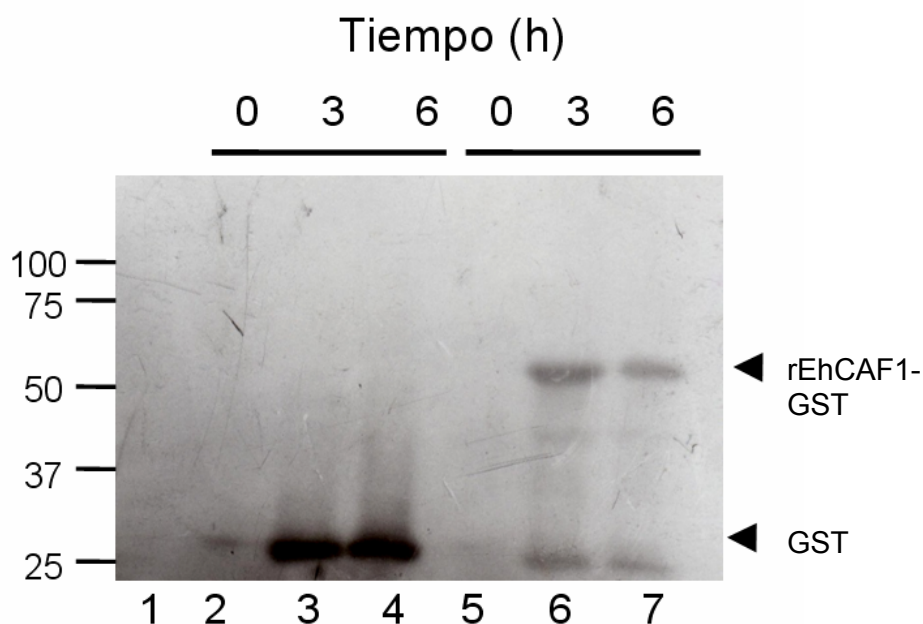


Figura 24. Inmunodetección de las proteínas rEhCAF1-GST y GST mediante Western blot. La membrana se incubó con el anticuerpo anti-GST y se reveló mediante ECL. Carriles 2, 3 y 4, extractos proteicos totales obtenidos de la inducción de las bacterias transformadas con el vector pGEX-GST a las 0, 3 y 6 h. Carriles 5, 6 y 7, extractos proteicos totales obtenidos de las bacterias transformadas con el vector pGEX-*Ehcaf1* e inducidas a las 0, 3 y 6 h. Las flechas señalan las proteínas GST de 26 kDa y rEhCAF1 de 61.5 kDa reconocidas específicamente por el anticuerpo anti-GST.

específico de la proteína GST de 26 kDa. En los carriles 5, 6 y 7 se muestran los extractos proteicos totales obtenidos de las bacterias transformadas con el vector pGEX-*Ehcaf1* e inducidas a las 0, 3 y 6 h, donde podemos observar el reconocimiento de la proteína rEhCAF1-GST de 62.1 kDa a los tiempos 3 y 6 h después de la inducción con IPTG.

Con la finalidad de purificar la proteína rEhCAF1-GST analizamos primero su solubilidad. Las fracciones solubles y no solubles obtenidas de acuerdo al protocolo descrito en materiales y métodos, se resolvieron mediante SDS-PAGE al 10% (Fig. 25). El análisis del gel de poliacrilamida teñido con azul de Coomassie muestra que la proteína rEhCAF1-GST permaneció en la fracción insoluble en cuerpos de inclusión (P), mientras que en la fracción soluble correspondiente al sobrenadante (SN) observamos una cantidad muy pequeña de la proteína recombinante (Fig. 25). Para verificar la identidad de las proteínas se realizó un Western blot con el anticuerpo anti-GST. Como se puede observar en la figura 26, el anticuerpo reconoció en la fracción insoluble a la proteína rEhCAF1-GST observada en el gel teñido con azul de Coomassie, corroborando su presencia mayoritaria en los cuerpos de inclusión.

Con la finalidad de purificar la proteína rEhCAF1-GST a partir de los cuerpos de inclusión, procedimos a realizar un protocolo de solubilización mediante el uso del detergente sarcosil al 1.5%. En la figura 27 se muestra un gel de SDS-PAGE al 10% donde se resolvieron las fracciones solubles e insolubles después del tratamiento con el detergente. En el carril 2 se observa la fracción de la pastilla (P) correspondiente a los cuerpos de inclusión en donde podemos observar la banda correspondiente a la proteína de fusión rEhCAF1-GST. En el carril 3 se observan los extractos correspondientes

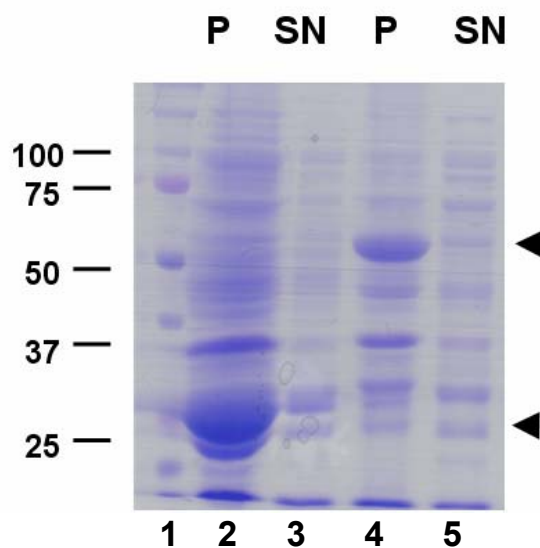


Figura 25. Perfil de solubilización de la proteína rEhCAF1-GST. SDS-PAGE al 10% teñido con azul de Coomassie. Carril 1, marcadores de peso molecular preteñidos Dual color. Carriles 2 y 3 fracción insoluble (P) y fracción soluble (SN) respectivamente, obtenidas de la inducción de las bacterias transformadas con el vector pGEX-GST. Carriles 4 y 5, fracciones insoluble y soluble respectivamente, obtenidas de la inducción de las bacterias transformadas con el vector pGEX-*Ehcaf1*. Las flechas señalan las proteína GST de 26 kDa y la proteína EhCAF1 de 61.5 kDa.

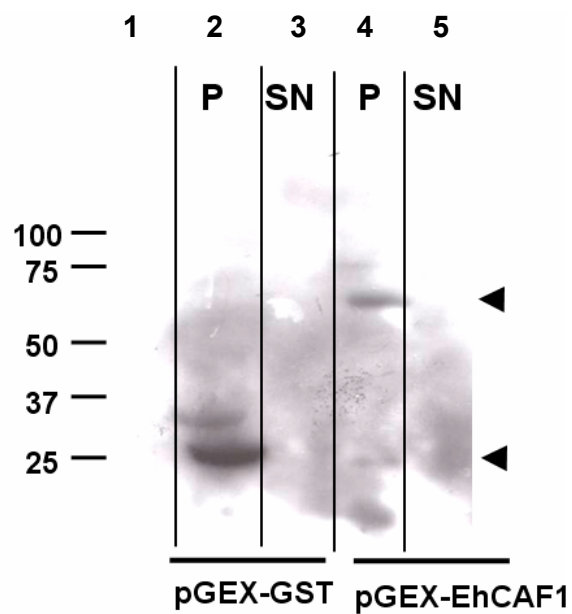


Figura 26. Inmudetección de las proteínas GST y rEhCAF1-GST por Western blot. Carril 1, marcadores de peso molecular preteñidos Dual color. Carriles 2 y 3 fracción insoluble (P) y fracción soluble (SN) obtenidos de la inducción de las bacterias transformadas con el vector pGEX-GST. Carriles 4 y 5 transformadas fracción insoluble (P) y fracción soluble (SN) respectivamente obtenidos de la inducción de las bacterias transformadas con el vector pGEX-*Ehcaf1*. Con las flechas se señalan las proteína GST de 26 kDa y la proteína EhCAF1 de 61.5 kDa reconocidos específicamente por el anticuerpo anti-GST.

a la fracción soluble o sobrenadante (SN) después del tratamiento con sarcosil, observando que la banda correspondiente a la proteína rEhCAF1-GST-GST se enriqueció considerablemente en comparación con la pastilla.

Después de la solubilización de la proteína rEhCAF1-GST realizamos la purificación en condiciones nativas, de acuerdo al protocolo descrito en materiales y métodos. En la figura 28 se muestra un gel SDS-PAGE al 10% teñido con azul de Coomassie donde se resolvieron las fracciones obtenidas en el proceso de purificación. En el carril 2 se cargaron los extractos proteicos correspondientes a la fracción insoluble, en el carril 3 el sobrenadante, en el carril 4 lo no unido a la columna de sefarosa-glutation, en el carril 5 la resina que interactuó con los extractos, en los carriles 6 y 7 los lavados, y en los carriles 8 y 9 las fracciones de elusión. Lo que podemos observar es que la proteína rEhCAF1-GST se encuentra en todas las fracciones y que se vio enriquecida considerablemente en las fracciones de elusión E1 y E2. Para confirmar la identidad de la proteína purificada se realizó un ensayo de Western blot utilizando un anticuerpo anti-GST. En figura 29, se muestra el resultado dónde podemos observar que el anticuerpo reconoce la proteína rEhCAF1-GST de 61.5 kDa, por lo que podemos concluir que la purificación de la proteína fue adecuada.

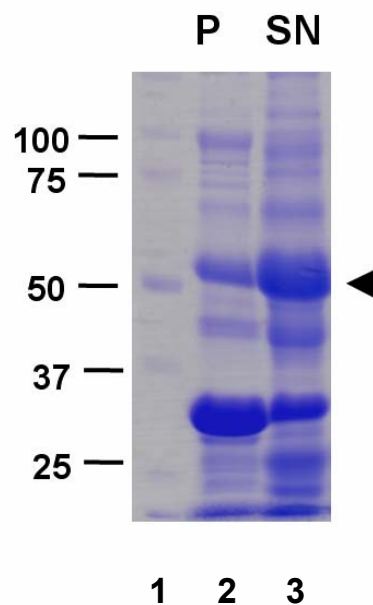


Figura 27. Solubilización de la proteína rEhCAF1-GST a partir de cuerpos de inclusión. SDS-PAGE al 10% teñido con azul de Coomassie. Carril 1, marcadores de peso molecular preteñidos Dual color. Carril 2, fracción insoluble (P) correspondiente a extractos de bacterias transformadas con el vector pGEX-*Ehcaf1*. Carril 3, fracción soluble (SN) correspondiente a extractos de bacterias transformadas con el vector pGEX-*Ehcaf1*. La flecha señala la proteína rEhCAF1-GST de 61.5 kDa.

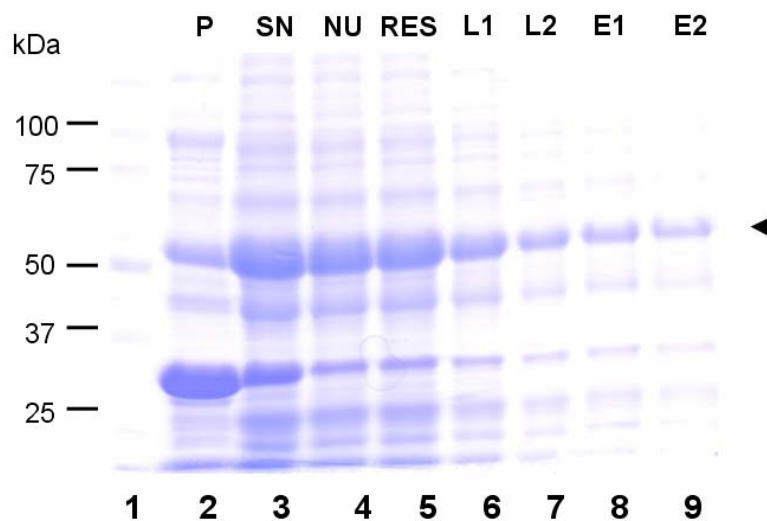


Figura 28. Purificación de la proteína rEhCAF1-GST mediante cromatografía en columnas de sefarosa-glutation. SDS-PAGE al 10% teñido con azul de Coomassie. Carril 1, marcadores de peso molecular preteñidos Dual color. Carril 2, fracción insoluble (P), carril 3, sobrenadante (SN), carril 4, fracción no unida a la columna de sefarosa-glutation (NU), carril 5, resina que interactuó con los extractos (RES), carriles 6 y 7, lavados L1 y L2, carriles 8 y 9 fracciones de elusión E1 y E2. La flecha señala la proteína rEhCAF1-GST de 61.5 kDa.

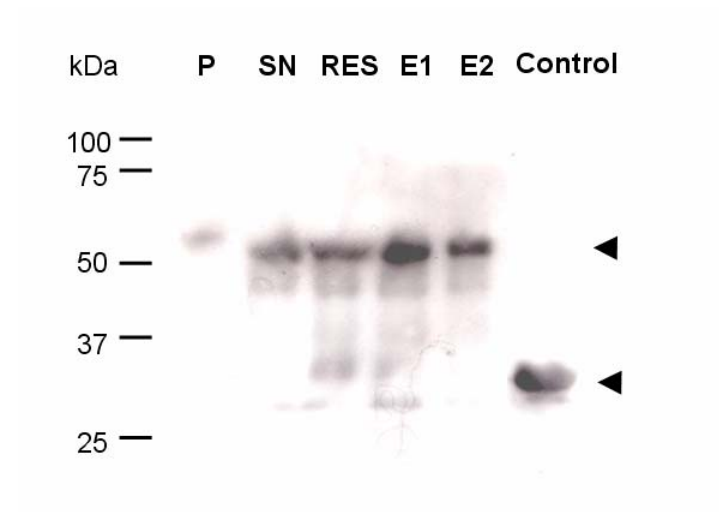


Figura 29. Inmunodetección por Western blot de las fracciones del proceso de purificación utilizando el anticuerpo anti-GST. Carril 1 fracción insoluble (P), carril 2 sobrenadante (SN), carril 3 resina que interactuó con los extractos (RES), carriles 4 y 5 fracciones de elusión E1 y E2. La flecha señala la proteínas GST y rEhCAF1-GST.

5. Análisis de la interacción de la proteína recombinante rEhCAF1-GST con RNA.

Para determinar si la proteína rEhCAF1-GST era capaz de unirse al RNA, procedimos a realizar ensayos de EMSA. En el panel B de la figura 30, se muestran los productos de PCR correspondientes al templado de DNA de 284 pb resueltos en un gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio. El fragmento de DNA fue purificado y resuelto en un gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio donde se verificó su calidad y cantidad (Fig. 30, panel C). El DNA se transcribió *in vitro* para obtener la sonda de RNA marcada con α - ^{32}P -[rATP]. En la figura 31 se muestra la autoradiografía de los complejos RNA-rEhCAF1-GST radiactivos resueltos mediante PAGE al 6% no desnaturizante. En el carril 1 se observa el resultado de la incubación de la sonda radiactiva junto con la proteína rEhCAF1-GST observándose la formación de un complejo con una menor movilidad electroforética, el carril 2 corresponde a la incubación de la sonda con rEhCAF1-GST y el competidor específico que corresponde a la misma sonda no marcada en un exceso de 50 veces respecto a la sonda marcada, observándose la desaparición del complejo. En el carril 3 se muestra la incubación de la sonda con rEhCAF1-GST y el competidor inespecífico (RNA transferencia) en un exceso de 50 veces, observándose que el complejo permanece. En los carriles 4 y 5 se muestra un ensayo de superretardamiento en los cuales se incubó la sonda junto con rEhCAF1-GST, y 5 μl de los sueros inmune anti-rEhCAF1-GST y pre-inmune, no observándose un efecto en la migración del complejo. Como control, el carril 6 se incubó la sonda radiactiva junto con GST. En el carril 7 se observa la sonda radiactiva libre. Estos datos muestran que la proteína rEhCAF1-GST se une al RNA de manera específica.

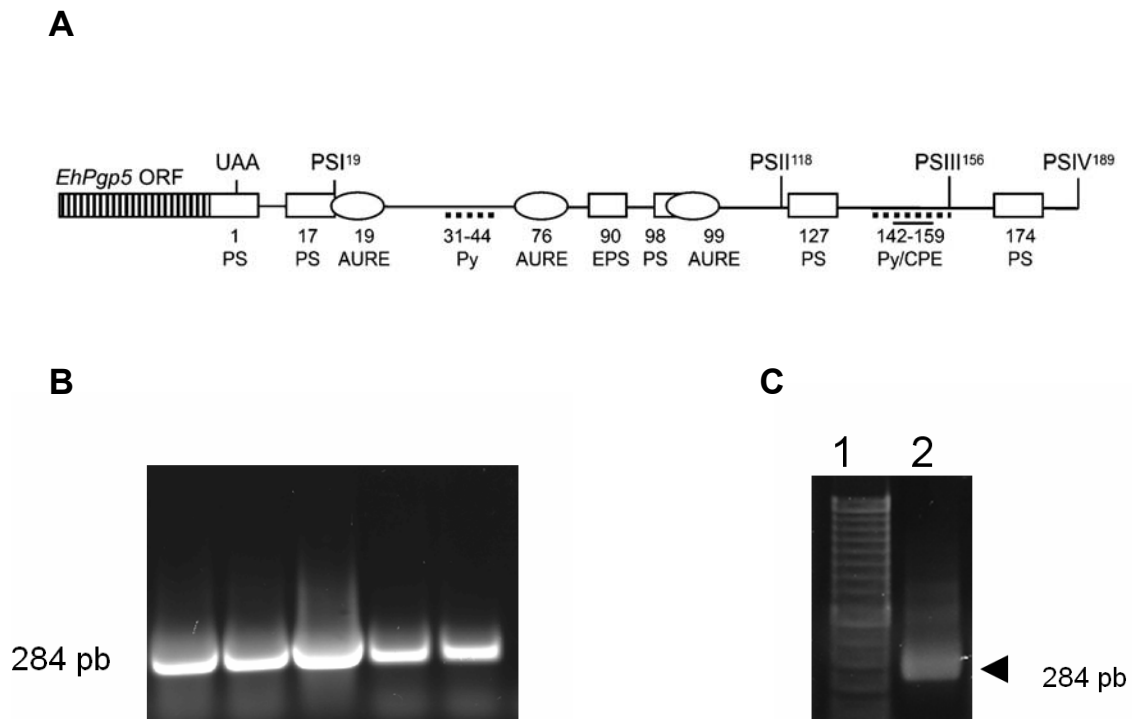


Figura 30. Templado de DNA de 284 pb utilizado para la obtención de la sonda de RNA radiactiva. (A) Elementos de secuencia presentes en la sonda de 284 pb. (B) Gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio donde se observa el producto de PCR correspondientes al templado de DNA de 284 pb. (C) Gel de agarosa al 1 % teñido con bromuro de etidio. Carril 1 marcador de tamaño molecular 2-log; carril, 2 templado de DNA en B purificado.

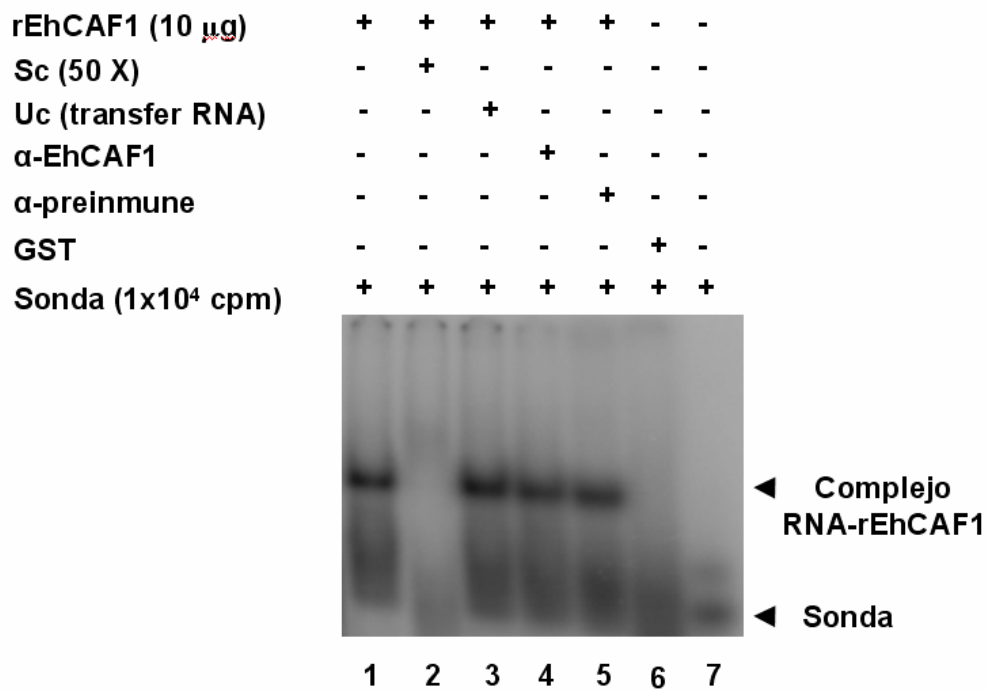


Figura 31. Ensayo de retardamiento de la movilidad electroforética del RNA. Carril 1, sonda radiactiva incubada con la proteína rEhCAF1-GST; carril 2, sonda incubada con rEhCAF1-GST y un competidor específico en un exceso de 50 veces; carril 3, sonda radiactiva incubada con la proteína rEhCAF1-GST y el competidor inespecífico (RNA transferencia) en un exceso de 50 veces; carriles 4 y 5 ensayo de superretardamiento donde se incubó la sonda radiactiva con la rEhCAF1-GST y 5 μ l de los sueros inmune anti-rEhCAF1-GST y pre-inmune, respectivamente. Como control, el carril 6 se incubó la sonda radiactiva junto con GST. Carril 7, sonda radiactiva libre. Las flechas señalan los complejos RNA-rEhCAF1-GST y la sonda radiactiva libre.

V. DISCUSION

En el presente trabajo reportamos la identificación de 2 nuevas poli(A) ribonucleasas. Mediante análisis *in silico* identificamos una pequeña familia de genes que codifican para las proteínas EhCAF1, EhCAF1-like y EhCCR4 en el genoma de *E. histolytica*. Es importante observar que las proteínas EhCAF1 y EhCAF1-like comparten un alto porcentaje de homología e identidad al compararlas, sin embargo, los genes que codifican para cada una de estas proteínas se encuentran localizados en distintas regiones del genoma de la ameba, lo que sugiere que son codificadas por genes únicos. Probablemente dichos genes hayan surgido por un evento de duplicación génica y su alto grado de homología en sus secuencias aminoácidas sugiere la existencia de redundancia génica en este parásito. Los resultados arrojados y analizados con herramientas bioinformáticas nos arrojó datos para sugerir que las proteínas EhCAF1 y EhCAF1-like pudieran realizar la función de desadenilasas dado que tienen el dominio de RNasa D presente en sus homólogos en *S. cerevisiae* y *H. sapiens* además de presentar una conformación estructural terciaria muy similar. Al realizar el análisis filogenético de la proteína EhCAF1 y EhCAF1-like con sus homólogos en diversos organismos, encontramos que evolutivamente se encuentra más relacionada a su homólogo a CAF1 del parásito *G. lamblia* y que las derivan de un ancestro común y que divergieron de manera más temprana en comparación con sus homólogos de mamíferos y plantas.

Como antecedentes teníamos que los genes de las proteínas POP2 y CCR4 de *S. cerevisiae* participan en respuesta del daño en DNA. Así que analizar la expresión del RNAm de los genes que codifican para las poli (A) ribonucleasas de *E. histolytica* en respuesta al daño en DNA encontramos que

los RNAm de los genes *Ehcaf1-like* y *Ehccr4* se expresan de manera diferencial después de irradiar las células con luz UV-C y notablemente el RNAm del gen *Ehcaf1* no varió su expresión. Los resultados obtenidos sugieren que los genes *Ehcaf1-like* y *Ehccr4* podrían estar participando en respuesta al daño en DNA en *E. histolytica*, sin embargo se desconoce el mecanismo molecular.

El gen *Ehcaf1* se clonó en el vector de expresión pGEX-6P-1 lo que nos permitió obtener la proteína recombinante rEhCAF1 fusionada a la proteína GST. Mediante el uso de sarcosil al 1.5 % solubilizamos la proteína a partir de cuerpos de inclusión lo que permitió su subsecuente purificación con el empleo de una matriz de sefarosa-glutation.

Los ensayos de EMSA claramente muestran que la proteína rEhCAF1-GST es capaz de unirse al RNA. En estos experimentos observamos la formación de un solo complejo de RNA-rEhCAF1 específico. Sin embargo hasta este momento no es posible definir si la proteína presenta un sitio consenso de unió al RNA o si se une de manera pasiva.

En conclusión, con los resultados obtenidos en este trabajo podemos sugerir que la proteína EhCAF1 tiene la función de desadenilasa debido a que cuenta con las características estructurales de las poli (A) ribonucleasa POP2 y CAF1 de *S. cerevisiae* y *H. sapiens*, respectivamente. Sin embargo, falta realizar un ensayo de desadenilación que permita definir su actividad catalítica, así como su especificidad por diferentes sustratos en un sistema *in vitro*.

VI. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

Alberts, T., Lemaire, M., Van Berkum, N., Gentz, R., Collart, M., and Timmers, M. Isolation and characterization of human orthologs of yeast CCR4-NOT complex subunits. *Nucleic Acids Research*. **28**: 809-817. (2000).

Badarinarayana, V., Chiang, Y-C., and Denis, C. Functional interaction of CCR4-NOT proteins with TATAA-binding protein (TBP) and its associated factors in yeast. *Genetics*. **155**: 1045-1054. (2000).

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

Colgan, D.F., and Manley, J.L. Mechanism and regulation of mRNA polyadenilation. *Genes and Development*. **11**: 2755-2766. (1997).

Conde-Buenfil, M.C. y De la Mora Zerpa, C. *Entamoeba histolytica*: a standing threat. *Salud Publica, México*. **34** (3), 335-341. (1992).

Corliss, J. O. Protistan phylogeny and eukayio genesis. *Int. Rev. Cytol.* **100**, 319-370. (1987)

Chen, J., Rappsilber, J., Chiang, Y.-C., Russell, P., Mann, M., and Denis, C.L. Purification and characterization of the 1.0MDa CCR4-NOT complex identifies two novel components of the complex. *Journal Molecular Biology*. **314**: 683-694. (2001).

Daugeron, M., Mauxion, F., and Séraphin, B. The yeast POP2 gene encodes a nuclease involved in mRNA deadenylation. *Nucleic Acids Research*. **29**: 2448-2455. (2001).

Deluen, C., James, N., Maillet, L., Molinete, M., Theiler, G., Lemaire, M., Plaquet, N., and Collart, M. The Ccr4-Not complex and yTAF1 (yTaf_{II}130p/yTaf_{II}145p) show physical and functional interactions. *Molecular and Cellular Biology*. **22**: 6735-6749. (2002).

Draper, M., Salvatore, C., and Denis, C. Identification of a Mouse protein whose homolog *Saccharomyces cerevisiae* is a component of the CCR4 transcriptional regulatory complex. *Molecular and Cellular Biology*. **15**: 3487-3495. (1995).

Drupessoir, A., Morel, A., Barbot., Loireau, M., Corbo, L., and Heidmann, T. Identification of four families of yCCR4 – and Mg²⁺-dependent endonuclease-related proteins in higher eukaryotes, and characterization of orthologs of yCCR4 with a conserved leucine-rich repeat essential for hCAF1/POP2 binding. *BMC Genomics*. **2**: 9-22.

Frangioni, J y Neel, B. Solubilization and purification of enzymatically active glutathiones S-transferase (pGEX) fusion proteins. *Analytical Biochem*. **210**: 179-187. (1993)

Fritz, D., Bergman, N., Kilpatrick, W., Wilusz, C., and Wilusz, J. Messenger RNA decay in mammalian cells. *Cell Biochemistry and Biophysics*. **41**: 265-277. (2004).

García, J., López, C., Orozco, E., and Marchat, L. Cloning and expresión of the poly(A) polymerase EhPAP in *Entamoeba histolytica*. *Experimental Parasitology*. **110**: 226-232. (2005).

Li, C., Irmer, H., Gudjonsdottir-Planck, D., Freese, S., Salm, H., Haile, S., Estévez, A. y Clayton, C. Roles of a Trypanosoma brucei 5'-3' exoribonuclease homolog in mRNA degradation. *RNA*. **12**:2171–2186. (2006)

Liu, H., Toyn, J., Draper, M., Johnston, I., and Denis, C. DBF2, a cell cycle-regulated protein kinase, is physically and functionally associated with the CCR4 transcriptional regulatory complex. *EMBO Journal*. **16**: 5289-5298. (1997).

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

Lopez Revilla, R., y Gomez, R. *Entamoeba histolytica*, *E. invadens*, and *E. moshkovskii*: fluctuations of the DNA content of axenic trophozoites. *Exp Parasitol* **44**: 243–248. (1978)

Martínez-Palomo, A. The biology of *Entamoeba histolytica*. Research studies Press. John Wiley & Sons. England. Pp 5-56. (1989)

Meyer, S., Temme, C., and Wahle, E. Messenger RNA turnover in eukaryotes: pathways and enzymes. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*. **39**: 197-216. (2004).

Morel, A., Sentis, S., Bianchin, C., Le Romancer, M., Jonard, L., Rostan, M., Rimokh, R., and Corbo, L. BTG2 antiroliferative protein interacts with the human CCR4 complex existing *in vivo* in three cell-cycle-regulated forms. *Journal of Cell Science*. **116**: 2929-2936. (2003).

Orozco, E., Solís, F.J., Domínguez, J., Chávez, B., Hernández, F. *Entamoeba histolytica*: cell cycle and nuclear division. *Experimental Parasitology*. **67**: 85–95. (1988).

Parker, R., and Song, H. The enzymes and control of eukaryotic mRNA turnover. *Nature Structural and Molecular Biology*. **11**:121-127. (2004).

Prévot, D., Morel, A., Voeltze, T., Rostan, M., Rimokh, r., Magaud, J., and Corbo, L. Relationships of the antiproliferative proteins BTG1 and BTG2 with CAF1, the human homologs of a component of the yeast CCR4 trasncriptional complex. *Journal Biological Chemistry*. **276**: 9640-9648. (2001).

Singh, U. and MacFarlane, RC. Transcriptional profiling of *Entamoeba histolytica* trophozoites. *Int J Parasit.* **5**: 533-542. (2005).

Sepulveda, B. Amebiasis: host-pathogen biology. *Rev. Infec. Dis.* **4**, 836-842. (1982).

Traven, A., Hammet, A., Tennis, N., Denis, C y Heierhorst. Ccr4-Not complex mRNA deadenylase activity contributes to DNA damage responses in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics.* **169**: 65-75. (2004)

Thore, S., Muxion, F., Séraphin, B., and Suck, D. X-ray structure and activity of the yeast Pop2 protein: a nuclease subunit of the mRNA deadenylase complex. *EMBO Rep.* **84**: 821-837. (2003).

Viswanathan, P., Ohn, T., Chiang, Y-C., and Denis, J. Mouse CAF1 can function as a processive deadenylase/3'-5'-exonuclease *in vitro* but in yeast the deadenylase function of CAF1 is not required for mRNA poly (A) removal. *Journal Biological Chemistry.* **23**: 23988-23995. (2004).

Walsh, J. A. Prevalence of *Entamoeba histolytica* infection. En: Amibiasis. Human Infection by *Entamoeba histolytica*. J.I. Ravdin (ed) John Wiley & Sons. EUA pp 93-105. (1986)

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

World Health Organization. WHO Scientific Working Group (1984). *Bull. W.H.O. Epidemiol. Rec.* **59**:221

Weber C, Guigon G, Bouchier C, Frangeul L, Moreira S, Sismeiro O, Gouyette C, Mirelman D, Coppee JY, Guillén N. Stress by heat shock induces massive down regulation of genes and allows differential allelic expression of the Gal/GalNAc lectin in *Entamoeba histolytica*. *Eukaryot Cell.* **5**:871-5. (2006).

Zhao, J., Hyman, L., and Moore, C. Formation of mRNA 3'ends in eukaryotes: mechanisms, regulation and interrelationships with other steps in mRNA synthesis. *Microbiology and Molecular Reviews.* **63**:405-445. (1999)

Zuo, Y., and Deutscher, P. Exoribonuclease superfamilies: structural analysis and phylogenetic distribution. *Nucleic Acids Research.* **29**: 1017-1026. (2001).

VII. CONCLUSIONES

- 1.- *E. histolytica* posee tres posibles poli(A) ribonucleasas que presentan alta homología con sus homólogos en *Saccharomyces cerevisiae* y *Homo sapiens*.
- 2.- La presencia de dos genes parálogos EhCAF1 apoya la idea de la presencia de redundancia génica en *E. histolytica*.
- 3.- Los genes *EhCaf1-like*, *EhCcr4* se expresan de manera diferencial en respuesta al daño del DNA, sugiriendo su participación en este evento celular.
- 4.- La proteína recombinante rEhCAF1-GST presenta la actividad de unión a RNA *in vitro*.

LISTA DE ABREVIATURAS

3' UTR	región 3' no traducida
5' UTR	región 5' no traducida
BSA	albúmina sérica de bovino
cDNA	ácido desoxirribonucleico complementario
DCP1	proteína de <i>decapping</i> 1
DCP2	proteína de <i>decapping</i> 2
DEPC	dietilpirocarbonato
DNA	ácido desoxirribonucleico
DTT	dithiotreitol
dNTPs	deoxinucleótidos tri-fosfatados
ddTPs	dideoxinucleótidos tri-fosfatados
dT	deoxitimidina
dA	deoxiadenina
dC	deoxicitosina
dG	deoxiguanina
<i>Ehcaf1</i>	gen codificante para la proteína EhCAF1
<i>Ehcaf1-like</i>	gen codificante para la proteína similar a EhCAF1
<i>Ehccr4</i>	gen codificante para la proteína EhCCR4
EDTA	ácido etilen diamino tetra-acético
EMSA	ensayo de retardamiento de la movilidad electroforética
h	horas
HEPES	ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinaetanosulfónico
HCl	ácido clorhídrico

IPTG	isopropil- β -D-tiogalactopiranosido
Kb	kilobases
KCl	cloruro de potasio
kDa	kilodaltons
LB	medio de cultivo para bacterias Luria-Broth
LRR	repetidos ricos en leucina
mM	milimolar
μ M	micromolar
min	minuto
mg	miligramo
μ g	microgramo
ml	mililitro
μ l	microlitro
NaCl	cloruro de sodio
NaOH	hidróxido de sodio
nt	nucleótidos
ng	nanogramo
PAGE	electroforésis en geles de poliacrilamida
PCR	reacción en cadena de la polimerasa
pb	par de base
PBS	solución amortiguadora de fosfatos salina
pm	picomolar
pre-RNA _m	RNA mensajero precursor
RNA	ácido ribonucléico
RNA _m	ácido ribonucléico mensajero

RNA poli (A)	ácido ribonucleico mensajero poliadenilado
rNTPs	ribonucleótidos trifosfatados
rpm	revoluciones por minuto
RT	transcripción reversa
SDS	dodecil sulfato de sodio
seg	segundo
TAFs	factores asociados a la proteína TBP
TEMED	N,N,N',N', tetrametilen-diamina
TAE	solución amortiguadora Tris-Acetato-EDTA
TBE	solución amortiguadora Tris-Borato-EDTA
TBP	proteína de unión a la caja TATA
Tris	tris (hidroximetil)-amino-metano
TYI-S-33	Medio de tripticasa, extracto de levadura, hierro y suero bovino para cultivo de <i>E. histolytica</i>
tRNA	ácido ribonucleico de transferencia
V	volts

LISTA DE FIGURAS.

Figura 1. Numero de casos reportados de amibiasis por entidad federativa	4
Figura 2. Ciclo de vida de <i>Entamoeba histolytica</i>	9
Figura 3. Filogenia del genero <i>Entamoeba</i>	12
Figura 4. Vías de degradación del RNAm	20
Figura 5. Estructura de los dominios que conforman las poli(A) ribonucleasas	22
Figura 6. Poli(A) ribonucleasas de organismos eucariontes	24
Figura 7. Interacciones de las proteínas NOT1-NOT5 del complejo CCR4-POP2-NOT con algunos factores del complejo de inicio de la transcripción	26
Figura 8. Representación esquemática de las regiones conservadas de la EhCAF1 y EhCAF1-like	59
Figura 9. Localización del gen <i>Ehcaf1</i> en el genoma de <i>E. histolytica</i> en el <i>scaffold</i> 00108	60
Figura 10. Localización del gen <i>Ehcaf1-like</i> en el genoma de <i>E. histolytica</i> en el <i>scaffold</i> 00007	61
Figura 11. Representación esquemática de las regiones conservadas de las proteínas EhCAF1, EhCAF1-like, CAF1 y POP2	63
Figura 12. Estructura de los dominios que tienen las poli(A) ribonucleasas EhCAF1 y EhCAF1-like	64
Figura 13. Análisis filogenético de las proteínas CAF1 en diferentes organismos.	65
Figura 14. Estructura terciaria y conformación del dominio de	

RNAsa D de las proteínas POP2, EhCAF1 y EhCAF1-like	67
Figura 15. Localización del sitio catalítico (DEDD) de RNAsa D en la estructura terciaria de EhCAF1 y EhCAF1-like	68
Figura 16. Representación esquemática de los dominios presentes en las proteínas CCR4	69
Figura 17. Amplificación de regiones internas de los genes <i>Ehcaf1</i> , <i>Ehcaf1-like</i> y <i>Ehccr4</i>	71
Figura 18. Análisis de la expresión de los genes <i>Ehcaf1</i> , <i>Ehcaf1-like</i> , <i>Ehccr4</i> y <i>actina</i> después del tratamiento por choque térmico	73
Figura 19. Análisis de la expresión de los genes <i>Ehcaf1</i> , <i>Ehcaf1-like</i> , <i>Ehccr4</i> y <i>actina</i> después de inducción de daño al DNA por irradiación UV-C	74
Figura 20. Mapa del plásmido pGEX-6P-1	76
Figura 21. Subclonación de <i>Ehcaf1</i> en el vector de expresión pGEX-6P-1	77
Figura 22. Electroferograma correspondiente a la secuencia del gen <i>Ehcaf1</i>	78
Figura 23. SDS-PAGE al 10% teñido con azul de Coomassie	80
Figura 24. Inmunodetección de las proteínas rEhCAF1-GST y GST mediante Western blot	81
Figura 25. Perfil de solubilización de las proteínas rEhCAF1-GST y GST	83
Figura 26. Inmunodetección de las proteínas rEhCAF1-GST y GST mediante Western blot	84
Figura 27. Solubilización de la proteína rEhCAF1-GST a partir de	

cuerpos de inclusión	86
Figura 28. Purificación de la proteína rEhCAF1-GST mediante cromatografía en columnas de sefarosa-glutation.	87
Figura 29. Inmunodetección por Western blot de las fracciones del proceso de purificación utilizando el anticuerpo anti-GST	88
Figura 30. Templado de DNA de 284 pb utilizado para la obtención de la sonda de RNA radiactiva	90
Figura 31. Ensayo de retardamiento de la movilidad electroforética del RNA	91

LISTA DE TABLAS.

Tabla I. Clasificación taxonómica de <i>E. histolytica</i>	3
Tabla II. Superfamilia de exoribonucleasas identificadas en eubacterias y eucariontes	18

RESUMEN

La amibiasis es la infección causada por el protozooario entérico *Entamoeba histolytica*. En México, la amibiasis es una enfermedad endémica considerada como un problema de salud pública. Se estima que de la población mexicana total, el 20% son portadores, el 2% se encuentran enfermos. En el presente trabajo reportamos la identificación de 2 nuevas poli(A) ribonucleasas. Mediante análisis *in silico* identificamos una familia de genes que codifican para las proteínas EhCAF1, EhCAF1-like y EhCCR4 en el genoma de *E. histolytica*. Los resultados nos permiten sugerir que las proteínas EhCAF1 y EhCAF1-like pudieran realizar la función de desadenilasas dado que tienen el dominio de RNasa D presente en sus homólogos en *S. cerevisiae* y *H. sapiens* además de presentar una conformación estructura terciaria muy similar. Los genes *Ehcaf1-like* y *Ehccr4* se expresaron de manera diferencial después de irradiar las células con luz UV-C mientras que el RNAm del gen *Ehcaf1* no varió su expresión. Los resultados sugieren que los genes *Ehcaf1-like* y *Ehccr4* podrían estar participando en respuesta al daño en DNA en *E. histolytica*, sin embargo se desconoce el mecanismo molecular. Los ensayos de EMSA muestran que la proteína rEhCAF1-GST es capaz de unirse al RNA. En estos experimentos observamos la formación de un solo complejo de RNA-rEhCAF1 específico. Sin embargo no es posible definir si la proteína presenta un sitio consenso de unió al RNA o si se une de manera pasiva.