

POSGRADO EN CIENCIAS GENÓMICAS

**“IDENTIFICACIÓN DE CUATRO DNA POLIMERASAS
DE TIPO ORGANELAR EN *Entamoeba histolytica*.
LOCALIZACIÓN DEL GEN *Ehodp1* Y DE LA
PROTEÍNA EhODP1”**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTORA EN CIENCIAS GENÓMICAS
P R E S E N T A

M. en C. MARÍA ESTHER HERRERA AGUIRRE

DIRECTORA DE TESIS
DRA. ESTHER OROZCO OROZCO

CODIRECTOR DE TESIS
DR. JUAN PEDRO LUNA ARIAS

SISTEMA BIBLIOTECARIO DE INFORMACIÓN Y DOCUMENTACIÓN



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE LA CIUDAD DE MÉXICO COORDINACIÓN ACADÉMICA

RESTRICCIONES DE USO PARA LAS TESIS DIGITALES

DERECHOS RESERVADOS[©]

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

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

COMITÉ TUTORIAL

DIRECTORA

DRA. ESTHER OROZCO OROZCO

Profesora Titular

Depto. de Infectómica y Patogénesis Molecular, Cinvestav-IPN
UACM

CODIRECTOR

DR. JUAN PEDRO LUNA ARIAS

Profesor Titular

Depto. de Biología Celular, Cinvestav-IPN

ASESORES

DRA. ROSSANA ARROYO VERÁSTEGUI

Profesora Titular

Depto. de Infectómica y Patogénesis Molecular, Cinvestav-IPN
UACM

DR. JOSÉ MANUEL HERNÁNDEZ HERNÁNDEZ

Profesor Titular

Depto. de Biología Celular, Cinvestav-IPN

DR. MARIO CÉSAR LÓPEZ CAMARILLO

Profesor Titular

Posgrado en Ciencias Genómicas, UACM

DR. MARIO ALBERTO RODRÍQUEZ RODRÍGUEZ

Profesor Titular

Depto. de Infectómica y Patogénesis Molecular, Cinvestav-IPN

Agradezco a la Universidad Autónoma de la Ciudad de México por acogerme
en su seno para la realización de mis estudios de Posgrado

El presente trabajo de investigación recibió apoyo financiero por parte de la
Universidad Autónoma de la Ciudad de México (UACM) y del Consejo Nacional
de Ciencia y Tecnología (CONACyT)

El trabajo experimental se realizó principalmente en el laboratorio 2 del
Departamento de Infectómica y Patogénesis Molecular bajo la dirección de la
Dra. Esther Orozco Orozco y en el laboratorio 43 del Departamento de Biología
Celular bajo la dirección del Dr. Juan Pedro Luna Arias del Cinvestav-IPN

A Irene, Julieta y Juan Pedro

*Por llenar mi vida de alegría,
por su confianza, estímulos y paciencia,
con el gran amor que les tengo.*



A mi Madre Beatriz

y

A mis hermanos

Rogelio, Enrique, Beatriz,

Alejandro y Angélica

con infinita alegría

AGRADECIMIENTOS

A mis Directores de Tesis

Dra. Esther Orozco Orozco por haberme dado la oportunidad de formar parte de su grupo de investigación, por su dirección, por su paciencia y por todo el apoyo y tiempo que me brindó

y

Dr. Juan Pedro Luna Arias por su dirección, consejos y guía profesionales durante la realización del presente trabajo, así como por el apoyo recibido en los momentos difíciles

A mis Asesores

Dra. Rossana Arroyo Verástegui, Dr. Mario César López Camarillo, Dr.

Mario Alberto Rodríguez Rodríguez y Dr. José Manuel Hernández Hernández, por sus valiosos comentarios para la realización exitosa del proyecto de investigación, por su tiempo, su apoyo profesional y por la invaluable amistad que me han brindado.

**A todos los profesores del Posgrado en Ciencias Genómicas de la UACM,
así como a los profesores del Cinvestav-IPN por sus observaciones y
consejos para el desarrollo del trabajo.**

**A mis compañeros y amigos
de la UACM, del Cinvestav y otros,
por sus comentarios y ayuda durante la realización del trabajo,
por todos los momentos agradables que pasamos
y también por los momentos difíciles
que nos ayudaron a crecer juntos:**

**Abigail B, Alejandrina R, Alejandro, Andrés, Araceli, Catalina S,
Cecilia B, Cristina C, David R, Eduardo F, Eduardo C, Elvia J,
Elisa A, Gloria L, Gloria G, Guillermina G, Israel L, Ivon, José O, Lidia,
Ma. Luisa L, Mavil L, Máximo M, Mercedes, Minerva C, Ramón O,
Rocío G, Rocío T, Silvia C, Tomás S, Wendy F.**

**A los amigos que se han quedado atrás pero que siguen presentes,
a todos aquéllos con los que he compartido alegrías, sueños y
esperanzas.**

ÍNDICE

	Página
ÍNDICE	i
ABREVIATURAS	vii
ÍNDICE DE FIGURAS	xii
ÍNDICE DE TABLAS	xvi
RESUMEN	xvii
ABSTRACT	xix
I. INTRODUCCIÓN	1
1. Descripción de <i>Entamoeba histolytica</i>	1
1.1. Clasificación taxonómica	1
1.2. Importancia en Salud	1
1.3. Ciclo de vida	2
1.4. Estructura del trofozoíto	3
1.4.1. El núcleo de <i>E. histolytica</i>	3
1.4.2. La membrana y el citoplasma	4
2. Genes y proteínas mitocondriales en <i>E. histolytica</i>	7
3. Organelos con características mitocondriales en <i>E. histolytica</i> --	8
3.1. EhkO	8
3.2. Criptón	11
3.3. Mitosoma	12
4. Replicación del DNA en eucariontes	12

4.1. Orígenes de replicación-----	13
4.2. Licencia para la replicación-----	17
4.3. Proceso de replicación -----	25
5. DNA polimerasas -----	33
5.1. Estructura tridimensional y dominios catalíticos de las DNA polimerasas replicativas -----	33
6. DNA polimerasas de la familia B -----	35
7. Replicación en <i>E. histolytica</i> -----	38
II. IMPORTANCIA DEL TEMA DE ESTUDIO -----	42
III. OBJETIVOS -----	43
1. Objetivo general -----	43
2. Objetivos particulares -----	43
IV. MATERIALES Y MÉTODOS -----	44
1. Cultivo de <i>E. histolytica</i> -----	44
2. Análisis <i>in silico</i> -----	44
2.1. Búsqueda de genes con similitud a DNA polimerasas organelares en el genoma de <i>E. histolytica</i> -----	44
2.2. Análisis estructural de las probables DNA polimerasas de <i>E. histolytica</i> -----	45
2.3. Análisis filogenético de las EhODPs-----	45
3. Obtención del DNA genómico de <i>E. histolytica</i> -----	46
4. Diseño de oligonucleótidos específicos para amplificar fragmentos de los genes <i>Ehodp1</i> , <i>Ehodp2</i> , <i>Ehodp3</i> y <i>Ehodp4</i> ---	47

5. Amplificación por PCR de fragmentos específicos	
de los genes <i>Ehodp1</i> , <i>Ehodp2</i> , <i>Ehodp3</i> y <i>Ehodp4</i> -----	49
6. Aislamiento del RNA total y síntesis <i>in vitro</i> del cDNA de	
<i>E. histolytica</i> -----	49
7. RT-PCR semicuantitativa de los genes <i>Ehodp1</i> , <i>Ehodp2</i> ,	
<i>Ehodp3</i> y <i>Ehodp4</i> -----	50
8. Preparación de células competentes de <i>E. coli</i> DH5 α	
y BL21(DE3)pLysS -----	51
9. Diseño de oligonucleótidos y amplificación por PCR	
de un fragmento de DNA de 504 pb del gen <i>Ehodp1</i> -----	51
10. Análisis electroforético del DNA en geles de agarosa -----	52
11. Construcción del plásmido recombinante que contiene el	
fragmento de DNA de 504 pb del gen <i>Ehodp1</i> -----	52
12. Clonación de un fragmento de DNA de 1,116 pb del extremo	
3' del gen <i>Ehodp1</i> -----	54
13. Transformación de células competentes de <i>E. coli</i> DH5 α	
y BL21(DE3)pLysS -----	57
14. Obtención del DNA plasmídico por el método de lisis alcalina ---	57
15. Secuenciación -----	58
16. Amplificación del extremo 3' del gen <i>Ehodp1</i> por medio	
de la técnica 3'-RACE -----	59
17. Inducción del polipéptido recombinante rEhODP1-168	
codificado por el fragmento de 523 pb del gen <i>Ehodp1</i>	

y su purificación por cromatografía de afinidad -----	60
18. Genes bidimensionales y espectrometría de masas	
en MALDI-TOF -----	62
19. Obtención por electroelución de la proteína recombinante	
rEhODP1-168 y producción de los anticuerpos anti-rEhODP1---	62
20. Western Blot -----	65
21. Purificación de EhkOs -----	66
22. Localización de EhODP1 por inmunofluorescencia indirecta y	
microscopía confocal -----	67
23. PCR <i>in situ</i> -----	67
V. RESULTADOS -----	71
1. Identificación del gen que codifica para una DNA polimerasa	
de tipo organelar en el genoma de <i>Entamoeba histolytica</i> -----	71
2. Organización estructural de la proteína EhODP1 -----	72
3. <i>Ehodp1</i> es un gen transcripcionalmente activo -----	80
4. Secuenciación parcial del gen <i>Ehodp1</i> -----	84
5. El genoma de <i>E. histolytica</i> contiene ocho genes que codifican	
probables DNA polimerasas de la Familia A y de la Familia B-----	88
6. Análisis estructural de las cuatro probables DNA polimerasas	
de tipo organelar o viral pertenecientes a la Familia B de	
<i>E. histolytica</i> -----	92
7. <i>Ehodp1</i> , <i>Ehodp2</i> , <i>Ehodp3</i> y <i>Ehodp4</i> son genes	
transcripcionalmente activos -----	93

8. Construcción del plásmido recombinante	
prRSET A- <i>Ehodp1</i> -504 (pr <i>Ehodp1</i>) -----	101
99	
9. Inducción de la proteína recombinante de 168 aa rEhODP1-168	
y su purificación por cromatografía de afinidad -----	104
10. Inmunodetección de rEhODP1-168 con anticuerpos	
monoclonales anti-histidinas -----	106
11. Identificación de la proteína recombinante por	
electroforesis 2D -----	108
12. Purificación de la proteína recombinante	
rEhODP1-168 por electroelución -----	110
13. Producción de anticuerpos contra la proteína recombinante	
rEhODP1-168 e inmunodetección de la proteína EhODP1 en	
extractos totales de trofozoítos y en EhkOs purificados -----	110
14. Localización subcelular de la proteína EhODP1	
en trofozoítos fijados -----	114
15. Estandarización de la técnica de PCR <i>in situ</i> -----	117
16. Localización subcelular del gen <i>Ehodp1</i> en trofozoítos	
de <i>E. histolytica</i> -----	121
17. Análisis filogenético de probables DNA polimerasas de	
<i>E. histolytica</i> (EhODPs) -----	124
VI. DISCUSIÓN -----	126
VII. CONCLUSIONES -----	137

VIII. BIBLIOGRAFÍA	138
XI. APÉNDICE: Artículo publicado	153

ABREVIATURAS

ACE	Elemento de control de la amplificación (“Amplification Control Element”)
ACS	Secuencia consenso del ARS (“ARS Consensus Sequence”)
APC	Complejo promotor de la anafase (“Anaphase Promoting Complex”)
ARS	Secuencia autónoma de replicación (“Autonomous replication sequence”)
ATP	Trifosfato de adenosina
BSA	Albúmina sérica bovina (“Bovin serum albumin”)
C/EBP	Proteína que se une al potenciador CCAAT (“CCAAT Enhancer Binding Protein”)
Cdc6	Proteína 6 del ciclo de división celular (“Cell división cycle 6 protein”)
CDKs	Cinasas dependientes de ciclinas (“Ciclin-dependent kinases”)
Cdt1	Factor de licenciamiento de la replicación de DNA 1 (“Chromatin licensing and DNA replication factor 1”)
DDK	Cinasa dependiente de Df4 (“Dbf4-dependent kinase”)
<i>DHFR</i>	Gen que codifica a la dihidrofolato reductasa (“Dihydrofolate reductase encoding gene”)
DNAPol	DNA polimerasa
dNTP	Desoxinucleótidos trifosfatados

DOC	Desoxicolato de sodio
DTT	Ditiotreitol
DUEs	Elementos que permiten el desenrollamiento del DNA (“DNA Unwinding Elements”)
E2F	Factor de transcripción E2F
EDTA	Etilén diamino tetraacetato
EhkO	Organelo con similitud a cinetoplasto de <i>Entamoeba histolytica</i> (<i>Entamoeba histolytica</i> kinetoplast-like organelle)
<i>Ehodp</i>	Gen que codifica DNA polimerasas organelares
EhODP	DNA polimerasa organelar de <i>Entamoeba histolytica</i>
FC	Fosfatidilcolina
FE	Fosfatidiletalona
GSP	Oligonucleótido específico del gen en cuestión (“Gene Specific Primer”)
IMAC	Cromatografía de afinidad a metal inmovilizado (“Immobilized Metal Affinity Chromatography”)
IP	Ioduro de propidio
IPTG	Isopropil- β -D-tiogalactopiranosido
LB	Medio de cultivo Luria-Bertani
<i>LMNB2</i>	Gen que codifica a la lámina B2
MCM2-7	Complejo de mantenimiento de minicromosomas 2-7 (“Mini Chromosome Maintenance Complex 2-7”)
MET	Microscopía electrónica de transmisión

MYC	Factor de transcripción Myc
NAD ⁺	Nicotinamida adenina dinucleótido
NADP ⁺	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
Ni ²⁺ -NTA	Nitrilo triacetato unido a níquel en estado de oxidación 2+
NJ	“Neighbor-Joining”
ORC	Complejo de reconocimiento del origen de replicación (“Origin Recognition Complex”)
Ori	Origen de replicación
PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida (“Polyacrylamide gel electrophoresis”)
PBS	Tampón de fosfatos salino (“Phosphate buffer saline”)
PCNA	Antígeno nuclear de proliferación celular (“Proliferating cell nuclear antigen”)
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa (“Polymerase chain reaction”)
PFO	Piruvato:ferredoxina óxido-reductasa
PK	Proteinasa K
PNT	Piridina nucleótido transhidrogenasa
Pol	Polimerasa
Pre-IC	Complejo de preinicio de la replicación (“Pre-Initiation Complex”)
PRE-LC	Complejo de pre-cargado (“Pre-Loading Complex”)
Pre-RC	Complejo de pre-replicación (“Pre-Replication Complex”)

RACE	Amplificación rápida de los extremos del cDNA (“Rapid Amplification of cDNA ends”)
RNasa A	Ribonucleasa A
RNAsin	Inhibidor de RNasas
RPA	Proteína de replicación A (“Replication protein A”)
RP-C	Proteína de replicación C (“Replication protein C”)
rpm	Revoluciones por minuto
RT-PCR	Transcripción reversa y reacción en cadena de la DNA polimerasa (“Reverse transcription polymerase chain reaction”)
SCF	Complejo que contiene a Skp, Cullin y la caja F (“Skp, Cullin, F-box containing complex”)
SDS	Dodecil sulfato de sodio (“Sodium dodecyl sulfate”)
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS
SN	Sobrenadante
Sp1	Factor de transcripción Sp1
SSB	Proteína que une cadena sencilla de DNA (“Single Strand binding protein”)
SSC	Tampón de citrato de sodio salino (“Saline-Sodium Citrate”)
TA	Temperatura ambiente
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
TBE	Tris-borato EDTA
TBP	Proteína de unión a la caja TATA (“TATA-box binding protein”)
TCA	Ácido tricloro acético (“Trichloroacetic acid”)

TE	Tris-EDTA
TERT	Telomerasa RT (“Telomerase Reverse Transcriptase”)
Tm	Temperatura de hibridación

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Ciclo de vida de <i>E. histolytica</i> -----	5
Figura 2. Morfología de <i>E. histolytica</i> -----	6
Figura 3. Identificación del EhkO en trofozoítos de <i>E. histolytica</i> -----	10
Figura 4. Identificación de Criptón en trofozoítos de <i>E. histolytica</i> -----	14
Figura 5. Identificación de los mitosomas en trofozoítos de <i>E. histolytica</i> -----	15
Figura 6. Estructura de algunos orígenes de replicación eucarióticos -----	18
Figura 7. Etapas de la formación del complejo de pre-replicación (Pre-RC) --	20
Figura 8. La activación del Pre-RC conduce a la formación de las horquillas de replicación eucarióticas -----	23
Figura 9. Sustratos requeridos para la síntesis de DNA -----	27
Figura 10. Mecanismo de síntesis de DNA llevado a cabo por las DNA polimerasas -----	28
Figura 11. Mecanismo de acción de la actividad 5'→3' DNA polimerasa -----	29
Figura 12. El problema de la replicación de los extremos del DNA de los cromosomas -----	32
Figura 13. Estructura tridimensional de las DNA polimerasas de las familias A y B -----	36
Figura 14. Secuencias consenso de los dominios I y II de las DNA polimerasas de la familia B -----	37
Figura 15. Esquema que muestra la estructura de los plásmidos de la	

	familia pRSET -----	53
Figura 16.	Esquema que muestra el proceso de clonación de un fragmento de DNA en un vector plasmídico -----	55
Figura 17.	Esquema que muestra la estructura del plásmido pGEM-T-Easy-----	56
Figura 18.	Esquema usado en la purificación del péptido recombinante prEhODP1-168 en condiciones desnaturizante por IMAC -----	61
Figura 19.	Esquema de inmunización utilizado para la producción de los anticuerpos policlonales de rata anti-rEhODP1 -----	64
Figura 20.	Esquema utilizado en la reacción de amplificación de un fragmento del gen <i>Ehodp1</i> por <i>In Situ</i> -PCR -----	69
Figura 21.	Secuencia de nucleótidos del contig1 de <i>Entamoeba histolytica</i> y su traducción a aminoácidos -----	73
Figura 22.	Alineamiento esquemático de EhODP1 con DNA polimerasas pertenecientes a la familia B -----	77
Figura 23.	Alineamiento de las secuencias de las cajas I, II y III característi- cas de DNA polimerasas de la familia B, identificadas en EhODP1, en DNA polimerasas codificadas en plásmidos mitocondriales y en una DNA polimerasa de <i>T. vaginalis</i> -----	78
Figura 24.	Secuencias de las cajas conservadas A y B identificadas en EhODP1 y en DNA polimerasas codificadas en plásmidos mitocondriales de hongos y en <i>T. vaginalis</i> -----	81
Figura 25.	El gen <i>Ehodp1</i> de <i>E. histolytica</i> es transcripcionalmente activo----	83

Figura 26.	Esquema de las regiones amplificadas y secuenciadas del gen <i>Ehodp1</i> -----	85
Figura 27.	Análisis por electroforesis en gel de agarosa de los fragmentos del gen <i>Ehodp1</i> amplificados por PCR y que fueron secuenciados-	86
Figura 28.	Probables DNA polimerasas codificadas en el genoma de <i>E. histolytica</i> -----	90
Figura 29.	Alineamiento múltiple de cuatro probables DNA polimerasas organelares presentes en el genoma de <i>E. histolytica</i> -----	94
Figura 30.	Los genes <i>Ehodp1</i> , <i>Ehodp2</i> , <i>Ehodp3</i> y <i>Ehodp4</i> se expresan en los trofozoítos de <i>E. histolytica</i> -----	97
Figura 31.	Análisis de la expresión relativa de los genes <i>Ehodp1</i> , <i>Ehodp2</i> , <i>Ehodp3</i> y <i>Ehodp4</i> en trofozoítos de <i>E. histolytica</i> -----	99
Figura 32.	Construcción del plásmido recombinante prRSET-A- <i>Ehodp1</i> -504 (pr <i>Ehodp1</i>) -----	102
Figura 33.	Inducción del polipéptido recombinante rEhODP1-168 en bacterias y su purificación por cromatografía de afinidad -----	105
Figura 34.	Inmunodetección del polipéptido recombinante rEhODP1-168 con anticuerpos anti-histidinas mediante Western blot -----	107
Figura 35.	Separación por electroforesis bidimensional (2D) de las proteínas inducidas en <i>E. coli</i> BL21(DE3)pLysS y su identificación por MALDI-TOF -----	109
Figura 36.	Purificación por electroelución de la proteína recombinante rEhODP1-168 -----	111

Figura 37.	Inmunodetección de la proteína EhODP1 en extractos totales de trofozoítos y en la fracción enriquecida en EhkOs -----	113
Figura 38.	EhODP1 se localiza en los EhkOs de los trofozoítos de <i>E. histolytica</i> -----	115
Figura 39.	Estandarización de la técnica de PCR <i>in situ</i> para el gen de actina -----	119
Figura 40.	Localización del gen <i>Ehodp1</i> en núcleos y en EhkOs -----	122
Figura 41.	Análisis filogenético de las DNA polimerasas organelares de <i>E. histolytica</i> -----	125

ÍNDICE DE TABLAS

	Página
Tabla 1. Clasificación de las DNA polimerasas en familias -----	34
Tabla 2. Comparación de los componentes del complejo pre-replicativo en <i>E. histolytica</i> , levadura y humano -----	39
Tabla 3. Oligonucleótidos utilizados en las reacciones de amplificación por PCR y RT-PCR -----	48
Tabla 4. Similitud de EhODP1 con DNA polimerasas codificadas en plásmidos mitocondriales -----	75
Tabla 5. Valores de identidad y similitud entre las probables DNA polimerasas de tipo organelar de <i>E. histolytica</i> -----	96
Tabla 6. Condiciones probadas para la estandarización de la técnica de PCR <i>in situ</i> -----	118

RESUMEN

Entamoeba histolytica es un eucarionte que posee organelos citoplásmicos conocidos como EhkOs, los cuales presentan una doble membrana y contienen DNA. Este DNA ha sido detectado con naranja de acridina, yoduro de propidio y mediante marcaje con timidina tritiada. En los EhkOs se ha identificado a la enzima EhPFO y a los factores de transcripción EhTBP, EhC/EBP y Ehp53. Actualmente no se conoce ni el origen ni la función de este organelo en este protozoo, por lo cual, para abordar el estudio de los mismos, hemos trabajado en su purificación y, dado que los EhkOs contienen DNA, nos dimos a la tarea de buscar una DNA polimerasa que pudiera estar relacionada con estos organelos.

La replicación del DNA de todos los seres vivos se lleva a cabo por medio de DNA polimerasas, las cuales pueden variar en su composición de polipéptidos y propiedades catalíticas (procesividad, fidelidad y tasa de extensión de la cadena). Las DNA polimerasas se agrupan en diferentes familias con base en la similitud de sus secuencias. La familia B se caracteriza por la presencia de hasta seis regiones conservadas (I a VI) e incluye a las polimerasas replicativas tipo α de eucariontes, las de arqueobacterias, las virales, las de bacteriófagos (como T4 y RB69) y las DNA polimerasas codificadas en plásmidos mitocondriales de varios hongos y plantas.

La maquinaria de replicación en *E. histolytica* es poco conocida. Investigaciones concernientes al tipo de DNA polimerasas existentes en este parásito revelaron que su actividad es inhibida con afidicolina, un inhibidor específico de las DNA polimerasas de mamífero α , δ y ε , todas ellas pertenecientes a la familia B.

Como resultado de la búsqueda de probables DNA polimerasas relacionadas con organelos mitocondriales en *E. histolytica*, en el presente trabajo identificamos una familia de cuatro genes de DNA polimerasas (*Ehodp1*, *Ehodp2*, *Ehodp3* y *Ehodp4*) que tienen similitud con DNA polimerasas codificadas en plásmidos mitocondriales de hongos y plantas. Por medio de RT-PCR observamos que los cuatro genes se expresan en los trofozoítos de manera diferencial. El análisis de las secuencias de las proteínas codificadas por los cuatro genes reveló que todas conservan los dominios catalíticos y las secuencias características que las clasifican como DNA polimerasas de la familia B.

También clonamos un fragmento del gen *Ehodp1* y lo expresamos en *E. coli* BL21(DE3) para producir la proteína recombinante (rEhODP1-168), la cual purificamos mediante cromatografía de afinidad. Con esta proteína inmunizamos ratas y obtuvimos anticuerpos específicos contra EhODP1. Por medio de inmunofluorescencia y microscopía confocal utilizando estos anticuerpos localizamos a la proteína EhODP1 en los EhkOs lo cual sugiere que EhODP1 puede estar relacionada con la replicación del DNA de EhkO. Por otro lado, empleando la técnica de PCR *in situ* se determinó la ubicación del gen en los trofozoítos y lo encontramos tanto en el núcleo como en el EhkO, lo cual nos indicó que podría existir una estrecha relación entre estos organelos.

Con el presente trabajo se generó el primer reporte acerca de la existencia de este tipo de DNA polimerasas en *E. histolytica*, cuyo estudio contribuirá al conocimiento de la biología y la evolución de este importante patógeno humano.

ABSTRACT

Entamoeba histolytica is a eukaryote that has the cytoplasmic organelles known as EhkOs. These organelles have a double membrane and contain DNA, which has been detected using acridine orange and propidium iodide staining, and also by ^3H -thymidine labeling. In addition, the EhPFO enzyme and EhTBP, EhC/EBP and Ehp53 transcription factors have been detected in these organelles. However, origin and function of this organelle remain unknown. If EhkOs have DNA, then there might be a DNA polymerase involved in their DNA replication. Therefore, we performed a search for a putative DNA polymerase that could be related to these organelles.

DNA replication in living cells is carried out by DNA polymerases, which can have differences in number of polypeptides and catalytic properties such as processivity, fidelity and DNA chain extension rates. DNA polymerases are grouped in several families based on sequence similarity. Family B is characterized by the presence of up to six conserved regions (I to VI). It includes replicative DNA polymerases of α type from eukaryotes, those from archaebacteria, some viral DNA polymerases, from bacteriophages (such as T4 and RB69 DNA polymerases), and DNA polymerases encoded in mitochondrial plasmids in some fungi and plants.

The *E. histolytica* replication machinery is poorly studied. Some research groups have found that the DNA polymerase activity is blocked by aphidicolin, a specific inhibitor of mammalian α , δ and ϵ DNA polymerases belonging to family B. In this work we report the identification of a family of four active genes (*Ehodp1*,

Ehodp2, *Ehodp3*, and *Ehodp4*) encoding putative DNA polymerases in *E. histolytica*, which showed similarity to DNA polymerases encoded in fungi and plant mitochondrial plasmids. We determined by RT-PCR that the four genes are differentially expressed in trophozoites. Sequence analysis of proteins encoded by the four genes revealed that all conserve the catalytic domain and the characteristic sequences that allowed to classify them as DNA polymerases of family B.

We also cloned and expressed a fragment of the *Ehodp1* gene in *E. coli* BL21(DE3) to produce the recombinant rEhODP1-168 polypeptide purified by affinity chromatography. This recombinant protein was used to immunize rats in order to obtain EhODP1 specific polyclonal antibodies. Anti-rEhODP1 antibodies were used for the immunolocalization of EhODP1 in EhkOs by immunofluorescence and confocal microscopy. We also determined by *in situ* PCR the localization of the *Ehodp1* in nuclei and EhkOs, which suggests a relationship between these two organelles.

From the present work, we generated the first report about this type of DNA polymerases in *E. histolytica*. The study of these molecules will contribute to the better understanding of the biology and evolution of this human pathogen.

I. INTRODUCCIÓN

1. DESCRIPCIÓN DE *Entamoeba histolytica*

1.1. Clasificación taxonómica

Entamoeba histolytica forma parte del superreino Eucariota, reino Protista, subreino Protozoa, filum Sarcomastigofora, subfilum Sarcodina, superclase Rhizopoda (protozoos formadores de pseudópodos), de la clase Lobosea, del orden Amoebida, la familia Entamoebidae, género *Entamoeba* y especie *histolytica* (Ravdin, 1986; Martínez -Palomo, 1987).

1.2. Importancia en Salud

El protozario parásito *Entamoeba histolytica* es el agente causal de la amibiasis intestinal humana. La organización mundial de la salud reportó que alrededor de 500 millones de seres humanos se encuentran infectados con este microorganismo y que alrededor de 100,000 personas mueren anualmente como consecuencia de esta parasitosis (WHO, 1997). Se calcula que ocupa el segundo lugar en las muertes de origen parasitario en el mundo, sólo superada por la malaria (Petri, 1999).

Esta enfermedad se encuentra con alta frecuencia en países en vías de desarrollo, está relacionada con la pobreza, la ignorancia, malas condiciones sanitarias, con el hacinamiento y la desnutrición (Sepúlveda, 1982). La amibiasis está

ampliamente distribuida en el mundo, siendo la India, Sur y Oeste de África, Lejano Oriente y Sur y Centro América, las áreas con mayor incidencia (Ravdin, 1995).

En México la amibiasis constituye un serio problema de salud pública, ya que está dentro de las diez primeras causas de mortalidad infantil por problemas gastrointestinales (Conde-Bonfil y Mor-Zherpa, 1992). El sistema nacional de vigilancia epidemiológica reportó en el año 2005 una variación en las frecuencias de los casos de amibiasis del 23 al 57%, empleando diferentes técnicas de diagnóstico y varios subgrupos poblacionales. En 2009, los estados de Tabasco, Oaxaca, Guerrero y Yucatán ocuparon los primeros lugares en índice de amibiasis intestinal. Además, se ha observado un aumento en la formación de abscesos hepáticos, presentándose con mayor incidencia en los estados de Oaxaca, Tabasco y Guerrero (<http://www.dgepi.salud.gob.mx/sinave/sinave1.htm>).

1.3. Ciclo de vida

En el ciclo de vida de *E. histolytica* se distinguen dos fases principales, una de quiste y otra de trofozoíto (Fig. 1). El quiste es la forma infectiva del parásito. Mide generalmente de 12 a 15 μm de diámetro (Clark y Diamond, 1992), es esférico y está rodeado de una pared quitinosa que lo protege del medio ambiente; es tetranucleado y cada núcleo posee un cariosoma central (Fig. 2a). La infección se inicia por la ingestión de los quistes presentes generalmente en alimentos y agua contaminados con heces fecales. Una vez en el intestino, se realiza el proceso de desenquistamiento, cuya inducción inicia en el estómago por el pH ácido. En el desenquistamiento se origina un protoplasto desnudo tetranucleado. Cada uno de los

núcleos sufre un proceso de división y el protoplasto se divide inmediatamente para originar ocho trofozoítos metaquísticos uninucleados. Estos trofozoítos migran al ciego, donde se adhieren a la mucosa y sufren un proceso de maduración para dar lugar a trofozoítos activos que colonizan la mucosa intestinal. Finalmente, los trofozoítos forman quistes que son eliminados en la materia fecal, pudiendo infectar a otros individuos completando el ciclo de vida (Fig. 1) (Ravdin, 1986; Ravdin, 1995). Los trofozoítos pueden también eventualmente pasar a otros órganos como el hígado y el cerebro (Guerrant, 1986).

1.4. Estructura del trofozoíto

El trofozoíto amibiano varía entre 10 y 60 μm y más frecuentemente entre 15 y 30 μm (Fig. 2b). Es una célula pleomórfica muy dinámica cuya forma y movilidad es altamente sensible a los cambios de su microambiente, como la temperatura, el pH, la osmolaridad y el potencial redox (Pumarola y col., 1991).

1.4.1. El núcleo de *E. histolytica*

El núcleo tiene de 4 a 7 μm de diámetro. Por microscopía electrónica de transmisión y criofractura se distingue la organización de la membrana nuclear como una bicapa lipídica y cuya lámina nuclear es igual a la de otros eucariontes. La masa de cromatina se halla distribuida generalmente en forma periférica y un cariosoma central (Fig. 2c) pero en ocasiones se puede encontrar adherida a la cara interna de la membrana nuclear (Martínez-Palomo, 1982). Por la parte interna de la membrana nuclear se localiza la pericromatina que es una estructura granular con alto contenido

de RNA (Pan y German, 1955; Torres-Guerrero y col., 1991). Esta pericromatina es activa en la síntesis de RNA y además, cuando los trofozoítos se crecen en medio de cultivo suplementado con ^3H -Timidina se observa la incorporación de la marca en todo el núcleo indicando que la pericromatina también tiene DNA (Albach y col., 1977).

1.4.2. La membrana y el citoplasma

Los trofozoítos se caracterizan por tener una membrana plasmática muy dinámica y que se recambia constantemente por endo y exocitosis, la cual tiene una composición colesterol-fosfolípidos muy parecida a la de otras membranas celulares típicas; sin embargo, la composición lipídica de las membranas de las vesículas internas es diferente a la membrana externa. Así, la fosfatidilcolina (FC) predomina en las membranas vesiculares junto con la fosfatidiletanolamina (FE), mientras que la membrana plasmática es deficiente en FC y FE y está enriquecida con ceramida aminoetil-fosfonato, fosfolípido que es resistente a la fosfolipasa. Presenta en el citoplasma numerosas vacuolas circulares de 0.5 a 0.9 μm las cuales están delimitadas por una membrana bien definida de 17 nm (Proctor y Gregory, 1973). Estas vacuolas pueden ser fagocíticas, macro o micropinocíticas, lisosomas primarios o secundarios, cuerpos residuales y vacuolas autofágicas (Martínez-Palomo, 1989).

No obstante, *E. histolytica* carece de un aparato de Golgi y un retículo endoplásmico rugoso bien definidos, característicos de las células eucariontes. En los trofozoítos han sido identificadas estructuras vesiculares que muestran

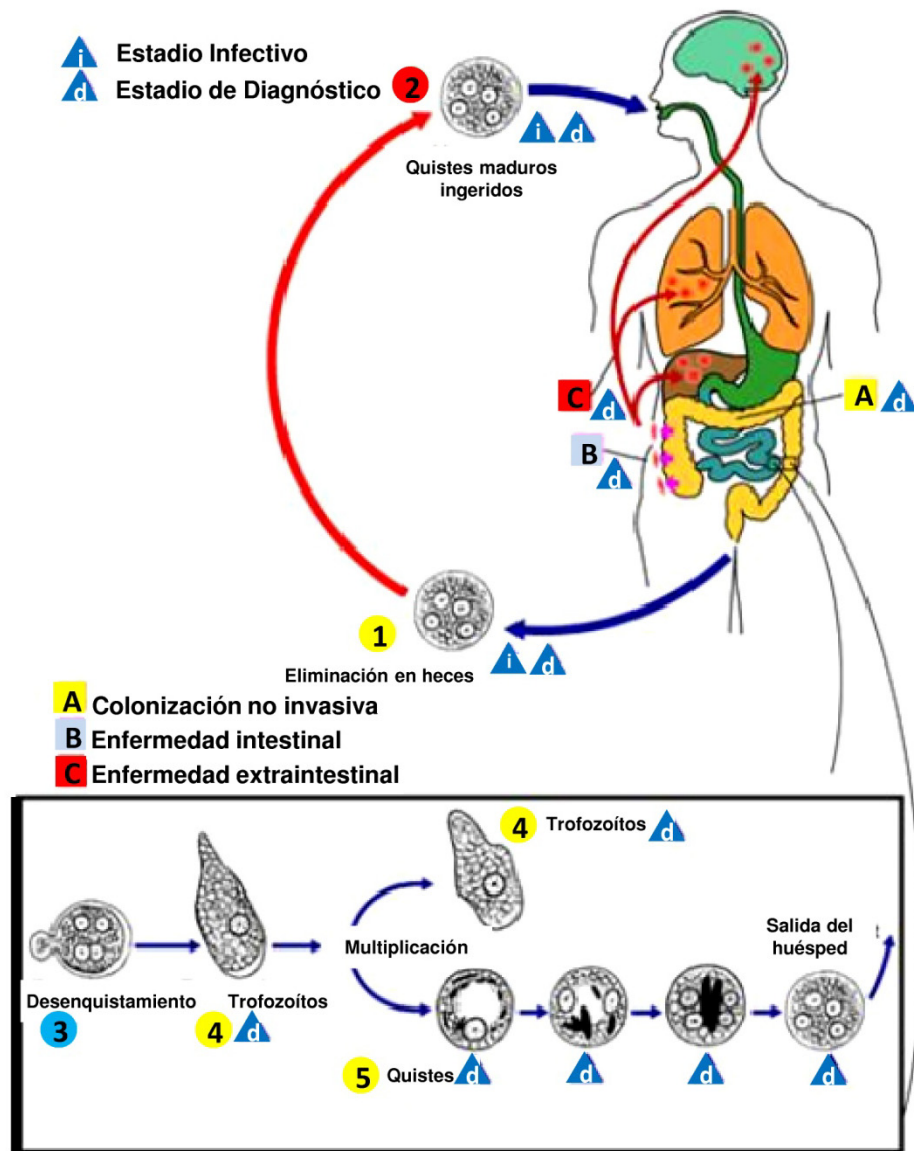


Figura 1. Ciclo de vida de *Entamoeba histolytica*. 1. Los quistes contaminan a alimentos y agua. 2. Infección por quistes maduros presentes en agua y alimentos contaminados. 3. El desenquistamiento inicia en la primera porción del colon. Un trofozoíto con cuatro núcleos emerge y se divide para producir ocho trofozoítos uninucleados a partir de cada quiste. 4. Los trofozoítos se multiplican por fisión binaria y pueden crecer y multiplicarse sin producir síntomas (A) o pueden invadir la mucosa intestinal produciendo la disentería amibiana (B). Se puede presentar la infección extraintestinal cuando los trofozoítos migran a través de la sangre, infectando órganos como el hígado, cerebro y pulmones (C). 5. Proceso de enquistamiento que involucra la formación secuencial de un quiste inmaduro, un quiste binucleado en proceso de maduración y un quiste tetranucleado maduro, el cual sale del huésped en las heces y puede infectar a más personas (Modificado del Centers for Disease Control and Prevention, USA, www.cdc.gov).

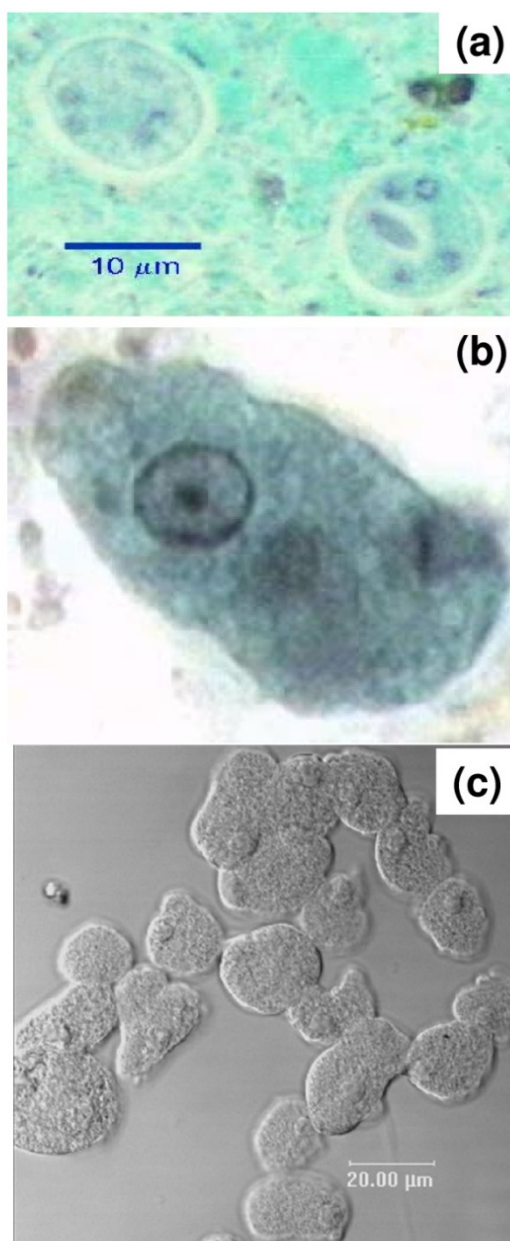


Figura 2. Morfología de *Entamoeba histolytica*. (a) Quistes con 4 núcleos visibles donde también puede observarse un cuerpo “cromatoide” elíptico. (b) En el núcleo de un trofozoíto se observa una cromatina periférica distribuida uniformemente y un pequeño cariosoma localizado en el centro. (c) Diferentes tamaños y morfologías de trofozoítos amibianos observados por microscopía de luz. (a) y (b) Fueron tomadas del Atlas of Medical Parasitology (<http://www.cdfound.to.it/html/enta3.htm>). (c) Imágenes obtenidas en el presente trabajo.

marcadores y actividades enzimáticas de estos organelos eucarióticos, si bien, con una apariencia diferente (Mazzuco y col., 1997; Ghosh y col., 1999).

2. GENES Y PROTEÍNAS MITOCONDRIALES EN *E. histolytica*

E. histolytica es un eucarionte que ha sufrido una pérdida secundaria de la mitocondria (Clark y Roger, 1995; Bakatselou y col., 2003). A pesar de que en su genoma no se han encontrado secuencias que codifiquen para enzimas del ciclo de los ácidos tricarboxílicos y de la cadena respiratoria (Loftus y col., 2005), este parásito posee diferentes genes que codifican proteínas relacionadas con mitocondrias.

El gen *hsp70* de tipo mitocondrial se detectó en los trofozoítos amibianos y se ha clonado y secuenciado (Bakatselou y col., 2000; Arisue y col., 2002). El gen *hsp60* que codifica para la chaperonina mitocondrial Hsp60/Cpn60, también fue clonado y se demostró que fue capaz de complementar mutantes en *groEl* en *Escherichia coli* (Mai y col., 1999); además, se reportó la caracterización del gen que codifica para la chaperonina Cpn10, la cual es la pareja funcional de Cpn60 (van der Giezen y col., 2005).

En los trofozoítos se ha detectado la actividad de la enzima nicotinamida nucleótido transhidrogenasa que cataliza reversiblemente el intercambio de hidrógeno entre el NADP⁺ y el NAD⁺, posteriormente se clonó el gen que codifica para la piridina nucleótido transhidrogenasa (PNT) (Harlow y col., 1976; Clark y Roger, 1995). También se ha reportado la presencia de la coenzima Q (ubiquinona),

la cual transporta electrones en la cadena de transferencia de electrones asociada a la membrana de las mitocondrias, en otras membranas y en bacterias (Ellis y col., 1994).

En 1996 se clonó el gen amibiano que codifica para la piruvato:ferredoxina oxidorreductasa (PFO) (Rodríguez y col., 1996) y posteriormente la proteína EhPFO fue detectada con anticuerpos policlonales en estructuras citoplásmicas en los trofozoítos (Rodríguez y col., 1998). Esta enzima, la cual cataliza la descarboxilación oxidativa del piruvato en microorganismos fermentativos (Bui y col., 1996; Müller, 1997), ha sido localizada en los hidrogenosomas en *Trichomonas vaginalis*, los cuales tienen un origen evolutivo común con las mitocondrias (Williams y col., 1987; Bui y col., 1996; Müller, 1997; Embley y col., 2003).

3. ORGANELOS CON CARACTERÍSTICAS MITOCONDRIALES EN *E. histolytica*

En *E. histolytica* se han identificado algunos organelos con características especiales y que los relacionan con mitocondrias, los cuales se describen a continuación.

3.1. EhkO

EhkO es un organelo citoplásmico en el cual se ha detectado la presencia de DNA manejando diferentes técnicas, como tinción con el colorante naranja de acridina, por tinción con yoduro de propidio, por marcaje con timidina tritiada y

autorradiografía, y sombreado con platino-carbón, empleando técnicas de microscopía óptica, confocal y electrónica (Orozco y col., 1997; Solis y col., 2002; Luna-Arias y col., 2003) (Fig. 3). Orozco y col. (1997) obtuvieron el DNA a partir de una fracción enriquecida con EhkOs y observaron que el DNA está formado por redes con un tamaño aproximado de $14.5 \times 4 \mu\text{m}$ compuestas de cientos de minicírculos de 0.4 a 0.8 kb y algunos “loops” de DNA. Dado que estas estructuras son semejantes a la estructura del DNA del cinetoplasto de los tripanosomátidos, se nombró a este organelo como *Entamoeba histolytica* kinetoplast-like organelle o “EhkO” (Orozco y col., 1997).

Se ha observado que los EhkOs miden entre 1 y $5 \mu\text{m}$ de diámetro (Orozco y col., 1997; Rodríguez y col., 1998; Luna-Arias y col., 2003), tienen una membrana morfológicamente diferente a la membrana nuclear y contienen material electrondenso con una distribución transversal, parte del cual puede corresponder a DNA, mientras que el núcleo tiene una distribución al centro y en la periferia (Fig. 3d) (Solis y col., 2002).

Los EhkOs están compuestos por vesículas de 0.1 a $1 \mu\text{m}$ de diámetro, que contienen DNA y que se asocian entre sí para formar EhkOs de diferentes tamaños (Solis y col., 2002; Luna-Arias y col., 2003).

Utilizando anticuerpos contra proteínas heterólogas se han detectado en los EhkOs a los factores de transcripción nuclear C/EBP y p53 (Marchat y col., 2003; Mendoza y col., 2003) y empleando anticuerpos contra proteínas amibianas recombinantes se han inmunolocalizado también a la proteína de unión a la caja TATA (TBP) (Luna-Arias y col., 1999), a la ATPasa vacuolar (Melendez y col., 2008) y a la

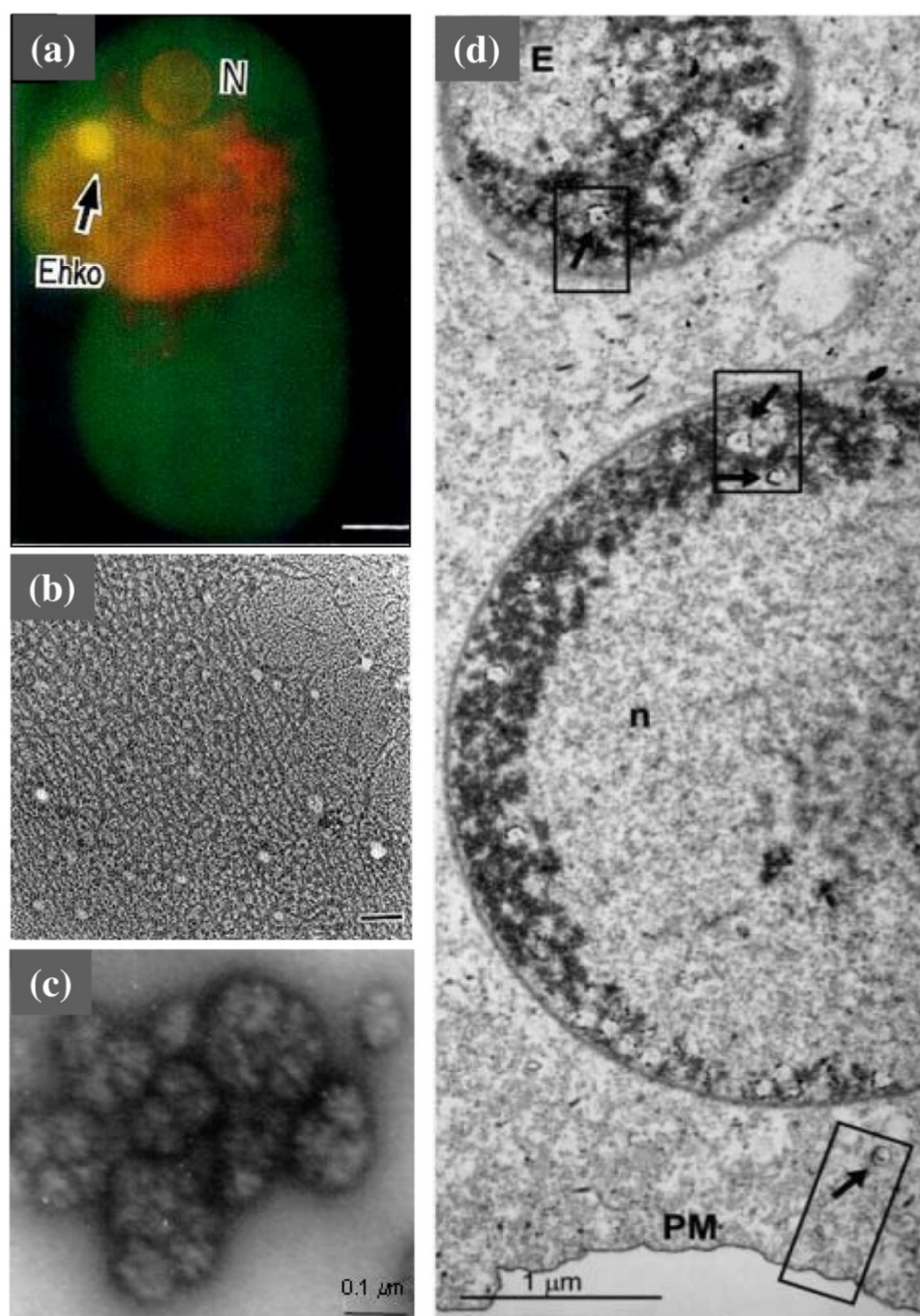


Figura 3. Identificación del EhkO en trofozoítos de *E. histolytica*. (a) Microscopía de fluorescencia de trofozoítos teñidos con naranja de acridina. (b) Microscopía electrónica de transmisión (MET) del DNA aislado a partir del EhkO. (c) EhkOs con cuerpos electrondensos detectados por tinción con acetato de uranilo y microscopía electrónica de transmisión. (d) Trofozoíto observado por MET, los cuadros enmarcan vesículas conteniendo DNA y la membrana de EhkO, nuclear y citoplásmica (Modificado de Solis y col., 2002; Luna-Arias y col., 2003).

ornitina descarboxilasa (Terán-Figueroa y col., 2009), esta última es una enzima involucrada en la biosíntesis de las poliaminas.

Por otro lado, el EhkO se ha detectado con una sonda de DNA ribosomal (rDNA) 16S en experimentos de hibridación *in situ* (Báez-Camargo y col., 1997). Además, este organelo se tiñe con el colorante mitocondrial MitoTracker green y es reconocido por anticuerpos policlonales dirigidos contra la enzima (PFO) (Rodríguez y col., 1998). PFO se encuentra también en los hidrogenosomas de *Trichomonas vaginalis*, como se mencionó anteriormente (Williams y col., 1987; Bui y col., 1996; Müller, 1997; Embley y col., 2003). *E. histolytica* carece de hidrogenosomas y no obstante la presencia de PFO en los EhkOs se desconoce si existe una relación entre estos dos organelos.

3.2. Criptón

Criptón es un organelo citoplásmico con un tamaño que va de 0.5 a 1 μm que fue reportado por Mai y col. (1999). Estos autores clonaron el gen *hsp60* de *E. histolytica*, el cual codifica para la chaperonina mitocondrial Hsp60 (Cpn60), lo expresaron y obtuvieron anticuerpos contra esta proteína, con los cuales localizaron a este organelo citoplásmico (Fig. 4) y demostraron también que el gen *hsp60* de *E. histolytica* es capaz de complementar a mutantes en *groEl* de *E. coli*.

Posteriormente, utilizando diferentes fluorocromos de unión a DNA y con anticuerpos monoclonales dirigidos contra DNA de doble cadena, se demostró la presencia de DNA en estos organelos y utilizando la técnica de microscopía

electrónica de transmisión (MET) se observó que los criptones están rodeados por una doble membrana (Fig. 4) (Ghosh y col., 2000).

3.3. Mitosoma

Tovar y col. (1999) clonaron el gen *cpn60*, lo expresaron y utilizaron la proteína recombinante para generar anticuerpos con los cuales localizaron a la chaperonina mitocondrial Cpn60 en una estructura citoplásmica con un diámetro de 1 a 2 μm , a la cual llamaron Mitosoma (Fig. 5). En este organelo no se ha detectado la presencia de DNA y es considerado como una “reminiscencia” mitocondrial, con base en que la proteína Cpn60 presente en los mitosomas tiene un extremo amino-terminal que evoca las señales de direccionalidad de proteínas mitocondriales y de hidrogenosomas, y al ser eliminados 15 aminoácidos de este extremo se ha observado una acumulación de la proteína en el citoplasma (León-Avila y Tovar, 2004). Este fenotipo mutante es revertido al reemplazar estos aminoácidos con las señales de direccionalidad mitocondrial de HSP70 de *Trypasonoma cruzi* (Tovar y col., 1999).

4. REPLICACIÓN DEL DNA EN EUKARIOTES

La replicación del DNA está funcionalmente conservada en los seres vivos. Esta se realiza de manera semiconservativa, es decir, cada hebra de la doble hélice de DNA es utilizada como molde para la síntesis de la nueva cadena, de tal suerte que después de este proceso, cada célula hija tiene una doble cadena formada por

una hebra proveniente de la madre y la otra sintetizada *de novo* (Watson y col., 2004). El proceso de replicación del DNA es un evento complejo que involucra la participación de docenas de proteínas que interaccionan entre sí, asegurando que la información genética sea duplicada de manera segura. Para que esto ocurra, se requiere de una fase previa de licencia o preinicio de la replicación, la cual es seguida del proceso en sí de la replicación del DNA.

4.1. Orígenes de replicación.

Los sitios en el DNA donde inicia la replicación, llamados orígenes de replicación, no se encuentran distribuidos al azar en un cromosoma. Su estructura y complejidad varían de acuerdo con la especie (Fig. 6). Uno de los sistemas más estudiados es *Saccharomyces cerevisiae*, el cual presenta secuencias altamente conservadas en sus orígenes de replicación (Ori). Los Ori's de levaduras se conocen como secuencias autónomas de replicación o "ARS" ("Autonomous Replication Sequences"), pueden dirigir la replicación de plásmidos que los contengan y son ricas en A-T. En promedio miden alrededor de 150 pb y en general incluyen los elementos de reconocimiento del origen tales como las secuencias consenso del ARS o ACS ("ARS consensus sequence"), elementos que excluyen a los nucleosomas y elementos que facilitan el desdoblamiento del DNA o DUEs ("DNA Unwinding Elements") (Fig. 6). En el caso de levaduras que geman como *Saccharomyces cerevisiae*, los elementos A (ACS) y B1 permiten la unión del complejo de reconocimiento del origen u ORC (del inglés, "Origin Recognition Complex") y los elementos B2 y B3 corresponden a los DUEs (Fig. 6). El elemento A

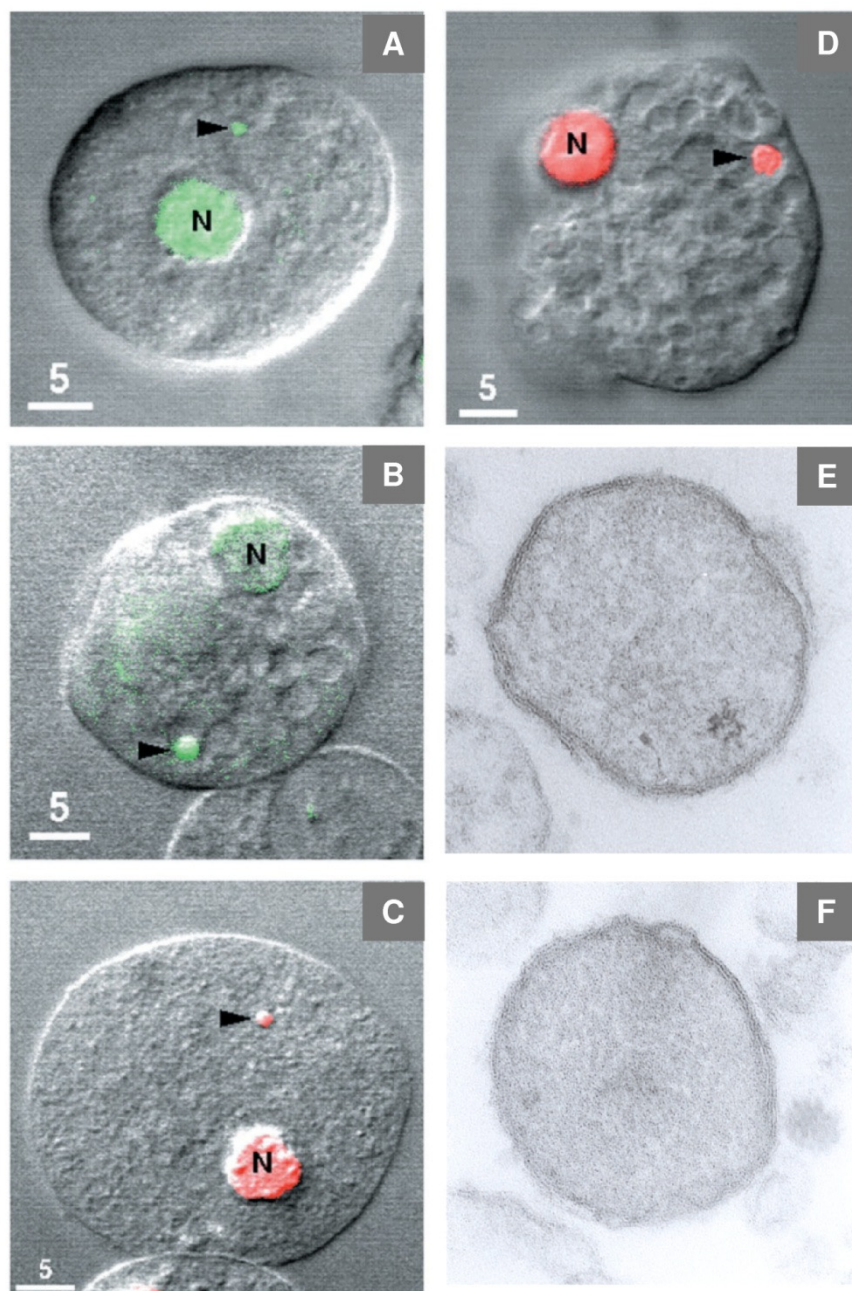


Figura 4. Identificación del cripton en trofozoítos de *E. histolytica*. Los trofozoítos de *E. histolytica* se tiñeron con fluorocromos que se unen a DNA y se observaron por microscopía confocal: Sytox green (**A**), naranja de acridina (**B**), yoduro de propidio (**C**). También se tiñeron con un anticuerpo monoclonal dirigido contra dsDNA (**D**). Fotomicrografías de microscopía electrónica de transmisión de criptones que muestran que están rodeados por una doble membrana (**E**, **F**) a una amplificación de 125,000X. N, núcleos; Flechas, criptones (Modificado de Ghosh y col., 2000).

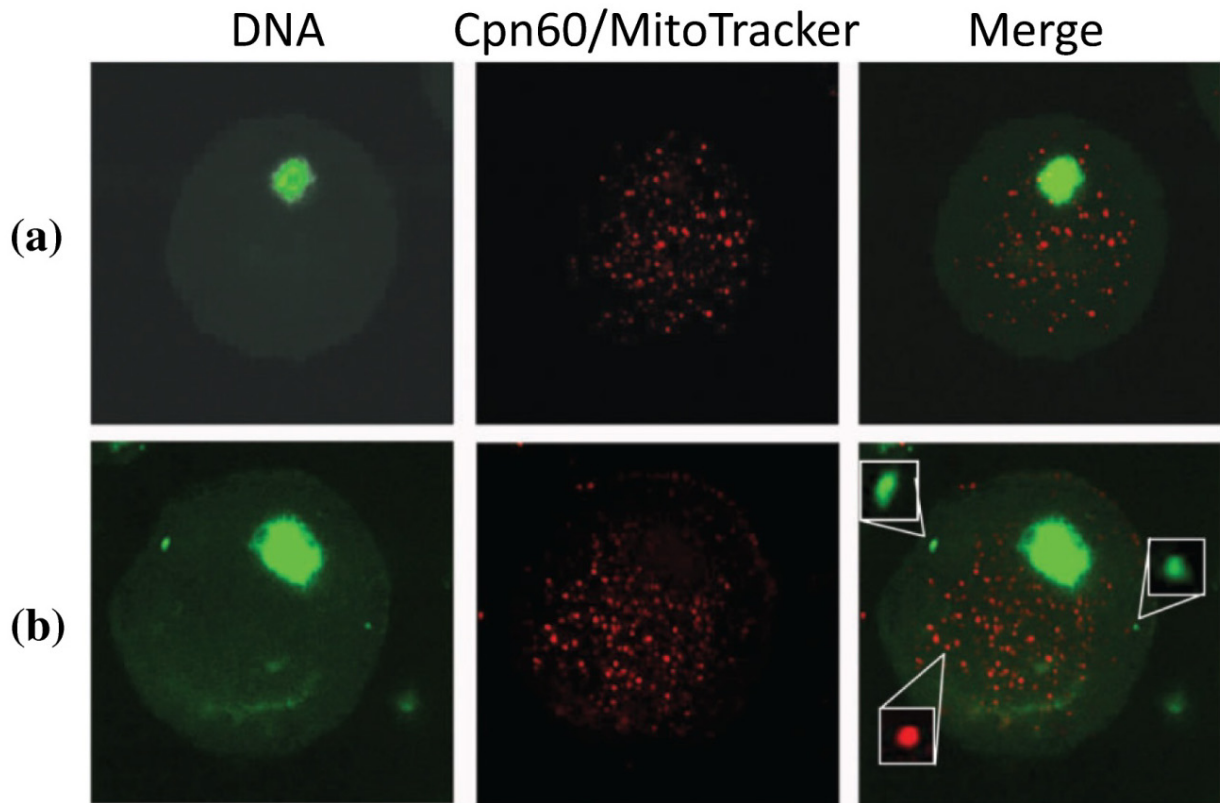


Figura 5. Identificación de los mitosomas en trofozoítos de *E. histolytica*. Se realizó la detección de DNA en trofozoítos de *E. histolytica* mediante “nick-translation” *in situ*, utilizando dATP biotinilado, estreptavidina-FITC, MitoTracker Red y microscopía confocal. Adicionalmente, los trofozoítos fueron fijados y tratados con anticuerpos anti-Cpn60. **(a)** Trofozoíto representativo donde no se detectó DNA extranuclear (> 65% de la población celular). **(b)** Un trofozoíto representativo de las células donde se detecta el DNA extranuclear (< 35% de la población celular). Los insertos en la sobreposición de las señales de fluorescencia muestran magnificaciones asistidas por computadora que remarcan la falta de colocalización entre el DNA y Cpn60 (Tomado de León-Ávila y Tovar, 2004).

contiene la secuencia esencial de 11 pb (A/T)TTTAYRTTT(A/T) donde Y es cualquier pirimidina y R es cualquier purina. El elemento B1 es variable y es un elemento importante para la iniciación de la replicación. El elemento B2 no es conservado, varía en longitud y permite la interacción de otros elementos del complejo de preinicio de la replicación. El elemento B3 de ARS1 permite la asociación al factor de transcripción y de replicación Abf1 (Aladjem y col., 2006). Los Ori's en las levaduras que se reproducen por fisión como *Schizosaccharomyces pombe* son secuencias ricas en A-T; si están presentes en plásmidos dirigen su replicación y no tienen una secuencia consenso. Sus tamaños varían entre 500 y 1,000 pb (Aladjem y col., 2006). Sin embargo, a pesar de que no son conservados, se han podido identificar algunos elementos importantes que afectan la actividad del Ori (Fig. 6). Estas secuencias que se requieren son ricas en A-T pero son asimétricas, con regiones ricas en A's en una cadena y T's en la otra (Aladjem y col., 2006).

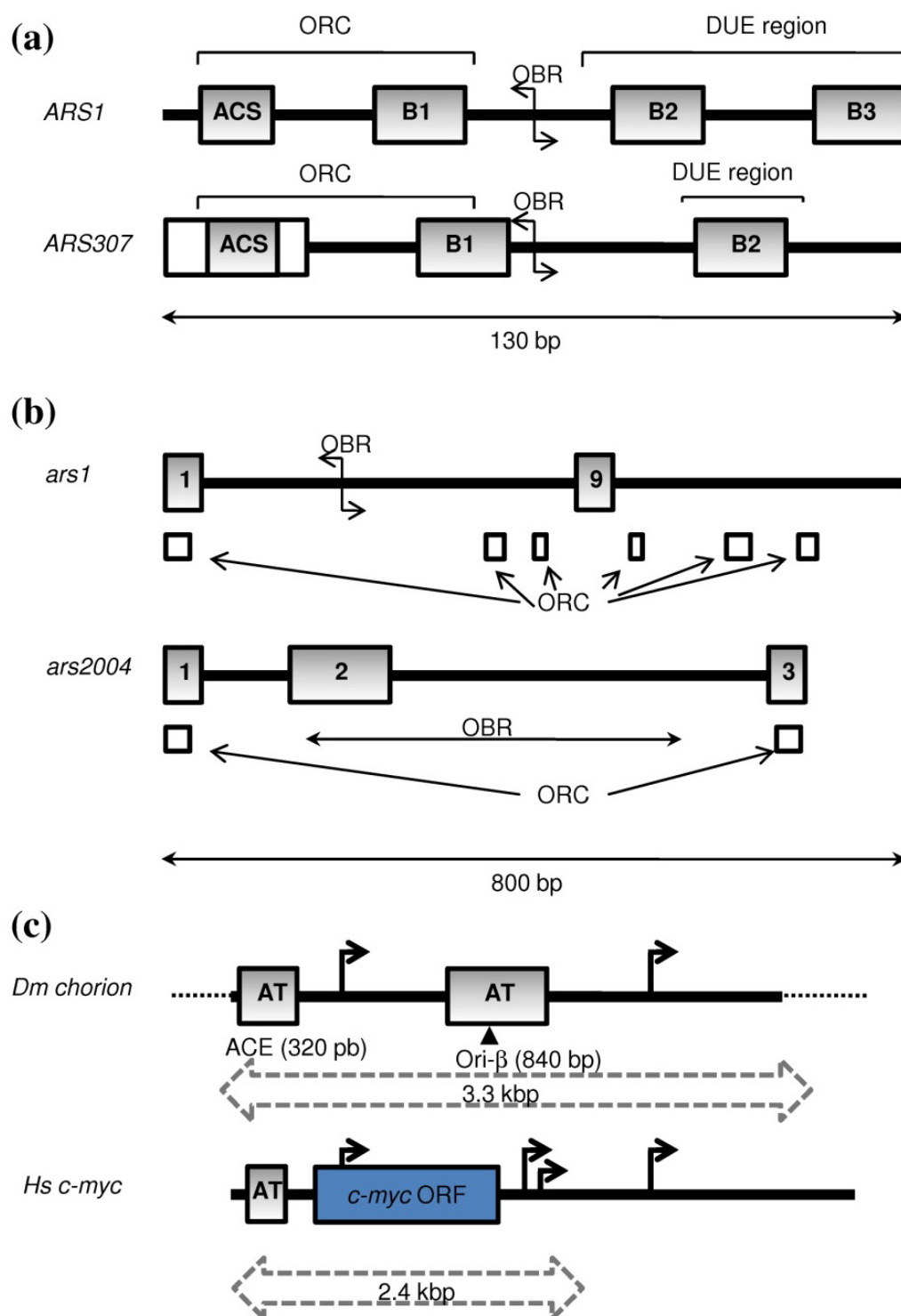
Una característica que se ha observado hasta el momento en los orígenes de replicación de los metazoarios es la carencia de motivos comunes a todos los orígenes, aunque esto se debe de tomar con reserva porque sólo se han analizado algunos Ori's en el humano, los cuales son muy pocos si consideramos que se estima que debe de haber unos 30,000 Ori's. Además, un análisis de alrededor de 490 secuencias de *Drosophila* que unen a ORC reveló que no hay secuencias comunes (Aladjem y col., 2006). Los Ori's de los organismos multicelulares miden de 2 a 55 kb, no tienen secuencias conservadas y en general son ricos en A-T. Se ha visto que esta regiones ricas en A-T para algunos Ori's presentan trectos de A-T asimétricas, como en el caso del gen *DHFR* (Dihidrofolato reductasa) de hámster, y

LMNB2 (lamina B2) y *DHFR* de humano, entre otros (Aladjem y col., 2006). También pueden contener sitios de adhesión a la matriz nuclear, los cuales son ricos en regiones A-T. También pueden contener islas CpG, las cuales colocan con promotores, particularmente de genes “housekeeping” que se transcriben en tasas altas y que corresponden a regiones de la cromatina abierta (heterocromatina). Adicionalmente, pueden contener elementos de control transcripcional, ya que los Ori’s de metazoarios tienden a localizar en regiones intergénicas (Fig. 6). Por ejemplo, las islas CpG unen Sp1, ACE de *Drosophila* y *MCM4* y *MYC* de humano unen E2F, entre otros ejemplos (Aladjem y col., 2006). Finalmente, el estado topológico del DNA y estructuras de DNA inusuales, como el estado de superenrollamiento negativo del DNA y secuencias palindrómicas, respectivamente, favorecen la unión del ORC (Aladjem y col., 2006).

4.2. Licencia para la replicación

Durante esta fase se forma el complejo de pre-replicación o Pre-RC (Fig. 7), cuyo ensamblaje en los eucariontes involucra al menos quince proteínas diferentes que se unen secuencialmente a la cromatina. La formación del complejo es iniciado por el reconocimiento del origen de replicación en el DNA por el ORC. ORC es un complejo multiproteico formado por seis subunidades (ORC1 a ORC6), que se une al origen de replicación de una manera dependiente de ATP. Durante la fase G1 del ciclo celular, cuando los niveles de CDKs específicas de la fase de síntesis del DNA o fase S son bajos, el ORC recluta a Cdc6 y Cdt1. Una molécula de Cdc6 y una de Cdt1 se unen a cada cadena de DNA. Posteriormente, se recluta a MCM2-7 (“Mini

Figura 6. Estructura de algunos orígenes de replicación eucarióticos. (a) Elementos funcionales de algunos replicadores de *Saccharomyces cerevisiae*. El elemento A incluye al elemento esencial ACS más algunos nucleótidos en cajas adyacentes. También se muestran los elementos B1, B2 y B3. Las regiones que son unidas por el complejo de reconocimiento del origen de replicación u ORC se señalan con líneas, así como los elementos de desdoblamiento del DNA o DUEs. **(b)** Replicadores en *Schizosaccharomyces pombe*. Las regiones que se requieren fuertemente están enmarcadas y numeradas. Las regiones que interaccionan con el ORC se señalan en pequeños rectángulos. Las posiciones de los orígenes de replicación bidireccional u OBR's se señalan en la figura. **(c)** Secuencias características de algunos replicadores de metazoarios. Las regiones que contienen regiones ricas en A-T se encuentran enmarcadas. Las posiciones de los OBR's también se indican con flechas bidireccionales. Los promotores de genes se ubican con flechas que indican la orientación de la transcripción. El ORF codificado por el gen *c-myc* de humano se indica gráficamente (Modificado de DePamphilis, 2006).



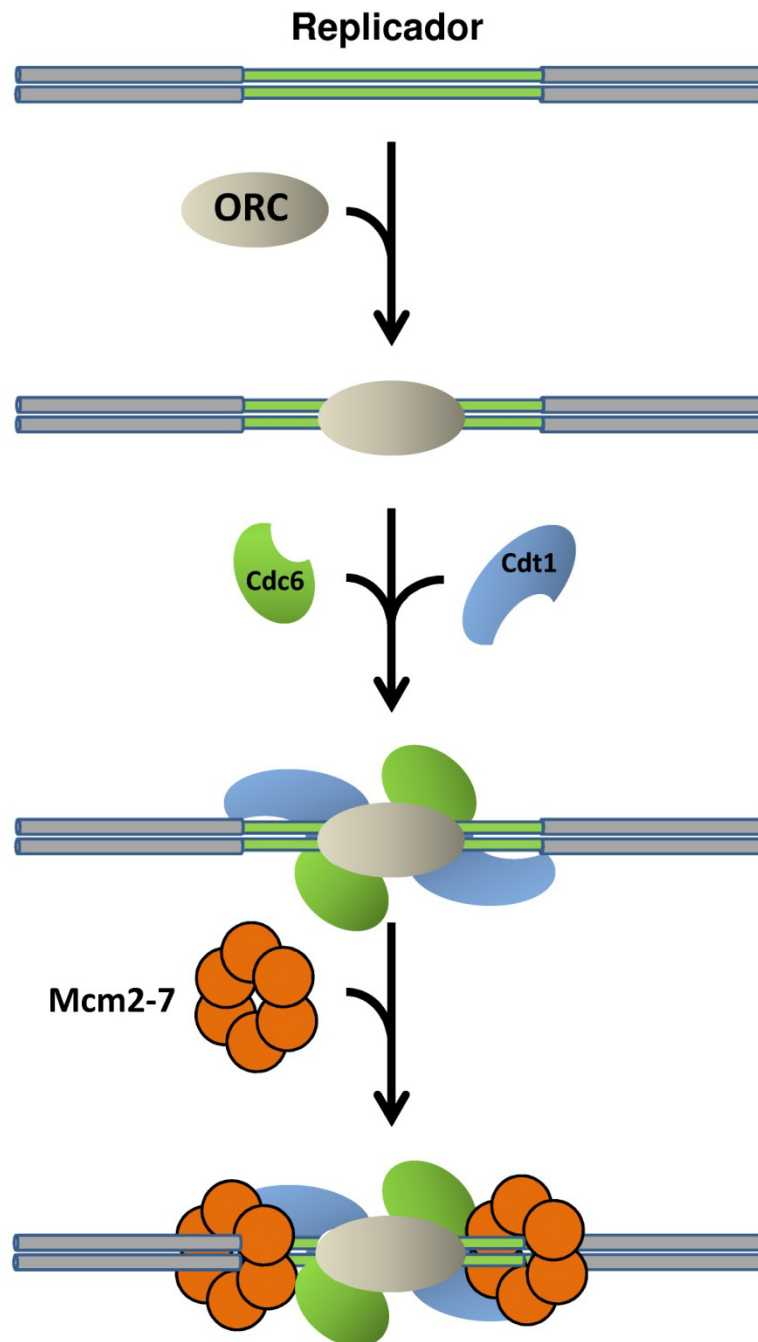


Figura 7. Etapas de la formación del complejo de pre-replicación (Pre-RC). El ensamble del Pre-RC es proceso ordenado que inicia con la unión del complejo de reconocimiento del origen de replicación (ORC) al origen de replicación o replicador, seguido de la incorporación de Cdc6 y Cdt1 que permiten el ensamble del complejo MCM2-7 para tener finalmente estructurado el Pre-RC (Watson y col., 2004).

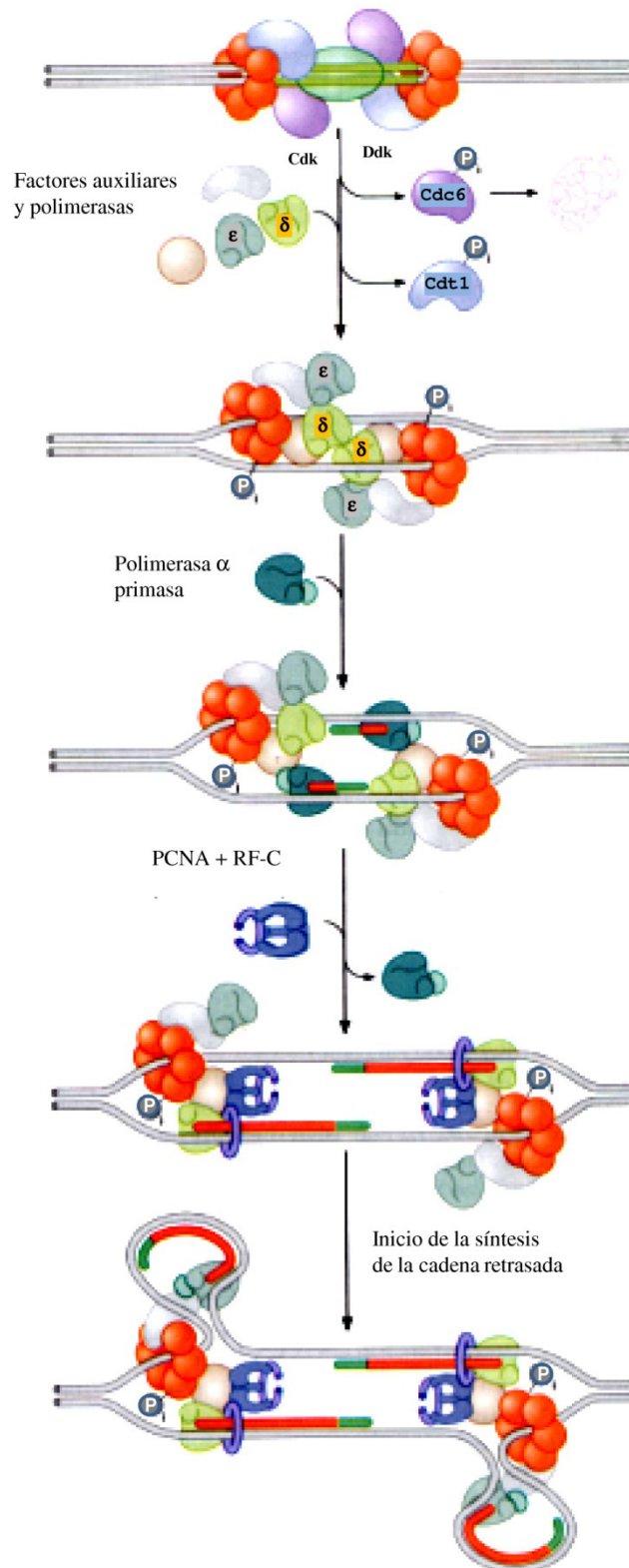
Chromosome Maintenance Complex” o complejo de mantenimiento de minicromosoma). Cdc6 y Cdt1 interactúan entre sí e inhiben la actividad de helicasa de DNA de MCM2-7 mediante interacciones proteína-proteína. MCM2-7 es un complejo formado por seis subunidades que forman una estructura en anillo. El análisis de complejos de pre-replicación *in vitro* e *in vivo* ha revelado la presencia de múltiples complejos MCM2-7 en cada origen, dependiendo de la especie, con relaciones de 10:1 a 40:1, aunque su función se desconoce. Las proteínas MCM4, MCM6 y MCM7 parecen tener la actividad de helicasa, mientras que MCM2, MCM3 y MCM5 parecen actuar como inhibidoras de esta actividad de helicasa. Una vez que estas proteínas están ensambladas en el origen de replicación se ha constituido el complejo de pre-replicación o Pre-RC.

La siguiente etapa consiste en una serie de eventos dependientes de ATP para lo cual se requiere de la participación de las proteínas cinasas activadas en la fase S (CDK y DDK) y no menos de seis factores auxiliares (Mcm10, Dbp11, Sld2, GINS, Cdc45 y Sld3) (Fig. 8). GINS (Go, Ichi, Nii, and San, que significan cinco, uno, dos y tres en japonés, respectivamente) consiste de Sld5, Psf1, Psf2, and Psf3, las cuales están altamente conservadas en eucariontes. S-CDK dispara la fase S y fosforila a Cdc6, la cual tiene dos destinos, uno ser ubiquitinado en el núcleo de manera dependiente de SCF y su posterior translocación al citoplasma para su degradación por el proteasoma, y la segunda posibilidad es que sea translocado fuera del núcleo y que su degradación sea mediada por APC (“Anaphase Promoting Complex”) en la mitosis mediante la ubiquitinación y degradación en el proteasoma. Por otra parte Cdt1 es primariamente inhibida por la geminina que incrementa su

concentración desde el inicio de la fase S hasta la mitosis. Posteriormente es fosforilada por CDKs y después degradada en el proteasoma mediante la ubiquitinación mediada por Skp2 en la fase S. Las inactivaciones de Cdc6 y Cdt1, y por tanto la carencia de interacciones proteína-proteína con MCM2-7, hacen que este complejo se vuelva activo, con la que se separan las dos cadenas de DNA en la región del origen de replicación, permitiendo la asociación de Dpb11 y su interacción con Sld2, las cuales se requieren para la unión de GINS y Cdc45.

GINS, al igual que Cdc45, pueden funcionar como factores auxiliares para la helicasa replicativa del DNA (Walter JC y col., 2006). Cdc45 es esencial para la replicación y requiere de Sld3, Cdc7, Dpb11, Geminina, CDKs, Mcm10 y GINS para su ensamble en el Pre-RC (Walter JC y col., 2006). En levaduras, RPA, la proteína que se une a la cadena sencilla de DNA y que es equivalente a la SSB procariótica, es necesaria en el Pre-RC para que se asocie Cdc45, aunque en *Xenopus* es dispensable. Posteriormente, se integra al complejo la DNA polimerasa ϵ para formar lo que se conoce como complejo de pre-recargado o Pre-LC ("Pre-Loading Complex"), el cual coopera con Cdc45-Sld3 para activar la helicasa. Finalmente se ensamblan la DNA polimerasa α (DNAPol α), el antígeno nuclear de proliferación celular o PCNA, el cual es un factor homotrimérico, la DNA polimerasa δ (DNAPol δ) y el factor de replicación C o RFC, que es un complejo heteropentamérico con actividad de ATPasa que se requiere para depositar a PCNA alrededor del iniciador, conformando así el complejo de pre-inicio de la replicación o Pre-IC ("Pre-Initiation Complex") (Fig. 8) (Sivrapasad, U., y col., 2006).

Figura 8. La activación del Pre-RC conduce a la formación de las horquillas de replicación eucarióticas. Conforme la célula entra a la fase S, Cdk y Ddk fosforilan a Cdc6 y Cdt1, lo que dispara el inicio de la replicación. Esto activa MCM y se permite el reclutamiento de los demás elementos del complejo de replicación como RPA (que se une a la cadena sencilla), DNAPol ϵ , DNAPol δ , DNAPol α (la cual se encarga de la síntesis del “primer” de RNA), RP-C (que ubica a PCNA en el híbrido “primer”-DNA molde), PCNA (que aumenta la procesividad de las DNAPols δ y ϵ), entre otros factores. Obsérvese que la replicación es bidireccional. Para mayores detalles véase el texto (Watson y col., 2004).



El genoma es duplicado sólo una vez cada que se divide la célula. Esto se logra mediante la inactivación de los complejos pre-replicativos después de que inicia la fase S, y la inhibición del ensamblaje de nuevos Pre-RCs hasta que se complete la mitosis y esté presente la membrana nuclear (DePamphilis y col., 2006).

4.3. Proceso de replicación

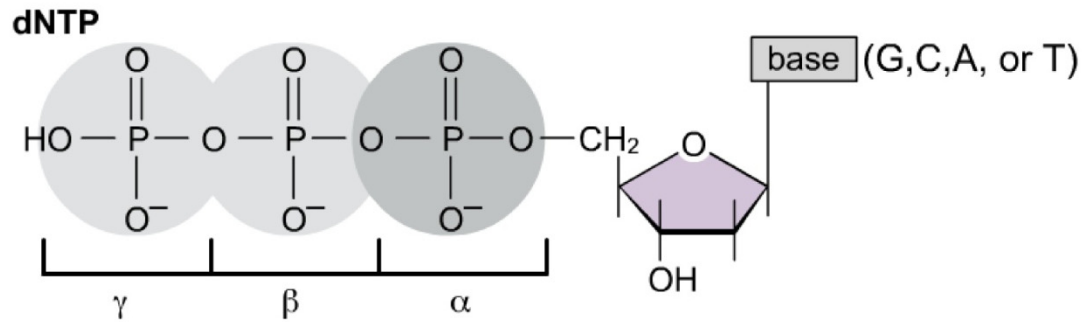
La iniciación de la síntesis del DNA involucra una compleja cascada de eventos altamente regulados que culminan en el ensamblaje del replisoma, cuyos componentes clave son una DNA helicasa y las DNA polimerasas (Walter y col., 2006).

Como se mencionó anteriormente, para que se inicie la replicación es necesario que los complejos pre-replicativos sean activados por dos proteínas cinasas, CDK y DDK, en la fase S del ciclo celular. Estas enzimas fosforilan a Cdc6 y Cdt1 lo cual resulta en su desplazamiento del complejo de pre-replicación, permitiéndose entonces el reclutamiento en el origen de replicación de otras proteínas para que se lleve a cabo el proceso de replicación. La DNA helicasa (Mcm2-7) utiliza la hidrólisis del ATP para separar la doble cadena, dejando estas cadenas de DNA expuestas, las cuales son cubiertas por la proteína de unión a DNA de cadena sencilla llamada RPA ("Replication Protein A") con el objeto de mantenerlas denaturalizadas (como cadenas sencillas). La DNA primasa α (o DNAPol α) es reclutada sobre el molde o templado por interacción con la helicasa y RPA, y se sintetiza un cebador o iniciador de RNA que forma un híbrido de RNA-DNA con el DNA molde. Entonces RF-C recluta a PCNA en el sitio del híbrido DNA-

RNA en la cadena sencilla a copiar en un proceso dependiente de ATP. Este proceso desplaza a la polimerasa α y las replicasas y el resto de la maquinaria de replicación son reclutadas; la polimerasa α es reciclada para la iniciación de los fragmentos de Okasaki (de 100 a 400 bases de longitud en eucariontes y de 1,000 a 2,000 en procariontes) en la hebra retrasada (Grabowski y Kelman, 2003; Kelly y Stillman, 2006). La cadena líder sólo requiere de un evento de síntesis de “primer” o iniciador ya que su síntesis es continua. Una vez conformada la horquilla de replicación, el alargamiento del DNA ocurre de forma bidireccional. La duplicación del DNA se lleva a cabo por medio de las DNA polimerasas replicativas δ y ε , las cuales utilizan la cadena sencilla del DNA como molde para sintetizar la hebra complementaria a partir de los iniciadores o “primers” de RNA (Fig. 9).

El mecanismo enzimático de polimerización se lleva a cabo por la formación de un enlace fosfodiéster entre el grupo fosfato α presente en el desoxinucleótido trifosfato (dNTP) entrante y el extremo 3'-OH libre presente en el “primer”, liberándose pirofosfato (Fig. 10). Esta reacción es catalizada mediante un mecanismo que involucra dos iones Mg^{2+} que entran en coordinación con dos residuos de ácido aspártico, que están conservados estructuralmente entre las DNA polimerasas. El primer ión Mg^{2+} activa el 3'-OH del cebador para que ataque al fosfato α del dNTP entrante, mientras que el segundo ión Mg^{2+} estabiliza la carga negativa producida por la formación del enlace fosfodiéster y quela los fosfatos β y γ (Fig. 11) (Steitz, 1999; Alba, 2001). El grupo 3'-OH libre de la base del “primer” realiza un ataque nucleofílico sobre el grupo fosfato α del dNTP, lo cual es facilitado

(a)



(b)

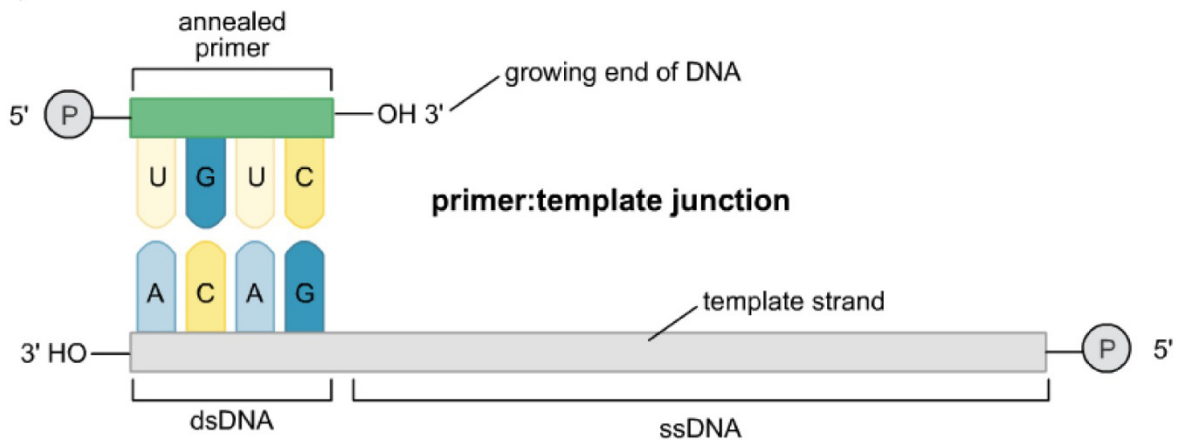


Figura 9. Sustratos requeridos para la síntesis de DNA. (a) Se requiere de 2'-desoxinucleótidos trifosfatos. Se indican los fosfatos en las posiciones α -, β - y γ -. (b) Estructura generalizada de un dúplex formado por la unión de un cebador o "primer" con su templado. Obsérvese la presencia de un grupo $-OH$ en el extremo 3' del "primer" el cual es fundamental para poder realizar la polimerización del DNA (Watson y col., 2004).

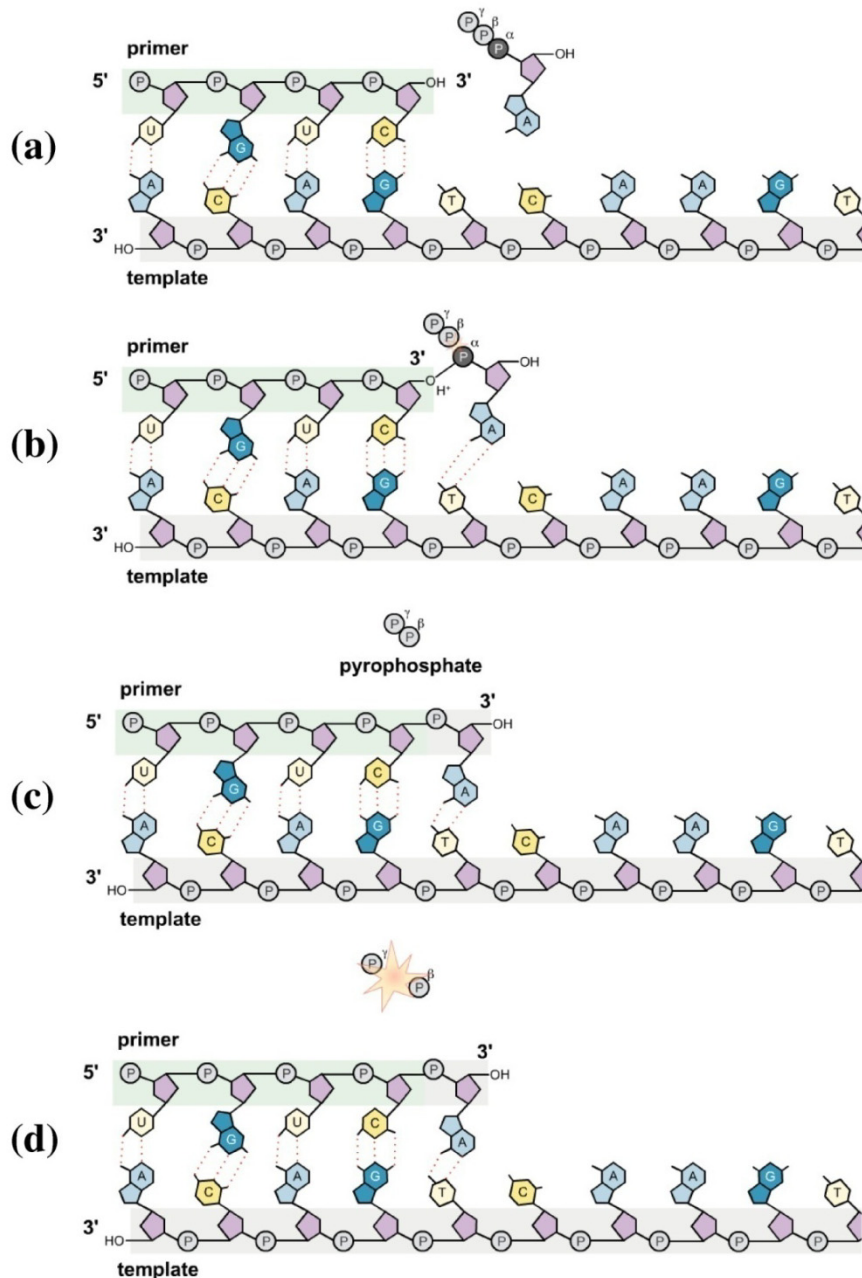


Figura 10. Mecanismo de síntesis de DNA llevado a cabo por las DNA polimerasas. (a) El grupo 3'-OH libre del "primer" realiza un ataque nucleofílico al grupo fosfato en la posición α del dNTP entrante, el cual es seleccionado mediante apareamiento de bases con el templado. (b) y (c) Esto resulta en la extensión del "primer" por la base recién incorporada gracias a su apareamiento con la base complementaria en el templado, con la consecuente liberación de un grupo pirofosfato. (d) El pirofosfato es hidrolizado posteriormente por la pirofosfatasa y se genera un nuevo grupo 3'-OH libre en la cadena naciente de DNA que servirá para la incorporación del siguiente nucleótido (Watson y col., 2004).

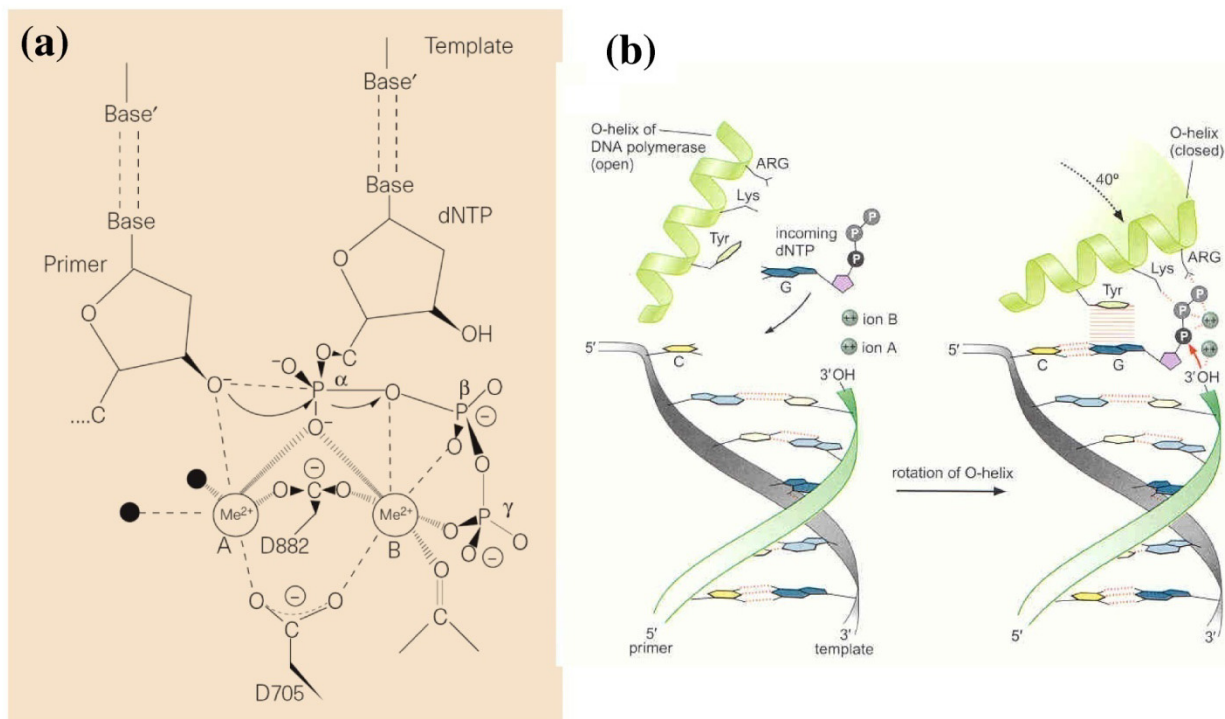


Figura 11. Mecanismo de acción de la actividad 5'→3' DNA polimerasa. (a) El mecanismo que involucra los dos iones metálicos de la actividad de polinucleótido polimerasa en el contexto del complejo de la T7 DNA polimerasa con su sustrato. Los dos iones metálicos divalentes A y B están ligados a la enzima perteneciente a la familia de las DNA polimerasas tipo I de *E. coli*, por los residuos de ácido aspártico D705 y D882. Los círculos negros señalan moléculas de agua unidas al ión metálico A. (b) La DNA polimerasa sujeta firmemente al templado y al dNTP entrante cuando se ha realizado un correcto apareamiento entre éste y la base del templado. Se presenta un cambio primario consistente en una rotación de 40° de una de las α-hélices del dominio del pulgar denominada hélice O. En la conformación abierta esta hélice está distante del nucleótido entrante. Cuando la polimerasa está en la conformación cerrada, esta hélice se mueve y hace importantes interacciones con el dNTP entrante. Una tirosina hace interacciones con la base del dNTP y con dos residuos cargados que se asocian con el trifosfato (Steitz, 1998; Watson y col., 2004).

por la estabilización eléctrica de un grupo -OH de este fosfato α por los iones metálicos, que a su vez están en coordinación con los grupos -COO^- de los residuos de ácido aspártico del dominio catalítico y de los residuos de lisina o arginina presentes en la hélice O del dominio del pulgar (ver más adelante) (Fig. 11). Es importante señalar que este dominio puede estar presente en dos conformaciones: la conformación abierta se presenta cuando esta hélice está distante del nucleótido entrante, y la conformación cerrada se obtiene cuando se presenta una rotación de 40° al presentarse un correcto apareamiento entre el dNTP entrante y la base del templado e involucra la interacción entre una tirosina y la base del dNTP y de dos residuos cargados positivamente que se asocian con el trifosfato del dNTP (Fig. 11) (Steitz, 1998; Watson y col., 2004).

Finalmente, para la terminación de la replicación se requiere de diferentes enzimas. En los cromosomas circulares, la maquinaria de la horquilla de replicación puede replicar genomas completos, pero las moléculas de DNA “hijas” permanecen concatenadas, por lo que para que las dos moléculas circulares sean separadas se requiere de la topoisomerasa II, la cual cataliza el rompimiento de una de las moléculas hijas permitiendo que la segunda molécula pase a través del rompimiento de la primera. Esta actividad de topoisomerasa II también es esencial en eucariontes para eliminar la tensión en la hebra de DNA generada por la helicasa replicativa al separar las dos cadenas del DNA.

En contraste con los cromosomas circulares, la replicación de los cromosomas lineales no puede ser completada por la maquinaria de la horquilla de replicación.

Para que la replicación sea completada se requiere de la actividad de la telomerasa, una enzima que adiciona repetidos específicos de DNA (TTAGGG en todos los vertebrados) al extremo 3' del DNA en las regiones teloméricas presentes en todos los cromosomas eucarióticos (Fig. 12). Para *Tetrahymena thermophila*, *S. cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Trypanosoma brucei* y *Arabidopsis thaliana*, las secuencias de los telómeros son TTGGGG, TG₂₋₃(TG)₁₋₆, TTAC(A)G₂₋₅, TTAGGG y TTTAGGG, respectivamente (Sealey y col., 2006). En contraste, en el caso de *Dyctiostelium discoideum* no se han encontrado estos motivos repetidos similares a los telómeros ni se han identificado ortólogos de la telomerasa, pero se han identificado en su genoma nuevas estructuras teloméricas compuestas de complejos elementos repetitivos y copias parciales de un elemento de rDNA extracromosomal (Eichinger y col., 2005). Para el caso de *E. histolytica* se conoce información de las regiones subteloméricas que contienen tRNAs, pero no se han descrito las regiones teloméricas (Eichinger y col., 2005).

Los telómeros permiten la asociación de proteínas específicas que ayudan a mantener el DNA altamente condensado, dando estabilidad a los cromosomas. La telomerasa es una enzima que contiene por lo menos dos subunidades que son esenciales para la actividad enzimática *in vitro*: una proteína que se asemeja a la transcriptasa reversa denominada TERT ("Telomerase Reverse Transcriptase) y una molécula de RNA la cual contiene un templado que sirve como sustrato para la transcripción reversa del DNA telomérico en los extremos de los cromosomas (Sealey y col., 2006).

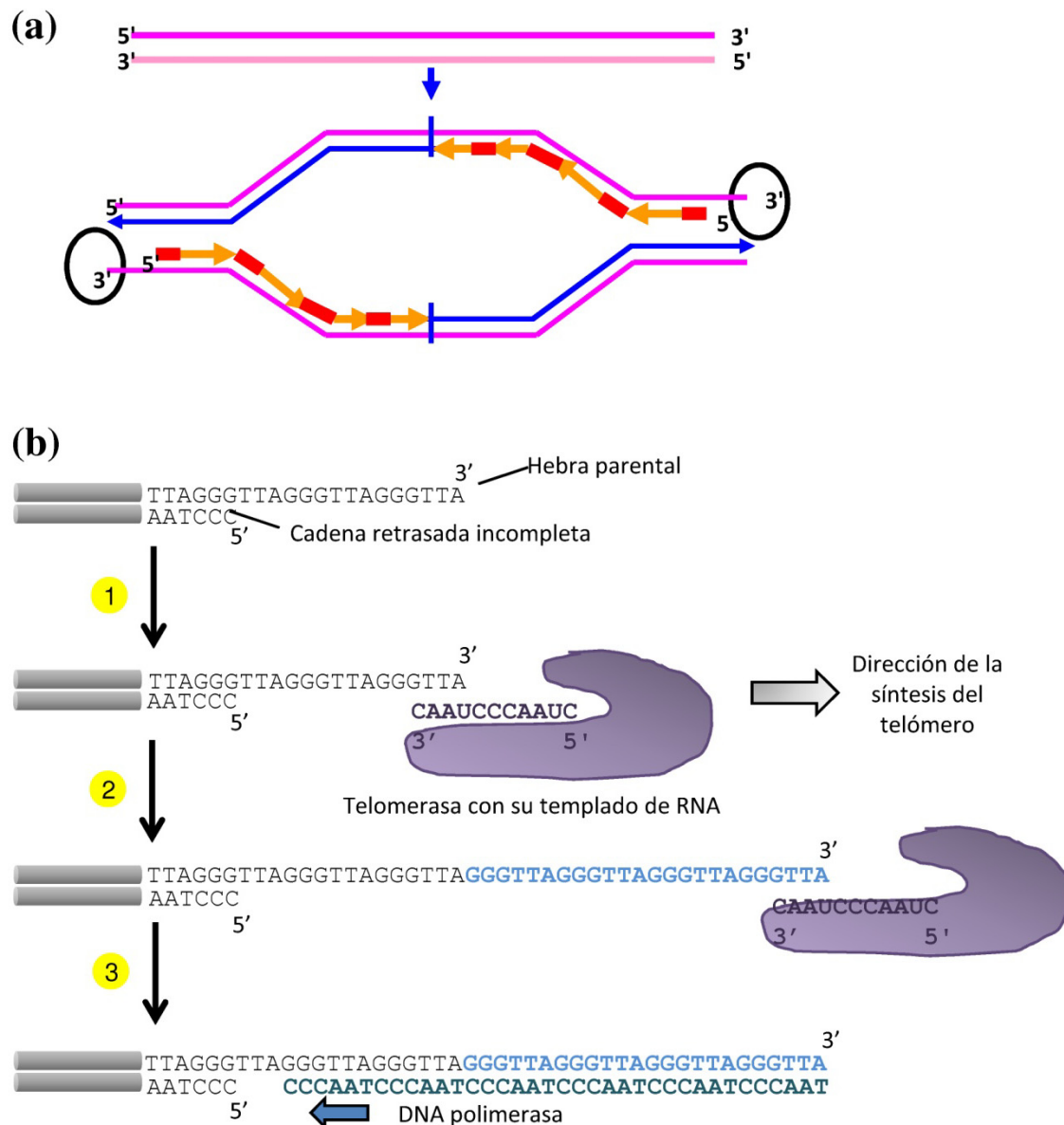


Figura 12. El problema de la replicación de los extremos del DNA de los cromosomas. (a) La replicación del DNA es bidireccional y requieren de un “primer” de RNA y de las DNA polimerasas que se mueven en la dirección 5'→3'. Sin embargo, cada ronda de replicación deja de 50 a 200 bases de DNA sin replicar en los extremos 3' debido a que no hay templado 3' para su replicación. Por otra parte, con cada ciclo celular se presenta un acortamiento de los telómeros. (b) Mecanismo de replicación de las regiones teloméricas. 1. Unión de la Telomerasa. 2. La Telomerasa extiende el extremo 3', la cual utiliza un templado de RNA para la síntesis de DNA. 3. Terminación de la cadena retrasada por la DNA polimerasa, las utiliza un templado de DNA.

5. DNA POLIMERASAS

La mayoría de los organismos tienen varias DNA polimerasas que varían en su composición de polipéptidos y propiedades catalíticas (procesividad, fidelidad y tasa de extensión de la cadena). Las DNA polimerasas participan en los procesos de replicación, reparación y/o recombinación del DNA y están presentes en diferentes organelos celulares (Grabowski y Kelman, 2003). En general las DNA polimerasas se clasifican con base en las secuencias primarias de sus subunidades catalíticas, en siete diferentes familias: A, B, C, D, X, Y y RT (Tabla 1) (Sherbakova y Kunkel, 2006).

Las DNA polimerasas replicativas de eucariontes están presentes en dos familias: La DNA polimerasa γ de animales y hongos, y las parecidas a Pol I (Pol I-like) responsables de la replicación del DNA mitocondrial en plantas y en los mohos mucilaginosos ("slime mold") como *Dictyostelium discoideum* forman parte de la familia A y las DNA polimerasas α , δ y ϵ , encargadas de la replicación del DNA nuclear y las DNA polimerasas codificadas en plásmidos mitocondriales de hongos y plantas, pertenecen a la familia B (Sherbakova y Kunkel, 2006; Ono y col., 2007). A esta familia también pertenecen las DNA polimerasas de arqueobacterias, virales y de bacteriófagos (Alba, 2001).

5.1. Estructura tridimensional y dominios catalíticos de las DNA polimerasas replicativas

Tabla 1. Clasificación de las DNA polimerasas en familias.

Familias	Ejemplos de DNA polimerasas y su función	Organismos
A	Pol I (Reparación) γ (Replicación mitocondrial)	Procariontes Eucariontes
B	Pol II (Reparación) α, δ, ϵ	Procariontes Eucariontes
C	Pol III (Replicación)	Procariontes
D	Pol D (Replicación)	Arqueobacterias
X	β (Reparación por escisión de bases)	Eucariontes
Y	η, κ, ι (Síntesis a través de una lesión: “Tranlesion synthesis”)	Eucariontes
RT	Telomerasa (Mantenimiento de telómeros)	Eucariontes

(Modificada de Sherbakova y Kunkel, 2006)

En general, las DNA polimerasas no comparten secuencias muy similares entre sí. Sin embargo, las polimerasas replicativas de las familias A y B son estructuralmente muy parecidas y poseen una región catalítica que tiene una forma semejante a una mano derecha, formada por tres dominios: 1) el pulgar, 2) la palma y 3) los dedos (Fig. 13). La región más conservada es el dominio de la palma, el cual contiene el sitio catalítico. Los dedos y el pulgar tienen algunos arreglos diferentes en las dos familias, aunque el pulgar siempre tiene α hélices paralelas o antiparalelas que interactúan con el surco menor del complejo “primer”-templado y los dedos tienen una α hélice con cadenas laterales conservadas posicionadas en el extremo del complejo “primer”-templado (Alba, 2001).

6. DNA POLIMERASAS DE LA FAMILIA B

La familia B está formada por las DNA polimerasas α , δ y ε de eucariontes como se mencionó anteriormente, así como por DNA polimerasas presentes en arqueobacterias, en virus, bacteriófagos (T4 y RB69) y DNA polimerasas codificadas en plásmidos mitocondriales de varios hongos y plantas (Alba, 2001).

Las proteínas de esta familia pueden presentar de tres a seis regiones conservadas (I a VI) en diferentes organismos, siendo la región I la más conservada y la región VI la menos conservada (Bernad y col., 1987; Wang y col., 1989). Las regiones I y II están presentes en todas las polimerasas de la familia y sus secuencias se utilizan para caracterizar a la familia B (Fig. 14) (Alba, 2001). Estas regiones residen en el dominio de la palma y en ellas están presentes los dos

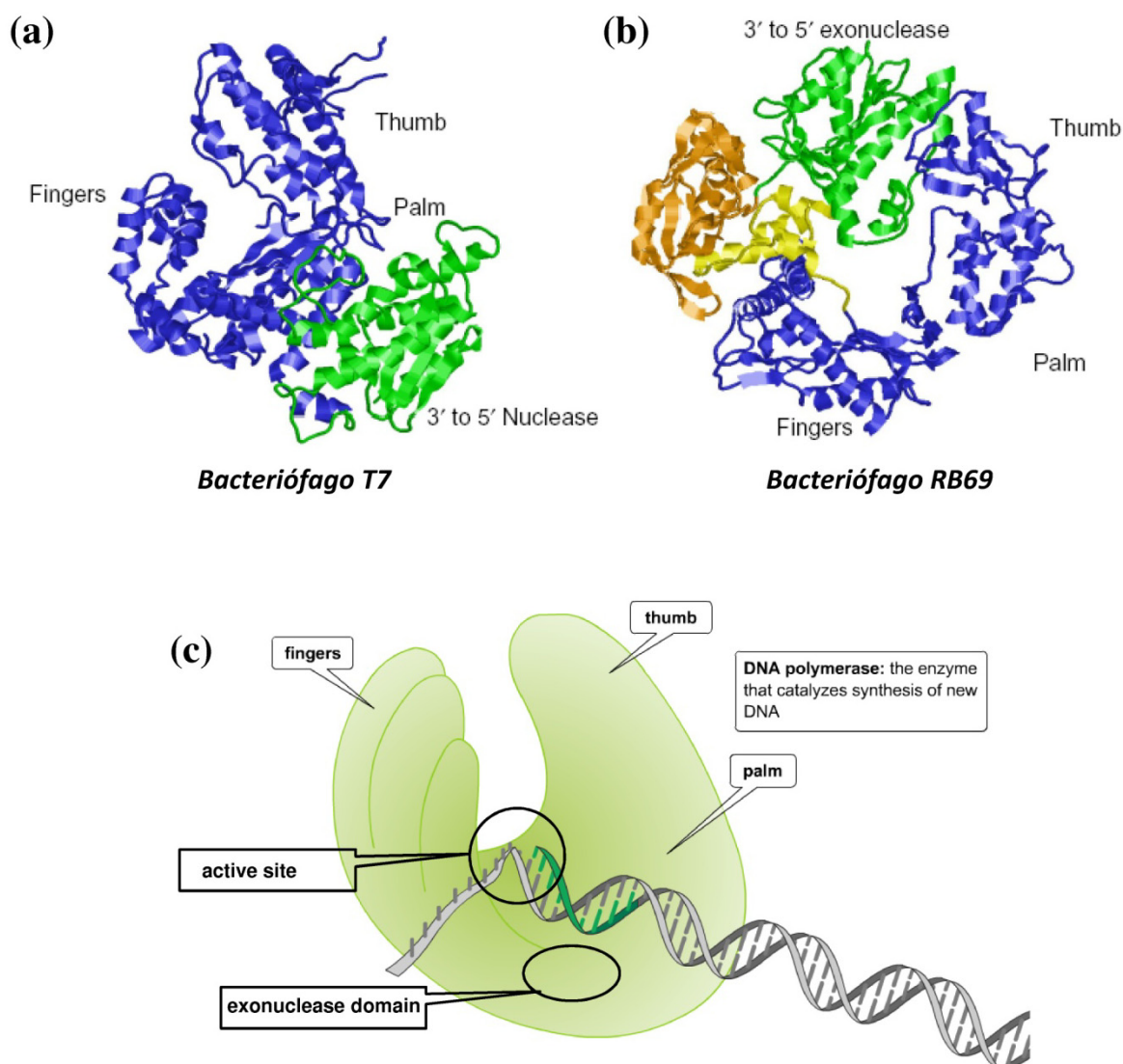


Figura 13. Estructura tridimensional de las DNA polimerasas de las familias A y B. (a) Estructura de la DNA polimerasa del bacteriófago T7. **(b)** Estructura de la DNA polimerasa del bacteriófago RB69. **(c)** Esquema de las DNA polimerasas de la familia A y B con semejanza a una mano derecha donde se indican los dominios del pulgar, la palma y los dedos (Alba, 2001; Watson y col., 2004).

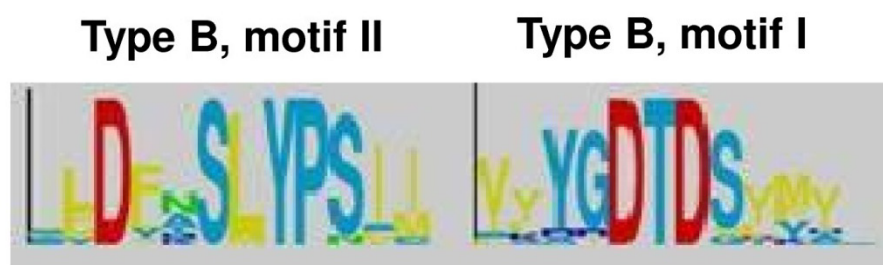


Figura 14. Secuencias consenso de los dominios I y II de las DNA polimerasas de la familia B. (Tomado de Alba, 2001).

residuos de ácido aspártico (D) que son esenciales para la actividad catalítica de las polimerasas (Steitz, 1999).

7. REPLICACIÓN EN *E. histolytica*

La precisa duplicación cromosómica, la segregación y el mantenimiento del contenido genómico son procesos críticos para la supervivencia de cualquier organismo. Las células en proliferación aseguran la constancia de sus genomas por varios mecanismos durante cada ciclo. Las proteínas de “checkpoint” no permiten la progresión del ciclo celular si no se han completado exitosamente todas las condiciones necesarias de la fase precedente; de tal manera que la sobre replicación no ocurra. Sin embargo, *E. histolytica* es un organismo que tiene la capacidad de tolerar variaciones en su contenido genómico, células con múltiples núcleos y núcleos con contenidos genómicos heterogéneos de 1 a 6 veces o más, sugieren que los mecanismos de control “checkpoint” típicos de eucariontes que aseguran la alternancia entre la síntesis del DNA y la mitosis, están ausentes o son distintos en este organismo (Lohia y col., 2007).

La maquinaria de replicación en *E. histolytica* es poco conocida. A partir del análisis de secuencias de su genoma, Lohia y col. (2007) encontraron que secuencias homólogas a la mayoría de los componentes conservados del complejo pre-replicative son codificadas en el genoma de la amiba, con pocas notables excepciones (Tabla 2). Los genes que codifican para el heterohexámero ORC están

Tabla 2. Comparación de los componentes del complejo pre-replicativo en *E. histolytica*, levadura y humano.

Homólogos	<i>H. sapiens</i>	<i>S. cerevisiae</i>	<i>E. histolytica</i>
MCM2-7	+	+	+
MCM8	+	-	+
MCM9	+	-	+
MCM10	+	+	-
ORC2-6	+	+	-
ORC1	+	+	ORC1/CDC6
CDC6	+	+	
CDC7	+	+	
DFB4	+	+	-
CDT1	+	-	-
Geminina	+	-	-
CDC45	+	+	+
GINS	+	+	+
Pol ϵ	+	+	-

La tabla muestra la ausencia (-) o la presencia (+) de genes que han sido identificados como componentes del complejo pre-replicativo en humano (*H. sapiens*), levadura (*S. cerevisiae*) y *E. histolytica*. Las secuencias homólogas en *E. histolytica* fueron identificadas realizando un BLAST en el banco genómico de *E. histolytica*, utilizando secuencias de humano y de levadura como sondas (Modificado de Lohia y col., 2007).

ausentes con excepción de un ortólogo que fue similar tanto a ORC1 como a Cd6, aunque es posible que la subunidad EhCdc6/Orc1 pueda formar un homohexámero para cubrir la función de ORC, como se ha sugerido en arqueobacterias.

Los dominios catalíticos de Mcm2-7 están conservados no obstante que las secuencias son más divergentes a sus homólogas de levadura y humano, mientras que los dominios N- y C-terminales de Mcm3-6 están truncados (Gangopadhyay y col. 1997; Das y col., 2005). Adicionalmente, mediante análisis bioquímicos se mostró que las proteínas EhMcm2, EhMcm3 y EhMcm5 están asociadas constitutivamente con la cromatina y también se comprobó la funcionalidad de estas proteínas en *S. cerevisiae* (Das y Lohia, 2000; Das y col., 2005).

Mientras un gran número de las proteínas requeridas para el licenciamiento de la replicación del DNA son codificadas en el genoma de *E. histolytica*, la pérdida de reguladores cruciales como Cdt1, geminina, Cdc7/Dbf4, Mcm10 y DNAPol ϵ puede llevar a la pérdida del permiso de la replicación condicionado a “una sola vez por cada ciclo celular”, permitiendo por lo tanto la endo-reduplicación sin mitosis en *E. histolytica* (Lohia y col., 2007).

Además de las investigaciones acerca de las proteínas que conforman el complejo pre-replicative, es poco lo que se ha profundizado en el estudio de las enzimas que participan directamente en la replicación del DNA. En investigaciones concernientes al tipo de DNA polimerasas existentes en *E. histolytica*, se realizaron trabajos utilizando inhibidores específicos para las actividades de diferentes DNA polimerasas. Los resultados mostraron que la actividad de DNA polimerasa detectada en los trofozoítos es inhibida con afidicolina, un inhibidor específico de las

DNA polimerasas de mamífero α , δ y ε , todas ellas pertenecientes a la familia B (Makioka y col., 1996; Makioka y col., 1998).

II. IMPORTANCIA DEL TEMA DE ESTUDIO

Debido a la gran importancia médica de *Entamoeba histolytica*, la mayor parte de los estudios se han circunscrito a los mecanismos involucrados en la patogenicidad y virulencia, pero poco se ha estudiado sobre los mecanismos biológicos básicos de este organismo, como la replicación del material genético, la transcripción y la traducción. Además de la importancia del conocimiento mismo de estos procesos biológicos amibianos, una profundización en estos mecanismos nos puede guiar también a estrategias para combatir las infecciones amibianas.

Menos aún se conoce acerca de la naturaleza y función del organelo citoplásmico llamado EhkO. *E. histolytica* tiene proteínas específicas de organelos involucrados en funciones respiratorias, tales como la PFO que se encuentra en los hidrogenosomas de *Trichomonas vaginalis* y las proteínas Hsp60 y Hsp70 características de las mitocondrias. Sin embargo, desconocemos si existe alguna relación de estos organelos con los EhkOs. Para conocer la función de EhkO, así como su relación con los otros organelos, es necesario continuar con su caracterización tanto estructuralmente como a nivel bioquímico, así como estudiar los genes y proteínas que se relacionan con él. Debido a que EhkO es un organelo con doble membrana que contiene DNA decidimos investigar si existía en la amiba alguna DNA polimerasa de tipo organelar que pudiera estar relacionada con la replicación de su DNA, la cual podría ser además un probable marcador del organelo.

III. OBJETIVOS

1. Objetivo General

Identificar un gen que codifique una posible DNA polimerasa organelar relacionada con mitocondrias y determinar la localización subcelular del mismo y de su producto proteico en trofozoítos de *Entamoeba histolytica*.

2. Objetivos Particulares

- 2.1. Identificar un gen de DNA polimerasa relacionado con mitocondrias en el genoma de la amiba.
- 2.2. Caracterizar *in silico* a la proteína codificada por este gen.
- 2.3. Determinar si es el gen es transcripcionalmente activo.
- 2.4. Clonar un fragmento del gen en un vector de expresión.
- 2.5. Inducir y purificar a la proteína recombinante.
- 2.6. Obtener anticuerpos contra la proteína recombinante.
- 2.7. Investigar la presencia de la proteína en preparaciones de EhkOs purificados.
- 2.8. Determinar la ubicación del gen y de la proteína en los trofozoítos.

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

1. CULTIVO DE *E. histolytica*

Los trofozoítos de la clona A se crecieron en medio TYI-S-33 a 37°C y se cosecharon en la fase de crecimiento exponencial (Diamond y col., 1978). Para el crecimiento de los trofozoítos empleados para la purificación de los EhkOs el medio fue suplementado con 2 μ Ci/ml de [metil-³H]-Timidina (Amersham) por 48 h (Luna-Arias y col., 2003).

2. ANÁLISIS *IN SILICO*

2.1. Búsqueda de genes con similitud a DNA polimerasas organelares en el genoma de *E. histolytica*

La búsqueda *in silico* de los genes se hizo utilizando como sonda la secuencia de una DNA polimerasa mitocondrial de *Gelasinospora sp.* [UniProt Knowledgebase (UnitProtKB)/TrEMBL con número de acceso O03684] en los bancos de datos de “The Sanger Institute” (www.sanger.ac.uk) y “The J. Craig Venter Institute” (www.jcvi.org/) y el programa WU-BLAST version 2.0 utilizando la matriz BLOSUM62. La secuencia obtenida fue traducida a aminoácidos con el programa “Translate” en el servidor ExPASy (<http://us.expasy.org/tools/dna.html>). Las similitudes de las secuencias de aminoácidos fueron investigadas usando el programa blastp del “National Center for Biotechnology Information”, NCBI (www.ncbi.nih.gov). Una vez obtenido un gen candidato, usamos su secuencia de

aminoácidos correspondiente para buscar otras secuencias similares en el banco de *E. histolytica* realizando un BLAST con la matriz BLOSUM62 en UniProtKB.

2.2. Análisis estructural de las probables DNA polimerasas de *E. histolytica*

Las secuencias proteicas de cuatro probables DNA polimerasas de tipo organelar de *E. histolytica* fueron analizadas con el programa SMART ("Simple Modular Architecture Research Tool") (sitio web <http://smart.embl-heidelberg.de/>). Posteriormente, las regiones detectadas en las proteínas amibianas se alinearon empleando los programas ClustalW (sitio web <http://www.ebi.ac.uk/tools/clustalW2/index.html>), Multalin (sitio web <http://www.bioinfo.genotul.fr/multalin/multalin.html>) y Jalview (sitio web <http://www.jalview.org/>), con las DNA polimerasas que presentaron los mayores valores de similitud, es decir, aquéllas con mayor valor de Score y con menor valor de E.

2.3. Análisis filogenético de las EhODPs

Para el análisis filogenético realizamos un BLAST en UniProtKB con la secuencia de aminoácidos de EhODP1 usando una matriz BLOSUM62. Nosotros seleccionamos secuencias de DNA polimerasas de diferentes organismos con un valor de $E < 0.0001$ y las alineamos con las cuatro secuencias de probables DNA polimerasas de *E. histolytica* utilizando el programa ClustalW (version 1.83). El alineamiento fue manualmente editado y transformado a formato nexus con Jalview y Clustal X (versión 1.83). El árbol filogenético consenso se obtuvo con el programa

PAUP, versión 4.0b10 de 32 bits para Microsoft Windows (Sinauer Associates, Inc. Publishers) por el método Neighbor-Joining (NJ) y se realizaron 2,000 replicas para obtener el “bootstrap”. Sólo valores mayores al 50% se muestran en el árbol, el cual fue visualizado con el programa TreeView (sitio web en internet <http://taxonomy.zoology.gla.ac.uk/rod/rod.html>).

3. OBTENCIÓN DEL DNA GENÓMICO DE *E. histolytica*

El DNA de los trofozoítos se aisló utilizando el método de purificación en un gradiente de densidad de cloruro de cesio (CsCl) establecido previamente en el laboratorio. Trofozoítos de la clona A se cosecharon, se lavaron dos veces con PBS, se congelaron en nitrógeno líquido y se almacenaron a -70°C. La pastilla celular conteniendo aproximadamente 1×10^8 células se resuspendió suavemente en 1 ml de una solución de sacarosa (100 mg/ml) y EDTA 0.5 M. Una vez resuspendidas las células se agregó sarcosil y proteinasa K a concentraciones finales de 2% y 2 mg/ml, respectivamente, y se incubó por 2 h a 55°C. Después de la lisis celular, se agregaron 1.4 g de CsCl por cada 5 ml del lisado. Esta suspensión se llevó a un índice de refracción de 1.3838 el cual se verificó en un refractómetro de ABBe (Baush and Lomb, Alemania). Posteriormente se agregó colorante Hoechst 33258 a una concentración de 20 mg/ml. El gradiente se formó en un tubo de polipropileno (Quick Seal para rotor 50Ti en una ultracentrífuga L8-55, Beckman): en la base del gradiente se colocaron 4 ml de una solución de CsCl con un índice de refracción de 1.4190 (1.86g de CsCl por cada ml de Tris-HCl 0.02M, pH 8.5), se depositaron

lentamente 1.5 ml del lisado con índice de refracción intermedio (1.3838) y, finalmente, se colocaron 3 ml de una solución de CsCl con un índice de refracción de 1.364, cuidando de no romper el gradiente previo.

La centrifugación se realizó a 160,000 x g durante 20 h a 20°C (45,000 rpm en el rotor 50Ti en una ultracentrífuga L8-55, Beckman). La banda que contenía el DNA se visualizó con luz ultravioleta, se colectó succionando directamente debajo de la banda utilizando una aguja hipodérmica estéril del No. 16 y se colocó en un tubo córex estéril. El colorante Hoechst 33258 se eliminó del DNA mediante extracciones con isopropanol y se dializó contra 2 l de TE (Tris 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8) durante 18 h para eliminar el CsCl. El DNA se precipitó agregando 3 volúmenes de etanol absoluto y 0.1 volúmenes de acetato de sodio 3 M pH 5.2 e incubando en nitrógeno líquido durante 10 min; después la suspensión se centrifugó a 12,000 x g durante 30 min (10,000 rpm en el rotor JA-20 en una centrífuga de alta velocidad Beckman J2-21), el sobrenadante se descartó y la pastilla se lavó dos veces con etanol al 70% a -20°C. Finalmente, el DNA se disolvió en 1 ml de agua desionizada estéril y se almacenó a -20°C. El DNA se cuantificó midiendo la absorbencia a 260 nm y utilizando la relación: 1 unidad de $A_{260\text{ nm}}$ es igual 50 µg de DNA/ml.

4. DISEÑO DE OLIGONUCLEÓTIDOS ESPECÍFICOS PARA AMPLIFICAR FRAGMENTOS DE LOS GENES *Ehodp1*, *Ehodp2*, *Ehodp3* y *Ehodp4*

Los oligonucleótidos utilizados (Tabla 3) se diseñaron a partir de las secuencias más divergentes entre los cuatro genes que corresponden a sus

Tabla 3. Oligonucleótidos utilizados en las reacciones de amplificación por PCR y RT-PCR.

Gen	Secuencias de los oligonucleótidos en sentido (f) y en antisentido (r)	Fragmento esperado (pb)	Tm
Ehodp1 Extremo 5' (PCR y RT-PCR)	(a) odp1-f: 5'-GAAGATCTGCCAATCCCCACAAAACGTCCCAC-3' (b) odp1-r: 5'-GGAATTCTTATTGCGTTTCGATATTTTCTAAGTT-3'	524	59°C
Ehodp1 Extremo 5' (PCR)	(a) odp1-f: 5'-GAAGATCTGCCAATCCCCACAAAACGTCCCAC-3' (c) odp1-f: 5'-GGAATTCTTAAAGGTGAAATTCTTCGGCTATACG-3'	894	54°C
Ehodp1 Extremo 5' (PCR)	(a) odp1-f: 5'-GAAGATCTGCCAATCCCCACAAAACGTCCCAC-3' (e) odp1-r: 5'-TCCATATTTTGCTAAAAATCTTCCCCATCATAT-3'-3'	1,557	61°C
Ehodp1 Extremo 3' (PCR y 3'-RACE)	(d) odp1-f: 5'-CATATGAAGAGTCAAAATTAATTGTAGAAG-3' (h) odp1-r: 5'-TTAAAATTTAATTGTTCTTTTGAAGTCA-3'	2,029	56°C
Ehodp1 Extremo 3' (PCR)	(f) odp1-f: 5'-AATAAGTGTATGATAAATGAAACACTA-3' (g) odp1-r: 5'-ATGTTCTATAGTAGGAGTCTCTCAA-3'	1,116	°C
Ehodp2 (RT-PCR)	odp2-f: 5'-ATCGTCGAAATACAAGACAAAA -3' odp2-r: 5'TCTTTGATATTCTTCATCACTGG-3'	317	54 °C
Ehodp3 (RT-PCR)	odp3-f: 5'TGAAAGAAGAGAGAAATACAAAG-3' odp3-r: 5'-ATCACTAACTCTTTCTTCCCC -3'	149	54 °C
Ehodp4 (RT-PCR)	odp4-f: 5'-ATCTGACTTAGATGGCTATGCTGA-3' odp4-r: 5'-GTCATTAAGGGGATCTGGTG-3'	376	54 °C
Actina (RT-PCR)	Actina sentido: 5'-AGCTGTTCTTTTCATTATATGC -3' Actina antisentido: 5'-TTCTCTTTCAGCACTAGTGGT-3'	222	54 °C

extremos 5'. Estas regiones se localizaron a partir del alineamiento de las cadenas polipeptídicas con el programa ClustalW. A los oligonucleótidos utilizados para amplificar el fragmento de 504 pb de *Ehodp1* se les adicionaron los sitios de restricción *Bgl* II y *Eco* RI, en los extremos 5' de los oligonucleótidos en sentido y antisentido, respectivamente, para su posterior clonación en pRSET A. Adicionalmente se diseñaron otros oligonucleótidos para amplificar otros segmentos del gen *Ehodp1* para su secuenciación.

5. AMPLIFICACIÓN POR PCR DE FRAGMENTOS ESPECÍFICOS DE LOS GENES *Ehodp1*, *Ehodp2*, *Ehodp3* y *Ehodp4*

Las amplificaciones de cada uno de los fragmentos se realizaron con 3 µl of DNA genómico mezclados con dNTPs 400 µM c/u, MgCl₂ 2 mM, 2 U de *Taq* DNA polimerasa (Invitrogen) y el par de oligonucleótidos diseñados para cada gen (Tabla 3) a una concentración de 200 nM c/u. Las condiciones de PCR fueron las siguientes: desnaturalización a 94°C por 5 min, seguido de 30 ciclos de amplificación a 94°C por 30 seg, alineamiento a la T_m específica para cada par de oligonucleótidos por 60 seg y extensión a 72°C durante 60 seg.

6. AISLAMIENTO DEL RNA TOTAL Y SÍNTESIS *IN VITRO* DEL cDNA DE *E. histolytica*

El RNA total de los trofozoítos se aisló utilizando el reactivo del Trizol de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Invitrogen). Para la transcripción reversa se desnaturalizaron 5 µg del RNA total y 500 ng del oligonucleótido dT₁₈ a 60° C durante 10 min, se enfriaron en hielo y se agregaron dNTPs y DTT a concentraciones finales de 1 mM y 10 mM, respectivamente, 200 U de SuperScript II transcriptasa reversa (Invitrogen) y 40 U de inhibidor de ribonucleasa RNAsin (Promega) siguiendo las recomendaciones del fabricante.

7. RT-PCR SEMICUANTITATIVA DE LOS GENES *Ehodp1*, *Ehodp2*, *Ehodp3* y *Ehodp4*

Las reacciones de PCR se llevaron a cabo con 4 µl de cDNA en volúmenes finales de 100 µl. La mezcla de reacción fue la misma que la descrita anteriormente, excepto que la cantidad de la enzima usada fue de 4 U de *Taq* DNA polimerasa (Invitrogen). Las condiciones de PCR fueron las siguientes: desnaturalización a 94°C por 5 min, seguido de 29 ciclos de amplificación a 94°C por 30 seg, alineamiento a la T_m específica para cada par de oligonucleótidos por 60 seg y extensión a 72°C durante 60 seg. Como control interno amplificamos un fragmento del gen de actina. Las características de los oligonucleótidos utilizados para amplificar a cada uno de los genes se indican en la tabla 3. Los productos de RT-PCR se separaron por electroforesis en geles de poliacrilamida (PAGE) al 6% en TBE 0.5X (Tris 44.5 mM, H₃BO₃ 44.5 mM y EDTA 1 mM, pH 8.3), se tiñeron con bromuro de etidio al 0.05%

(m/v) y se observaron con un transiluminador de luz UV (UVP). Para el análisis densitométrico se utilizó la versión 4.6.1 del programa Quantity One (Bio-Rad).

8. PREPARACIÓN DE CÉLULAS COMPETENTES DE *E. coli* DH5 α Y BL21(DE3)pLysS

A partir de las cepas bacterianas de *E. coli* DH5 α o BL21(DE3)pLysS crecidas en una placa de medio de Luria-Bertani (LB) agar (Sambrook y col., 1989) se aisló una colonia y se creció en 100 ml de medio LB a 37°C y 250 rpm hasta una D.O._{600 nm} de 0.4. Las células se cosecharon por centrifugación a 1,000 x g durante 15 min a 4°C, se resuspendieron suavemente (en 1/3 del volumen original) en la solución RF1 (RbCl₂ 100 mM, MnCl₂·4H₂O 50 mM, CaCl₂ ·2H₂O 10 mM, glicerol al 15% y KCH₃COO 30 mM, pH 5.8) y se incubaron en hielo durante 15 min. Las células se centrifugaron nuevamente y se resuspendieron en 1/12.5 del volumen original en la solución RF2 (RbCl₂ 10 mM, CaCl₂·2H₂O 75 mM, glicerol al 15% y MOPS 10 mM pH 6.8) y se incubaron nuevamente en hielo durante 15 min. Finalmente, las células se distribuyeron en alícuotas de 50 o 100 μ l y se congelaron en una mezcla de hielo seco/etanol y se conservaron a -70°C hasta su uso (Hanahan, 1985).

9. DISEÑO DE OLIGONUCLEÓTIDOS Y AMPLIFICACIÓN POR PCR DE UN FRAGMENTO DE DNA DE 504 pb DEL GEN *Ehodp1*

Para amplificar por PCR un fragmento de 504 pb específico del gen *Ehodp1* se diseñó un par de oligonucleótidos (*odp1-f* y *odp1-r*). A los oligonucleótidos sentido y antisentido se les adicionaron los sitios de restricción *Bgl* II y *Eco* RI, en los extremos 5' y 3', respectivamente (Tabla 3). La amplificación se realizó a partir de DNA genómico de la clona A de *E. histolytica* en las condiciones descritas anteriormente.

10. ANÁLISIS ELECTROFORÉTICO DEL DNA EN GELES DE AGAROSA

Muestras del DNA se analizaron por electroforesis en geles de agarosa al 1% en TBE 1X (Tris 89 mM, H₃BO₃ 89 mM, EDTA 2 mM, pH 8.3) siguiendo el método descrito por Sambrook y col., (1989). El DNA a analizar se mezcló con 0.1 volúmenes de solución de carga (ficoll 400 al 25%, azul de bromofenol al 0.25% y xileno-cianol al 0.25%). La separación electroforética se realizó a 10 voltios/cm durante 1 h. Las muestras de DNA se tiñeron con bromuro de etidio (0.5 µg/ml) y se visualizaron con un transiluminador de UV a 310 nm.

11. CONSTRUCCIÓN DEL PLÁSMIDO RECOMBINANTE QUE CONTIENE EL FRAGMENTO DE DNA DE 504 pb DEL GEN *Ehodp1*

El DNA amplificado de 524 pb del extremo 5' del gen *Ehodp1* y el vector pRSET A (Fig. 15) fueron digeridos con 10 unidades de cada una de las enzimas de restricción *Bgl* II y *Eco* RI durante 2 h a 37°C, y se sometieron a electroforesis en gel

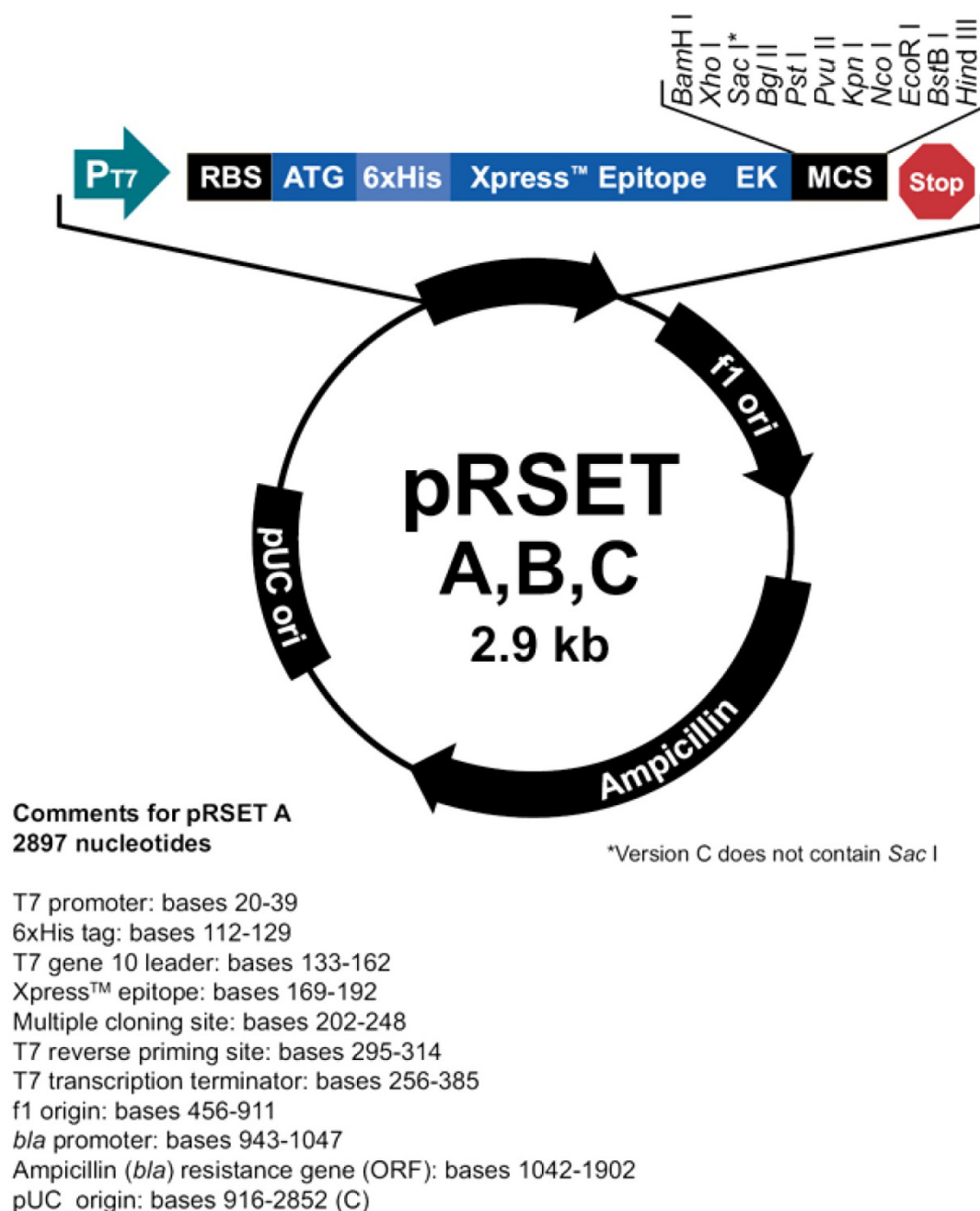


Figura 15. Esquema que muestra la estructura de los plásmidos de la familia pRSET. El vector utilizado en este trabajo fue el pRSET A. EK, sitio de corte para la enterocinasa; MCS, sitio de clonación múltiple; RBS, sitio de unión a ribosomas (Tomado del sitio web de Invitrogen: http://tools.invitrogen.com/content/sfs/manuals/prset_man.pdf).

de agarosa al 1% para su purificación posterior con el kit QIAEX II Gel Extraction (Qiagen) siguiendo las instrucciones del fabricante. Los productos purificados y cuantificados se ligaron por incubación en un volumen de reacción de 10 μ l usando una relación molar de 4:1 (inserto:vector) con 3 Unidades Weiss de DNA ligasa del fago T4 (Invitrogen). La reacción se llevó a cabo a 16°C toda la noche (Fig. 16). Posteriormente una alícuota de 7 μ l de la mezcla de ligación se usó para transformar 100 μ l de células competentes de *E coli* DH5 α como se describe más adelante. El plásmido recombinante pRSET A-*Ehodp1* obtenido se secuenció y fue llamado prEhodp1.

12. CLONACIÓN DE UN FRAGMENTO DE DNA DE 1,116 pb DEL EXTREMO 3' DEL GEN *Ehodp1*

Un fragmento de 1,116 pb del extremo 3' del gen *Ehodp1* fue amplificado con los oligonucleótidos específicos (Tabla 3) y separado por electroforesis en un gel de agarosa al 1% para su purificación posterior con el kit QIAEX II Gel Extraction. El amplicón purificado se ligó en el vector pGEM-T-Easy (Fig. 17) en un volumen de reacción de 10 μ l, usando una relación molar de 4:1(inserto:vector) con 3 Unidades Weiss de DNA ligasa del fago T4. La reacción se llevó a cabo en dos condiciones: a 16°C durante 3 h y a 4°C durante 16 h. Una alícuota de 8 μ l de la mezcla de ligación se utilizó para transformar 100 μ l de células competentes de *E coli* DH5 α .

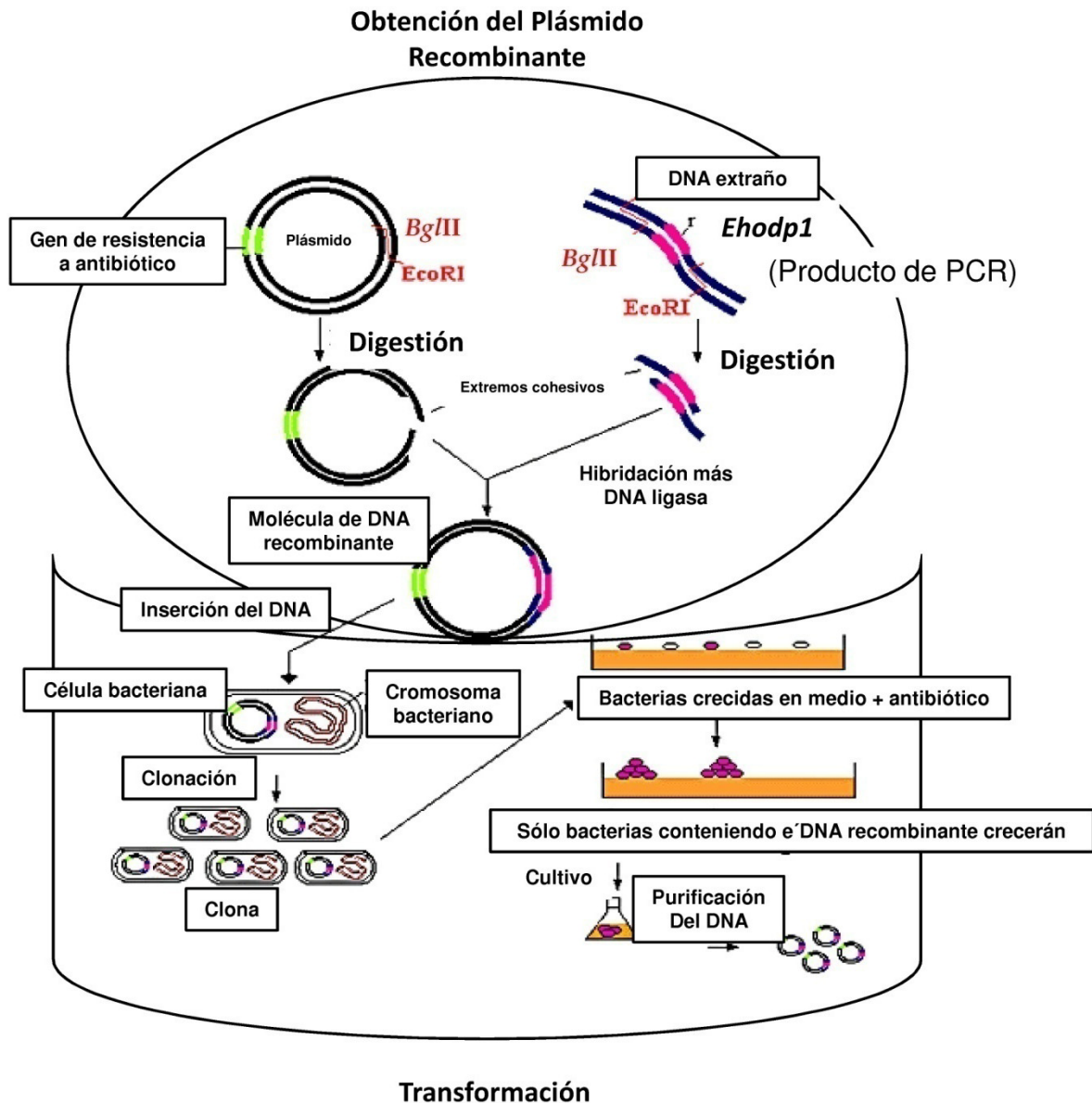
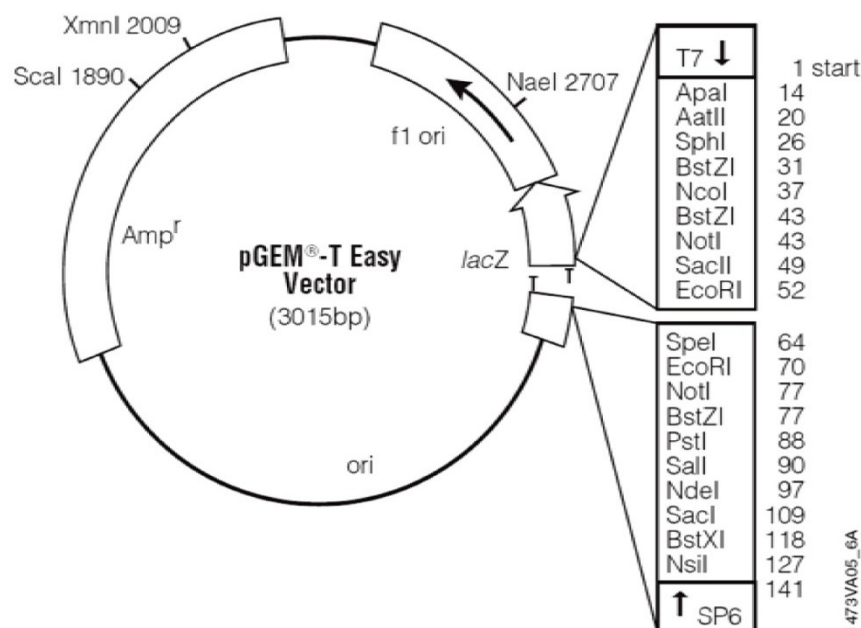


Figura 16. Esquema que muestra el proceso de clonación de un fragmento de DNA en un vector plasmídico. En la parte superior se muestra que ambos DNAs se digirieron previamente con las enzimas *Bgl* II y *Eco* RI, y posteriormente se ligaron entre sí a través de los extremos cohesivos compatibles producidos en la digestión enzimática. En la parte inferior se muestra el proceso de transformación del DNA ligado anteriormente y la selección de las bacterias transformadas en un medio que contiene un antibiótico como marcador selectivo. Finalmente, se escoge una clona y se amplifica en medio de cultivo líquido para obtener el plásmido por lisis alcalina o cualquier otro método descrito.



pGEM-T Easy Vector sequence reference points:

T7 RNA polymerase transcription initiation site	1
Multiple Cloning Region	10-128
SP6 RNA polymerase promoter (-17 to +3)	139-158
SP6 RNA polymerase transcription initiation site	141
pUC/M13 Reverse Sequencing Primer binding site	176-197
<i>lacZ</i> start codon	180
<i>lac</i> operator	200-216
β -lactamase coding region	1337-2197
Phage f1 region	2380-2835
<i>lac</i> operon sequences	2836-2996
	166-395
pPUC/M13 Forward Sequencing Primer binding site	2949-2972
T7 RNA polymerase promoter (-17-+3)	2999-3

Figura 17. Esquema que muestra la estructura del plásmido pGEM-T-Easy (Tomado del sitio web de Promega: http://www.promega.com/vectors/t_vectors.htm).

13. TRANSFORMACIÓN DE CÉLULAS COMPETENTES DE *E. coli* DH5 α Y BL21(DE3)pLysS

Una alícuota de 100 μ l de células competentes se mezcló con 2 μ l (10 ng) de las minipreparaciones de DNA plasmídico o con 7 u 8 μ l (20 ng) de las reacciones de ligación de los fragmentos de 504 pb y 1,116 pb del gen *Ehodp1* con los vectores pRSET A y pGEM-T-Easy, respectivamente. Las mezclas se incubaron durante 30 min a 4°C, se sometieron a choque térmico a 42°C durante 45 seg, se dejaron en hielo por 2 min, enseguida se les agregaron 900 μ l de medio LB a temperatura ambiente y se incubaron a 37°C y 250 rpm durante una hora. Finalmente, 200 μ l de la suspensión bacteriana se inocularon en una caja Petri con LB-ampicilina (100 μ g/ml) y agar al 2% y se incubaron a 37°C toda la noche. En el caso de las células BL21(DE3)pLysS, a las placas se les adicionó cloranfenicol (34 μ g/ml en etanol absoluto).

14. OBTENCIÓN DEL DNA PLASMÍDICO POR EL MÉTODO DE LISIS ALCALINA

A partir de células transformantes de *E. coli* DH5 α se purificaron los plásmidos pRSET A o el plásmido recombinante prEhodp1. En 5 ml de medio LB suplementado con 100 μ g/ml de ampicilina se inoculó una colonia bacteriana y se dejó crecer toda la noche a 37°C y 250 rpm. Posteriormente, se centrifugaron 1.5 ml del cultivo a 14,000 rpm (12,000 x g) en una centrifuga de mesa Eppendorf (modelo 3415C)

durante 1 min. La pastilla resultante se resuspendió por agitación (con vórtex) en 100 μ l de la solución I (glucosa 50 mM, Tris-fosfato 25 mM y EDTA 10 mM, pH 8.0) y se dejó 5 min a temperatura ambiente (TA); después se adicionaron 200 μ l de la solución II (NaOH 0.2 N y SDS al 1%), se mezcló suavemente por inversión y se incubó por 10 min a TA, se agregaron 150 μ l de solución III (KCH₃COO 5 M pH 5.2), se mezcló por inversión y se dejó en hielo durante 15 min. Finalmente, se agregaron 15 μ l de cloroformo y se centrifugó durante 5 min a 14,000 rpm (12,000 x g) para proceder a la recuperación del DNA. El sobrenadante (SN) se colectó por decantación y se extrajo con 400 μ l de una mezcla de fenol/cloroformo/alcohol isoamílico (25/24/1, v/v/v) mezclando durante 1 min en vórtex a máxima velocidad, entonces se centrifugó por 3 min a 14,000 rpm y se recuperó el SN. El DNA se precipitó del SN con 0.6 volúmenes de isopropanol o con 1 ml de etanol absoluto durante 15 min, se centrifugó a 14,000 rpm (12,000 x g) por 10 min y se lavó con un volumen de etanol al 70%, se centrifugó y la pastilla obtenida se dejó secar a TA, para posteriormente resuspenderla en 50 μ l de TE (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8.0). Finalmente, se realizó una incubación con 0.5 μ l de RNasa A (10 μ g/ μ l) a 37°C durante 15 min y la solución de DNA se conservó a -20° C hasta su uso.

15. SECUENCIACIÓN

Para verificar la secuencia de nucleótidos del gen *Ehodp1* reportada en el banco de “The Sanger Institute” para el contig1, diseñamos varios oligonucleótidos (Tabla 3) para amplificar por PCR diferentes fragmentos del gen a partir del DNA

genómico de la clona A y a partir de RNA empleando la técnica de 3' RACE ("3' Rapid Amplification of cDNA Ends"). Con los productos amplificados realizamos las reacciones de secuenciación siguiendo el método de terminación de la cadena de la DNA polimerasa (Sanger y col., 1977) empleando el kit "Big Dye Terminator Sequencing System" versión 3.1 (Applied Biosystems). Los productos de las reacciones se analizaron en un secuenciador automático de DNA (310 Genetic Analyzer, Applied Biosystems) en el Departamento de Genética y Biología Molecular del Cinvestav-IPN.

16. AMPLIFICACIÓN DEL EXTREMO 3' DEL GEN *Ehodp1* POR MEDIO DE LA TÉCNICA 3'-RACE

Para amplificar y posteriormete secuenciar el extremo 3' del gen *Ehodp1* utilizamos el kit GeneRacer (Invitrogen), siguiendo la metodología descrita por el fabricante. Para ello primeramente se realizó la síntesis del cDNA utilizando 5 µg de RNA total y como cebador un oligo dT₁₈ que contiene en su extremo 5' una secuencia de 36 bases que es universal y característico del primer GeneRacer Oligo dT. Posteriormente, se realizó una amplificación por PCR con el oligo en antisentido específico del gen (en este caso *Ehodpp1*) y con un oligo llamado GeneRacer 3' iniciador que hibrida con el oligo GeneRacer Oligo dT primer. Una vez amplificado, se realizó una segunda amplificación (una PCR anidada) para comprobar que el primer amplicón fue el blanco deseado, utilizando un segundo oligo denominado

GeneRacer 3' Nested Primer y otro oligo específico del gen en cuestión que se ubicó más hacia el extremo 3' del gen.

17. INDUCCIÓN DEL POLIPÉPTIDO RECOMBINANTE rEhODP1-168 CODIFICADO POR EL FRAGMENTO DE 523 pb DEL GEN *Ehodp1* Y SU PURIFICACIÓN POR CROMATOGRAFÍA DE AFINIDAD

Bacterias competentes de *E. coli* BL21(DE3)pLysS (Invitrogen) se transformaron con el plásmido pr*Ehodp1*. Los cultivos se incubaron a 37°C en agitación a 250 rpm hasta alcanzar una densidad óptica de 0.8 a 600 nm. La expresión de la proteína se indujo con isopropil-β-D-tiogalactopiranosido (IPTG) 1 mM durante 3 h a 37°C. La purificación de la proteína recombinante se realizó en condiciones desnaturalizantes por cromatografía de afinidad a metal inmovilizado (IMAC, por sus siglas en inglés “Immobilized Metal Affinity Chromatography”) en una columna de Ni²⁺-nitrilo triacetato-agarosa (Ni²⁺-NTA-agarosa) (Qiagen) (Fig. 18). Para ello, las células se lisaron en amortiguador A (cloruro de guanidina 6 M en Tris-HCl 10 mM, pH 8.0) por sonicación aplicando 3 pulsos de 15-30 seg a potencia intermedia, dejando en hielo la muestra durante 2 min entre cada pulso, la muestra se clarificó por centrifugación a 10,000 rpm (12,000 x g) en un rotor JA-20 en una centrifuga de alta velocidad Beckman J2-21 a 4°C y el sobrenadante clarificado se pasó por la columna de Ni²⁺-NTA-agarosa (1 ml de gel) por gravedad. Después la columna se lavó con 4 volúmenes de amortiguador C (urea 8 M, NaH₂PO₄ 100 mM,

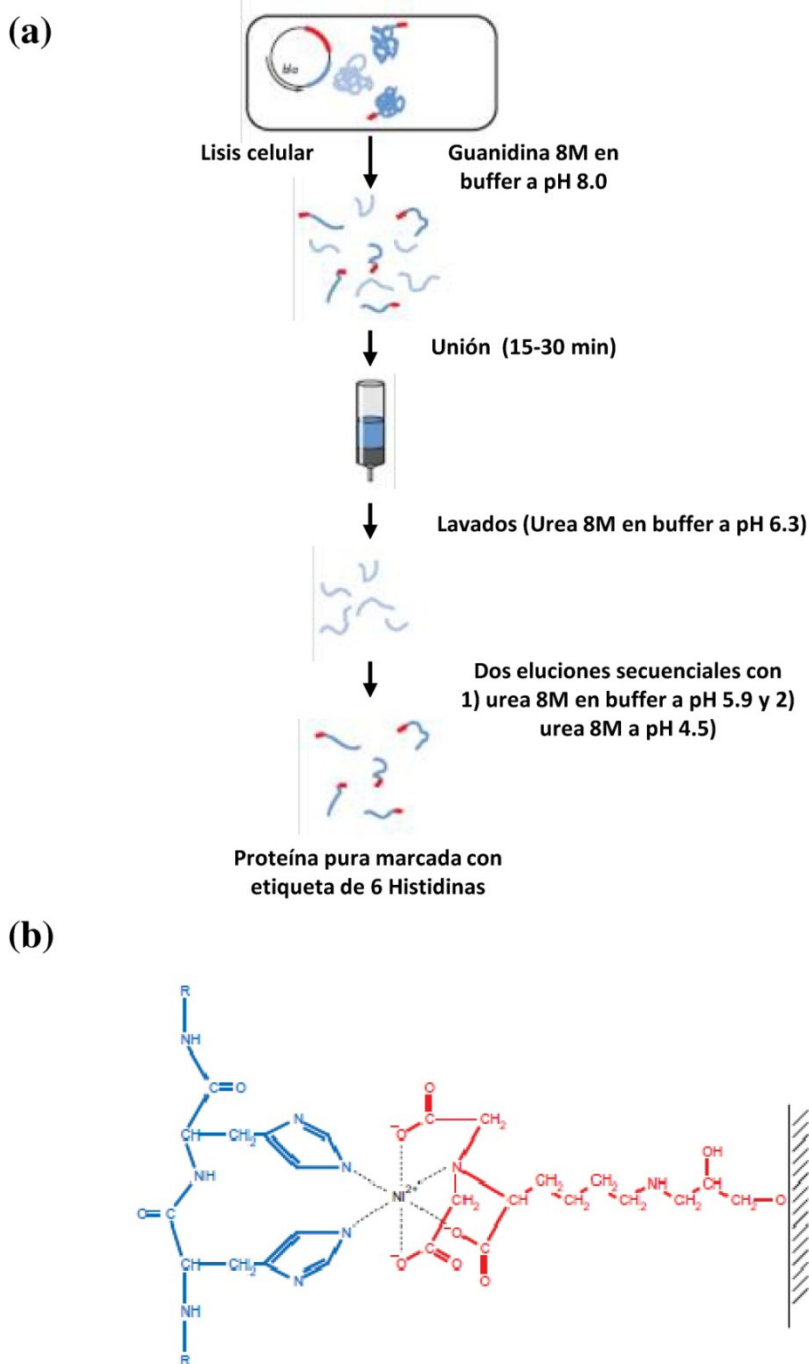


Figura 18. Esquema usado en la purificación del péptido recombinante prEhODP1-168 en condiciones desnaturalizante por IMAC. (a) Procedimiento usado en la lisis y purificación de la proteína recombinante en una columna de Ni^{2+} -NTA-agarosa. **(b)** Esquema que muestra un ión Ni^{2+} quelado por el nitrilo triacetato de la matriz y su interacción con las histidinas presentes en la etiqueta de 6His de la proteína recombinante.

Tris HCl 10 mM, pH 6.3) y se procedió a eluir sucesivamente a las proteínas con 4 volúmenes de los tampones D (urea 8 M, NaH₂PO₄ 100 mM, Tris HCl 10 mM, pH 5.9) y E (urea 8 M, NaH₂PO₄ 100 mM, Tris HCl 10 mM, pH 4.5), siguiendo las recomendaciones del manual “The QIAexpressionist” (Qiagen).

18. GELES BIDIMENSIONALES Y ESPECTROMETRÍA DE MASAS EN MALDI-TOF

La electroforesis bidimensional se realizó con el sistema ZOOM IPG Runner System (Invitrogen), usando tiras con un gradiente preformado de pH de 3-10 (Invitrogen) para la primera dimensión. Las condiciones del isoelectroenfoco fueron 200 voltios por 20 min, 450 voltios por 15 min, 750 voltios por 15 min y 2,000 voltios por 30 min (como recomienda el fabricante). La segunda dimensión se realizó en geles de poliacrilamida al 15% con SDS. Finalmente, el gel se tiñó con azul de Coomassie, se cortaron las proteínas candidatas y se enviaron para su análisis por espectrometría de masas por “fingerprint” a la Universidad de Columbia (Protein Chemistry Core Facility) en los Estados Unidos de Norteamérica.

19. OBTENCIÓN POR ELECTROELUCIÓN DE LA PROTEÍNA RECOMBINANTE rEhODP1-168 Y PRODUCCIÓN DE ANTICUERPOS ANTI-rEhODP1.

La proteína recombinante purificada por cromatografía de afinidad a Ni^{2+} -NTA-agarosa se sometió a una separación en geles preparativos (SDS-PAGE al 10%). La banda correspondiente a la proteína recombinante se cortó, se electroeluyó del gel con el sistema Electro Eluter de Bio-Rad y se cuantificó por el método de Bradford. Cuando fue necesario concentrar la proteína, ésta se precipitó con desoxicolato de sodio (DOC) y ácido tricloro acético (TCA), se incubó por 1 h a 4°C, se centrifugó a 14,000 rpm (12,000 x g) por 20 min, se lavó con etanol al 70%, se centrifugó por 10 min a 14,000 rpm y se dejó secar a TA. La producción de anticuerpos policlonales se realizó en ratas Wistar, machos de seis semanas de edad, usando un esquema de inmunización que consistió de tres aplicaciones del antígeno cada 15 días (Fig. 19). Las inoculaciones se realizaron inyectando en los cojinetes de las patas dosis de 15 μg de proteína recombinante pura. Para la primera inmunización se utilizó como adyuvante TiterMax Gold (CytRx Corporation) diluido 1:10 en PBS como recomienda el fabricante y para los dos retos subsecuentes se empleó $\text{Al}(\text{OH})_3$ en una relación 1:1. El suero preinmune se obtuvo el mismo día antes de aplicar el primer reto, mientras que el suero inmune se obtuvo a los 14 días después del último reto. Los sueros se conservaron a -20°C hasta su uso, después de eliminar las células sanguíneas por centrifugación a 2,000 rpm (250 x g) en una centrífuga refrigerada Eppendorf (modelo 6515R) a 4°C (Harlow y Lane, 1988).

**Ratas Wistar
machos de seis
semanas de edad**



Protocolo de Inmunización

Día	Actividad	Dosis	Adyuvante
0	Sangrado (suero preinmune) y 1ª Inmunización	15 µg	TiterMax Gold
15	2ª Inmunización	15 µg	Al(OH)₃
30	3ª Inmunización	15 µg	Al(OH)₃
44	Sangrado (suero inmune)		

Figura 19. Esquema de inmunización utilizado para la producción de los anticuerpos policlonales de rata anti-rEhODP1.

20. WESTERN BLOT

La proteína purificada por cromatografía de afinidad (rEhODP1-168) fue separada por SDS-PAGE al 15% y transferida a membranas de nitrocelulosa de 0.45 μm (Bio-Rad) (Ausubel y col., 1994). A continuación las membranas se bloquearon con albúmina sérica bovina (BSA) al 3% en PBS 1X durante 1 h a TA. La inmunodetección de los polipéptidos con etiqueta de histidinas se realizó por incubación de la membrana con 0.3 $\mu\text{g/ml}$ de anticuerpos monoclonales de ratón anti-6His (Roche) por 1 h a 37°C, seguida de tres lavados con PBS e incubación con anticuerpos policlonales de cabra anti-IgG de ratón acoplados a peroxidasa (1:2,000 en PBS conteniendo BSA al 2%) (Zymed) durante 1 h a TA. Las proteínas se visualizaron usando 3, 3'-diaminobenzidina (Sigma) y H_2O_2 (Ausubel y col., 1994).

Para los ensayos de Western blot de los extractos totales de trofozoítos y de las fracciones enriquecidas de los EhkOs, las proteínas se separaron en SDS-PAGE al 10% y se transfirieron a nitrocelulosa como se describió anteriormente. Estas membranas fueron incubadas con anticuerpos policlonales de rata contra la proteína recombinante rEhODP1-168 o con el suero preinmune (1:1,000 en PBS con BSA al 2%) durante toda la noche a 4°C. Después de tres lavados con PBS la membrana se incubó a 37°C por una hora con un anticuerpo de cabra anti-IgG de rata acoplado a peroxidasa (1:2,000 en PBS con BSA al 2%) y el revelado se realizó con 3, 3'-diaminobenzidina y H_2O_2

21. PURIFICACIÓN DE EhkOs

El proceso de purificación de los EhkOs se llevó a cabo a 4°C según la metodología descrita por Luna-Arias y col. (2003). Los trofozoítos se crecieron en presencia de [³H]-timidina (2 µCi/ml) con el objeto de marcar el DNA total, se cosecharon y se lavaron con PBS. La pastilla celular se resuspendió en 8 volúmenes de amortiguador A (HEPES 10 mM, EDTA 10 mM y DTT 10 mM, pH 7.9) conteniendo una mezcla de inhibidores de proteasas (Complete 1X, Roche) y sacarosa a una concentración de 250 mM. Los trofozoítos se rompieron suavemente utilizando un homogenizador Potter y los lisados se centrifugaron a 160 x g por 10 min a 4°C. El sobrenadante (fracción sin núcleos) se centrifugó a 10,000 x g por 10 min a 4°C en un rotor JA-20 en una centrífuga J2-21 (Beckman). La pastilla obtenida se resuspendió en Nycodenz (Nycomed Pharma AS) al 15% en amortiguador A, se depositó sobre un gradiente discontinuo de Nycodenz preformado (30%, 40% y 50%, v/v) y se centrifugó a 13,000 x g durante 60 min a 4°C en un rotor SW40Ti en una ultracentrífuga L8-55 (Beckman) sin usar freno. Después de la separación se colectaron muestras de 0.5 ml con el sistema DensiFlow II C (Buchler Instruments) y un colector de fracciones RediFrac 1,000 (Bio-Rad). Posteriormente, 100 µl de cada fracción se precipitaron con TCA al 10% y su contenido de radiactividad se midió en un contador de líquido de centelleo LS6,500 (Beckman). Las fracciones enriquecidas con los EhkOs se identificaron por la incorporación de [³H]-timidina.

22. LOCALIZACIÓN DE EhODP1 POR INMUNOFLOURESCENCIA INDIRECTA Y MICROSCOPIA CONFOCAL

Trofozoítos de *E. histolytica* se colocaron en cubreobjetos y se incubaron a 37°C durante 30 min. Una vez adheridos, se fijaron con paraformaldehído al 4% a temperatura ambiente por 1 h; se permeabilizaron con acetona (previamente enfriada a -20°C) por 1 h y las muestras se bloquearon con BSA al 2% en PBS pH 7.4 por 2 h a TA. Después, las amibas se incubaron con anticuerpos policlonales anti-EhODP1 (1:500 en solución bloqueadora) a 4°C durante toda la noche. Posteriormente se incubaron con anticuerpos de carnero anti-IgG de rata marcados con fluoresceína (FITC, “Fluorescein isothiocyanate”) (1:1,000). Finalmente, las células fueron contrateñidas con ioduro de propidio (Fluka) (20 µg/ml) por 5 min, enjuagadas rápidamente y montadas con gelvatol al 70%. La microscopía se realizó con un microscopio confocal Leica DM IRE 2 del Depto. de Biología Celular del Cinvestav-IPN.

23. PCR *IN SITU*

Se probaron diferentes parámetros para estandarizar la amplificación *in situ* en los trofozoítos de *E. histolytica* con base en los protocolos descritos en el manual *In Situ* PCR de Perkin Elmer (Fig. 20). La metodología resultante obtenida consistió de las siguientes especificaciones:

Montaje de los trofozoítos: Las muestras se prepararon a partir de una caja mediana de cultivo con trofozoítos en la fase logarítmica de crecimiento. Las células se centrifugaron a 1,500 rpm por 7 min a 4°C y se resuspendieron en 1 ml con medio de cultivo. Enseguida 70 µl de las células resuspendidas se colocaron en un portaobjetos y se incubaron a 37°C durante 45 minutos, una vez adheridas se lavaron dos veces con PBS precalentado a 37°C. Posteriormente los portaobjetos se colocaron en cajas Petri y los trofozoítos se fijaron con paraformaldehído al 4% precalentado a 37°C durante 60 min.

Pretratamiento de los trofozoítos: Una vez fijadas las muestras, éstas se colocaron en una jarra de Coplin, se lavaron con H₂O filtrada y estéril y se sumergieron en NH₄Cl 0.05 M durante 30 min, se lavaron tres veces con H₂O durante 5 min cada vez, después se trataron con HCl 0.02 M a TA por 15 min, se lavaron dos veces con PBS, se colocaron en Tritón X-100 al 0.01% en PBS por 90 seg y se enjuagaron con PBS durante 5 min. Posteriormente, las muestras se equilibraron en un amortiguador para proteinasa K (PK) precalentado a 40°C y se incubaron con PK (1 µg/ml) durante 15 min, después se cubrieron con ácido acético al 20% por 15 seg a 4°C y se lavaron con PBS. Finalmente, las muestras se deshidrataron con un gradiente de etanol (30%, 50%, 70% y 100%) a 4°C durante cinco minutos en cada una de las etapas del gradiente.

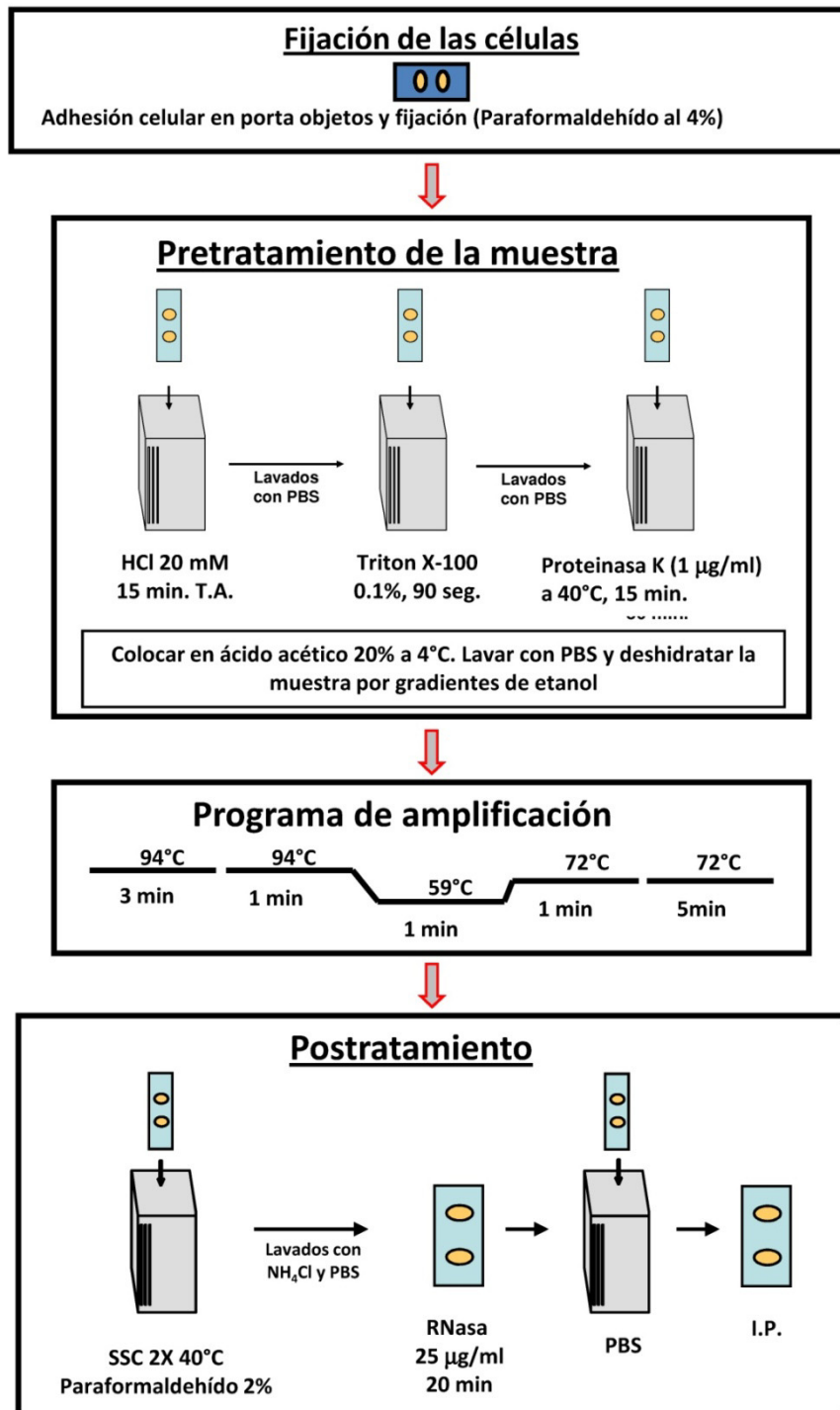


Figura 20. Esquema utilizado en la reacción de amplificación de un fragmento del gen *Ehodp1* por PCR *in situ*.

PCR: La amplificación de los genes de interés se realizó directamente en los trofozoitos deshidratados con la adición de 50 μ l de una mezcla de reacción con dNTPs 200 μ M c/u, oligonucleótidos 0.4 μ M, $MgCl_2$ 4.5 mM, AmpliTaq DNApol IS 10 Unidades (Kit *In situ*-PCR de Perkin-Elmer), BSA al 0.2% y 0.1 μ l de Cy5-dCTP (Amersham). Las condiciones de amplificación fueron: desnaturalización inicial a 94°C por 3 min, 30 ciclos de polimerización (1 min a 94°C, 1 min a 59°C y 1 min a 72°C) y una extensión final a 72°C por 7 min para el gen *Ehodp1*, mientras que para el gen de actina se empleó una T_m de 54°C y se omitió el paso de extensión final.

Postratamiento: Después de la amplificación se realizaron dos lavados con 2X SSC y uno con PBS a TA de 10 min c/u. Las muestras se refijaron con paraformaldehído al 2% durante 5 min a TA, se lavaron con NH_4Cl 0.05 mM por 5 min, se enjuagaron tres veces con PBS por 5 min cada vez y se bloquearon con BSA al 2% durante 30 min. Posteriormente, se trataron con RNasa libre de DNasas (25 mg/ml en BSA al 1%) a 37°C por 30 min y se lavaron dos veces con PBS por 5 min. Las preparaciones se contratiñeron con ioduro de propidio (IP) durante 7 a 10 min, se lavaron con PBS y las muestras se montaron finalmente con Vectashield (Vector) en PBS (1:1) y se sellaron para su observación por microscopía confocal.

V. RESULTADOS

1. Identificación del gen que codifica para una DNA polimerasa de tipo organelar en el genoma de *Entamoeba histolytica*

EhkO es un organelo citoplásmico de *E. histolytica* que contiene DNA (Orozco y col., 1997; Baez-Camargo y col., 1997; Solis y col., 2002), pero sus funciones no se conocen todavía. Dada la existencia de DNA en este organelo, resulta fundamental establecer cómo se replica este DNA y cuál es su origen. En general, no se sabe mucho acerca de la maquinaria de replicación en *E. histolytica*, ni se conoce de la existencia de alguna DNA polimerasa de tipo organelar o mitocondrial en este parásito que pudiera estar involucrada en la replicación o reparación del DNA contenido en los EhkOs. Por consiguiente, con el objeto de identificar alguna DNA polimerasa relacionada con estos organelos, realizamos una búsqueda *in silico* en el genoma de *E. histolytica* de alguna secuencia que codificara para una DNA polimerasa de tipo organelar, utilizando el banco de datos de “The Sanger Institute” y “The J. Craig Venter Institute” (Pathema). Para ello utilizamos como sondas secuencias de proteínas de diferentes DNA polimerasas de tipo γ pertenecientes a la familia A, las cuales están involucradas específicamente en la replicación del DNA mitocondrial; sin embargo, no encontramos ninguna secuencia que pudiera estar relacionada con este tipo de DNA polimerasas. En vista de lo anterior, procedimos a realizar la búsqueda empleando como sonda la secuencia de una DNA polimerasa de la familia B codificada en el plásmido mitocondrial Gel-kal del hongo

Gelasinospora sp (UniProtKB/TrEMBL AN O03684). Como resultado del análisis de Blast en el genoma de *E. histolytica* en “The Sanger Institute”, encontramos una secuencia de DNA denominada contig1 (Fig. 21), la cual tiene un marco de lectura abierto de 3,462 nucleótidos que codifica para una proteína de 1,154 aminoácidos con una masa molecular teórica de 135.5 kDa.

Para investigar la identidad del contig1, la secuencia del DNA fue traducida a proteínas con el programa Translate tool en The ExPASy Proteomic Server (Fig. 21) y realizamos un BLAST utilizando esta secuencia polipeptídica. Los resultados mostraron que la proteína codificada por el contig1 tiene similitud con DNA polimerasas de la familia B codificadas en plásmidos mitocondriales de varios hongos, con identidades que varían entre el 20 y el 28% y con valores de similitud del 39 al 44%. El BLAST también reveló una identidad del 33% y una similitud del 53% con una probable DNA polimerasa de la familia B, de tipo organelar o viral, codificada en el genoma de *T. vaginalis*. Los valores significativos de E variaron entre 1×10^{-123} y 2×10^{-6} (Tabla 4). Dada esta similitud, a partir de este momento el gen codificado en el contig1 lo nombramos *E. histolytica* organelar DNA polimerasa 1 (*Ehodp1*).

2. Organización estructural de la proteína EhODP1

El siguiente paso consistió en identificar en la proteína codificada por el gen *Ehodp1*, regiones características compartidas con otras DNA polimerasas similares

Figura 21. Secuencia de nucleótidos del contig1 de *Entamoeba histolytica* y su traducción a aminoácidos. Se realizó un Blastp en el genoma de *E. histolytica* en el banco de datos de The Sanger Institute, usando como sonda la secuencia de una DNA polimerasa mitocondrial del hongo *Gelasinospora sp* (UniProtKB/TrEMBL AN O03684). Con este análisis se identificó la secuencia de DNA denominada contig1, la cual fue traducida a aminoácidos con el programa Translate tool en The ExPASy Proteomics Server. Los números en negritas corresponden a la secuencia de nucleótidos, mientras que los números en gris corresponden a la secuencia de aminoácidos.

ATGAGTAAAAAGGATTATGAAAAGATGGAAAAACAACACCGTCTTTCTTAATCCTTTAGGGTCGAGACATCATGGCGAGTTAGAAAAA 90
 M S K K D Y E K M E K T T T V F S N P L G S R H H G E L E K 30
 ACATCAACTAATTTCCCATGATGTAGCTTTCTCTGAGGGACATAGGGAGCTAGAAAAACAACACTAGTTCTCATGACTCTTATGGTTT 180
 T S T N S H D V A F S E G H R E L E K T T T S S S H D S Y G F 60
 GAAACGATTGGGGATCGTGTAGAAATCGTAGAGAAAGCGGGAGAAAAACAACACTCCCAACGTCACCTATACCCCATGGAT 270
 E T I G D R V R N R R E S G R K T Q S P Q N V P P I P P M D 90
 CCCCCTGTAAGCCCCTCTAGGAGTACCCCTATGAGTCTCCCTGAAGAAACCCCTTTAATTCACCTATTGTTCCACCTATTGAACCA 360
 P P V S P S R S T P M S L P E E T P F N S P P I V P P I E P 120
 CCTAATGATGCCCAATGATGGAGGAGCCCTTAACCTGATGGTGGAGTTGCTGCTCTACTAGAGGAAATAAACCATGAAGAGGATTATACC 450
 P N D A Q M M E E P L T D G E V A A L L E E I N H E E D Y T 150
 CCCTTAGATATCTCTCACTAGATAGAGTACCACCTACAGAAAAATGAAATACAACCTCCTCCAAATAGCAAGAGAAAACTACTGATGAT 540
 P L D I L T L D R V P P T E N E I Q L L Q I A R E N T T D D 180
 GAGATTGAATTTACGGTCATCAGAAAAAGAGATTTTGGGCTAGAAAAACTCGCAAGCATGGCGTGGTATGTTAGGGGAAACCTATAGA 630
 E I E F T V I R K R D F G L E N T A Q A W R G M L G E T Y R 210
 ATAAGTCAATTAATTAAGGAATATGGCTTAATTCCTCTAGTGAATAGTATTTGGTGAAGAAGCGGCGCTTTATTGTTAACTTAGAA 720
 I S Q L I K E Y G L I P L V E L V F G G R T R R F I V N L E 240
 AATATCGAACCGCAAGATTTCTTAATCAGTGTGTGGGTTTGTATGTTGGTATAGAAGAATTTGGAGGAGTTATGATGATAGAGAAAAAT 810
 N I E P Q E F L N Q C V G F D V G I E E F W R S Y D D R E N 270
 GAATTAATATCCCTCCTGGAAAAATAGTAAATGAAATCATCATAACAATTTGAAACCTCCTCAACGCCAACGAATAGAAGGTGCGTTA 900
 E L N I P P G K L V N E I I I T I L K P P Q R Q R I G A L 300
 TTTATATTATTTGGTTGAACATTTGGGCACCTCTAGAACATATCTCAAAAAATCAAACTCTATAGTAAAGAGGATATAGTACAAAATA 990
 F N Y Y L V E H W A P L E H I L K K Y Q I Y S K E D I V Q I 330
 GAAAACTGTTTTATTCTGTTTATGAAAAAGCTCATACCTTAACAAAGACTGAAATGGATAAAAAATCAGAACAAAGTTAAAGGGGAATACT 1080
 E N C F I H C L E N S H T L T K T E M D K I R T K L K G N T 360
 GTGACTAGAAGACTATGAACGCTATAGCCGAAGAAATTTACCTTAAATATTAATTCGATATTATAATGGAGAAAAATAGCTCACAAAT 1170
 V T K K T M K R I A E E F H L N I I L R Y Y N G E K I V T N 390
 AATATTAAACATGGAGAAGAAATTAATTAATTTTAAATACGATGGGAGAAATTAATTCACCTATGTCCTGATGAAAGAGTACCAAT 1260
 N I K H G E R I I K I F L I R W E N N F H Y V P D E K V P L 420
 ACTACATACTTTTATTCATCATTATGAAGAAATAGTAAATTTATGTAATGAAATGGAAGGACATAGAAAAATCTTTAATGTGACTAAA 1350
 T T Y F I H H Y E E I V N Y C N E N G K D I E K F F N V T K 450
 AAAGAAGGGGAAATATATAACACTCTCTTCAAAATATATCCCAATATATAAATGTCTTAAAGAATTAAGAGAGTTGGGGCTATAGAAA 1440
 K E G E I Y K H S L Q N Y I P I Y K C L K E L R E V G A I K 480
 GAAATTTGAAGAAATGATATGATTAAGAAAAATATATGACTCTTTCTATTCTCACCAGAAAAATATTTCTTTAATATGAAGAGTCA 1530
 E I V R N D M I K K Y Y D S F L F S P E N I S L T Y E E S 510
 AAATTAATGTAGAAGATAAAAGAGTGAACCTACTAATACATTGTTGTTGCTGATTTTGAATGTTTCACTCTGGTGATTATCACAAAG 1620
 K L I V E D K K S E T T N T L L F A D F E C F T S G D Y H K 540
 TCATATTGTATTGTTATGAATGAAGTTGGGGTATGGAAGAAATTTATGGTATGAATTGCGCAGATAAAATTTATAAATATCTTCAG 1710
 S Y C I I V M N E V G V W K K F Y G M N C A D K F I N Y L Q 570
 ACAATAGAGTCCCCCTTTGTTACTTCCCACTTAGGATATGATGGAAGATTTTATAGCAAAATATGGAATTTAATATGTTAAAAAG 1800
 T I E S P L C Y F H N L G Y D S F L F A K Y G I N M V K K 600
 GGAAGATGATATATAAATGACAATAAATAAATGGAAGAAGATAATATTAAAGATACTCTGGCCTTAATACCAACAGCATATCT 1890
 G K M I Y K M T I K I N G K K I I F K D T L A L I P T S I S 630
 AATTTTAAACATCTTTTAAATAGATGGAATAATGAAAAAGAAATATTTCCTTATAACTATTATAATGAGGAACCAATGAATATTGGA 1980
 N F K T F F K L D G K Y E K E I F P Y N Y Y N E E T M N I G 660
 GTTATTGAGAAATGTTGGAATAAAGAAACACCTAGTTGGTCATTAGAAAAATTCACAATTTAAAGAGAAATTTAATAAAAAATAGTGT 2070
 V I E N C E N K E T P S W S L E K I A Q F K E N L I K N K C 690
 ATGATAAATGAACACTATTTAACACAGAAAAATCTGTGAATATTATTGTTTAAAGGACGTGTTAGTGTAAAGAGAAGGATTTTAAAA 2160
 M I N E T G T L F N T E K Y C E Y Y C L R D V L V L R E G F L K 720
 TATAAGAAGATGATAAGAAATTTAAATTTGAGCTGCACCAATTTTCCACCTTAAGTGCAATTATCTTATTATTATTTAAAAATAAC 2250
 Y K K M M K E N L N L D C T Q F S T L S A L S Y Y Y F K N N 750
 TGCTTTGTAAGAAATTTCTTATTGAAATATACTGGTAATGTAAGAGATATATTAAGAAAGCAGTATATGGTGGTAGAAATGTTAGGG 2340
 C F V K D F L F E Y T G N V R E Y I K K A V Y G G R N M T L G 780
 GAAAAATAAAACATATGGTGGATAAGGAAATAGTAGATTTTGACCGGTGATGCTATATCTTCAGCAGTGGCAAGACTATTCTTCCCC 2430
 E N K K H M V D K E I V V D F D A C S L Y P S A V A R L F L P 810
 ACAGCGCACCTKCGGTCATGAATAAACCACTTCCAGTGGTATATGGAGCATCTAATGGGTGAACAGCAATATGAAACCCCAAGAAAGA 2520
 T G A P R V M N K P L Q W Y M E H L M G E Q Q Y E T T Q E R 840
 TATATCTCATACTTTTATGTCATTATGAGATAACAAAGTAAATAAAAAAGAAAGATGCCATTATTATTAAGAAAAATAATGGGCATA 2610
 Y I S Y F I V T I E I T K V N K R K M P I I I K K I N G I 870
 AATCAATATGTAATGAGCCATCCGTTATGACAGTAGATTCAATTTATTGGAGGATCTACTGAAATACCAAGAAATGAATTTAATGTT 2700
 N Q Y V N E P S V M T V D S I Y L E D L L K Y Q E I E F N V 900
 AAAGAAGGAATTTATTTGGGATGGGGGAAAGGCTAGTTTATTAAAGAAAAGATTAAAGAAATTTATGATATAAGAAAGCAAAAGAAAGA 2790
 K E G I Y W D G G K A S L F K E K I K E I Y D I R K Q K K A 930
 GAACATGACCCCAAGTGAAGTAATTTAAATTAATAATGAATCTTGTATTGGTAAACCTATTCAAAAACCCATACCAGAAGAAATAAA 2880
 E H D P S E V I F K L I M N S C Y G K T I Q K P I P E E I K 960
 TTATTTAGAACAAAACATAAATGCTTTCTTATTGGAAAAGAAATTTAGAAGATATCTGTGAGGAGAACAAATATATGATTCTGACATT 2970
 L F R T T K H K M L S Y W K R N L E D I L S G E Q I Y D S D I 990
 TGGATAGTAAATATTAAGAAAGCACTGGACGAATTTTCGTTCCTAATATTATTTGGGGTCTTATTCTCTCCATGTCGAAGAGAAATAG 3060
 W I V N I K K Q L D E F F V P N I I G V L I L S M S K R I M 1020
 AATGAATTAATTTATTTATGTGAAGATTTGGGCATTTATGTATATTATCAGGATACTGATAGTATACATATAGAAAAAGATAAATTAAGC 3150
 N E L I L G I Y V Y Y Q D T D S I H I E K K L S 1050
 CAATTGAGAGACTCTCTATAGAACATATAATAGGGAAGTGTAGGAACTAATGTTGGCCAAATCCATTCTGACTTCCCTCCGCTGAAT 3240
 Q L R D S Y Y R T Y N R E L V G T N V G Q F H S S D F P P V N 1080
 GAAAAAGAAAGTTGGTCAATTAATCCATCTTTTAAAGTAAGAACTTACCTGATGTTCTCAGCAATGAAGATGGAGACATCGATTAT 3330
 G K E S W S I K S I F L G K K S Y L D V L T N E D G D I D Y 1110
 TTAATTAGAATGAAGGCATCCCAAGGAAGTAATCTTGGTACTGCAAAAAGAAATTTGAAGGGGATGTGGTAGCTTTGTATGAACAC 3420
 L I R M K G I P T A K E V I L G T A K E K F E G D V V A L Y E H 1140
 CTTTACACAAGCTACCCACTAGTTTGTATTATCAGAAATA 3462
 L Y T S Y P L S F D L S E I 1154

Tabla 4. Similitud de EhODP1 con DNA polimerasas codificadas en plásmidos mitocondriales.

Organismo	N-Ac	L-Cod	Aa-T	I (%)	S (%)	Aa-c	Score	E
<i>Trichomonas vaginalis</i>	A2ECW5	nd	1232	33	53	929	447	1×10^{-123}
<i>Flammulina velutipes</i>	Q9GBS2	M	925	22	40	781	116	8×10^{-24}
<i>Gelasinospora sp</i>	003684	M (Gel-kal)	987	21	39	847	116	8×10^{-24}
<i>Ascobolus immersus</i>	P22374	M (Pa12)	1202	25	42	494	108	2×10^{-21}
<i>Crinipellis perniciosa</i>	Q6U7U2	M	899	21	39	642	107	1×10^{-21}
<i>Saccharomyces kluyveri</i>	Q09038	M (pSKL)	999	24	40	654	102	1×10^{-19}
<i>Neurospora intermedia</i>	P33538	M (kalilo)	969	22	41	514	102	1×10^{-19}
<i>Pichia etchellsii</i>	Q9C130	C (pPE1B)	1013	23	41	541	78	3×10^{-12}
<i>Kluyveromyces lactis1</i>	P09804	M (pGKL-1)	995	24	39	771	97	7×10^{-18}
<i>Kluyveromyces lactis2</i>	P05468	M (pGKL-2)	994	22	41	668	92	2×10^{-16}
<i>Porphyra purpurea</i>	O99973	M	620	23	41	541	78	3×10^{-12}
<i>Agrocybe aegerita</i>	O78938	M	571	22	41	515	83	1×10^{-13}
<i>Pichia kluyveri</i>	O21376	M (pPK2)	1118	20	39	531	63	1×10^{-7}
<i>Morchella conica</i>	Q9TEH5	M (pMC3-2)	901	28	44	216	60	1×10^{-7}
<i>Podospora anserina</i>	Q01529	M (pAL2-1)	1197	22	40	614	59	2×10^{-6}

N-Ac: número de acceso en UniProtKB; L-Cod: lugar de codificación del gen, (M) mitocondria, (C) citoplasma, o (nd) no determinada. Aa-T: número de aminoácidos totales; I: identidad con EhODP1. S: similitud con EhODP1. Aa-c: número de aminoácidos comparados. E: probabilidad de similitud entre las secuencias debida al azar.

para confirmar los resultados del BLAST anterior y la naturaleza de la proteína en cuestión. Para ello, realizamos un alineamiento con las DNA polimerasas de la familia B que presentaron mayor similitud con la proteína (EhODP1) mediante el programa ClustalW. El alineamiento reveló la presencia de cinco cajas (I, II, III, A y B) muy conservadas en el extremo carboxilo terminal de todas las proteínas. Estas cajas están localizadas en posiciones equivalentes reflejando una misma organización estructural en todas las proteínas alineadas (Fig. 22). Las cajas I, II y III contienen secuencias conservadas que son características de DNA polimerasas de la familia B (Fig. 23) (Wang y *col.*, 1989; Alba, 2001). En las DNA polimerasas de esta familia, los dominios I y II forman parte del dominio catalítico, en el cual se localizan dos residuos de ácido aspártico (D) que interaccionan con iones Mg^{2+} y que son fundamentales para la actividad enzimática de polimerización de nucleótidos. Estos aminoácidos están presentes en EhODP1 en las cajas I (residuo D1040) y II (D795) (Fig. 23, flechas). La caja I de EhODP1 presenta la secuencia VYYQDTDSI (aa 1034 - 1042), la caja II tiene la secuencia VDFDACSLYPSAVAR (aa 792 - 806) y la caja III comprende los aminoácidos HDPSEVIFKLIMNSCYGKTIQKPITEEIKLFR (aa 932 -963) (Fig. 23).

Además de las regiones características de las DNA polimerasas de la familia B, identificamos dos cajas nuevas (A y B), las cuales están conservadas entre EhODP1 y las DNA polimerasas codificadas en plásmidos mitocondriales de hongos y una probable DNA polimerasa de *T. vaginalis* (Fig. 24). La caja A de EhODP1 comprende los residuos I616-Y649 y corresponde a la secuencia IIFKDTLALIPTSISNFKTFFKLDGKYEKEIFPY, en tanto que la caja B comprende los

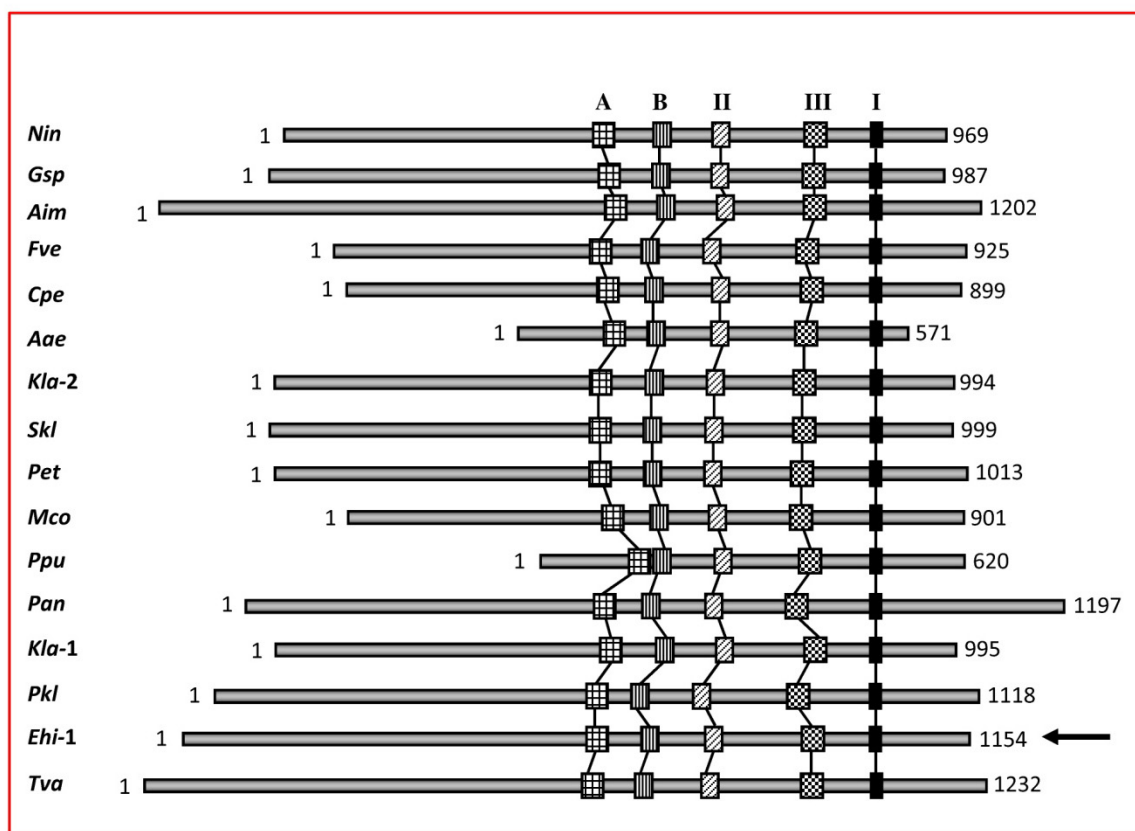
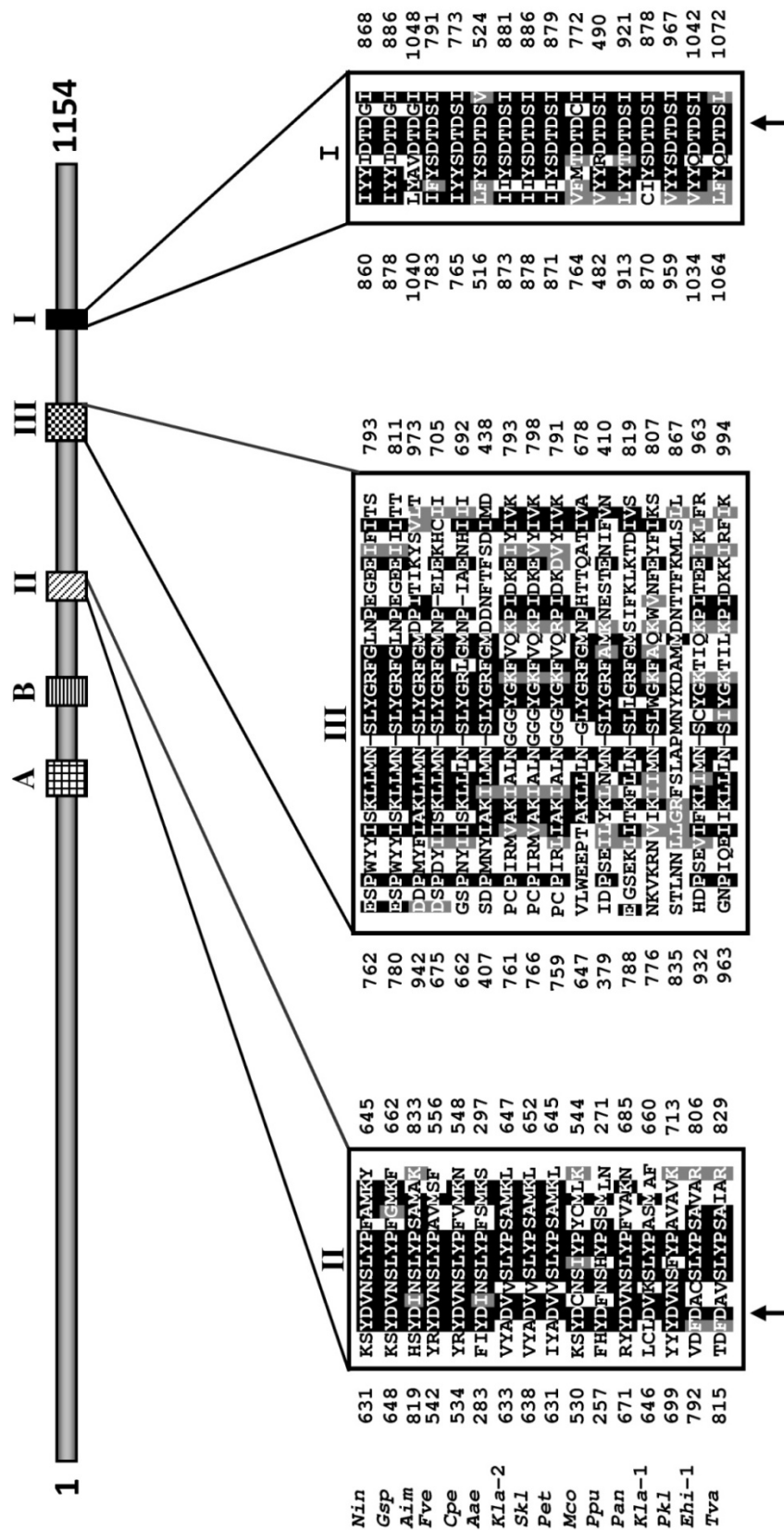


Figura 22. Alineamiento esquemático de EhODP1 con DNA polimerasas pertenecientes a la familia B. El alineamiento se realizó entre EhODP1 y las DNA polimerasas que presentaron los valores más grandes de identidad, similitud y score, y los valores más pequeños de E utilizando el programa ClustalW. Se señalan con rectángulos cinco regiones conservadas entre las proteínas. Las cajas I, II y III muestran la ubicación de tres regiones con secuencias consenso características a todas las DNA polimerasas de la familia B. Las cajas A y B muestran regiones en EhODP1 compartidas con DNA polimerasas codificadas en mitocondrias de hongos y de *T. vaginalis*. Los números corresponden al primer y último aminoácidos de cada polipéptido. La flecha señala a EhODP1 (*Ehi-1*). *Nin*: *Neurospora intermedia*; *Gsp*: *Gelasinospora* sp; *Ain*: *Ascobolus immersus*; *Fve*: *Flammulina velutipes*; *Cpe*: *Crinipellis perniciosa*; *Aae*: *Agrocybe aegerita*; *Kla-2*: *Kluyveromyces lactis* (DNA polimerasa 2); *Skl*: *Saccharomyces kluyveri*; *Pet*: *Pichia etchellsii*; *Mco*: *Morchella conica*; *Ppu*: *Porphyra purpurea*; *Pan*: *Podospira anserina*; *Kla-1*: *Kluyveromyces lactis* (DNA polimerasa 1); *Pkl*: *Pichia kluyveri*; *Ehi-1*: *Entamoeba histolytica* organellar DNA polymerase 1; *Tva*: *Trichomonas vaginalis*.

Figura 23. Alineamiento de las secuencias de las cajas I, II y III características de DNA polimerasas de la familia B, identificadas en EhODP1, en DNA polimerasas codificadas en plásmidos mitocondriales y en una DNA polimerasa de *T. vaginalis*. Se muestran las secuencias de aminoácidos de las cajas I, II y III características de DNA polimerasas de la familia B localizadas a partir de un multialineamiento usando el programa ClustalW. Los aminoácidos idénticos se enmarcan en negro. Los cambios conservados se muestran en color gris. Los números indican la posición de los aminoácidos de las cajas correspondientes en cada proteína. Las flechas muestran los residuos de ácido aspártico (D) que participan en la actividad catalítica de las DNA polimerasas. *Nin*: *Neurospora intermedia*; *Gsp*: *Gelasinospora sp*; *Ain*: *Ascobolus immersus*; *Fve*: *Flammulina velutipes*; *Cpe*: *Crinipellis perniciosa*; *Aae*: *Agrocybe aegerita*; *Kla-2*: *Kluyveromyces lactis* (DNA polimerasa 2); *Skl*: *Saccharomyces kluyveri*; *Pet*: *Pichia etchellsii*; *Mco*: *Morchella conica*; *Ppu*: *Porphyra purpurea*; *Pan*: *Podospira anserina*; *Kla-1*: *Kluyveromyces lactis* (DNA polimerasa 1); *Pkl*: *Pichia kluyveri*; *Ehi-1*: *Entamoeba histolytica* organellar DNA polymerase 1; *Tva*: *Trichomonas vaginalis*.

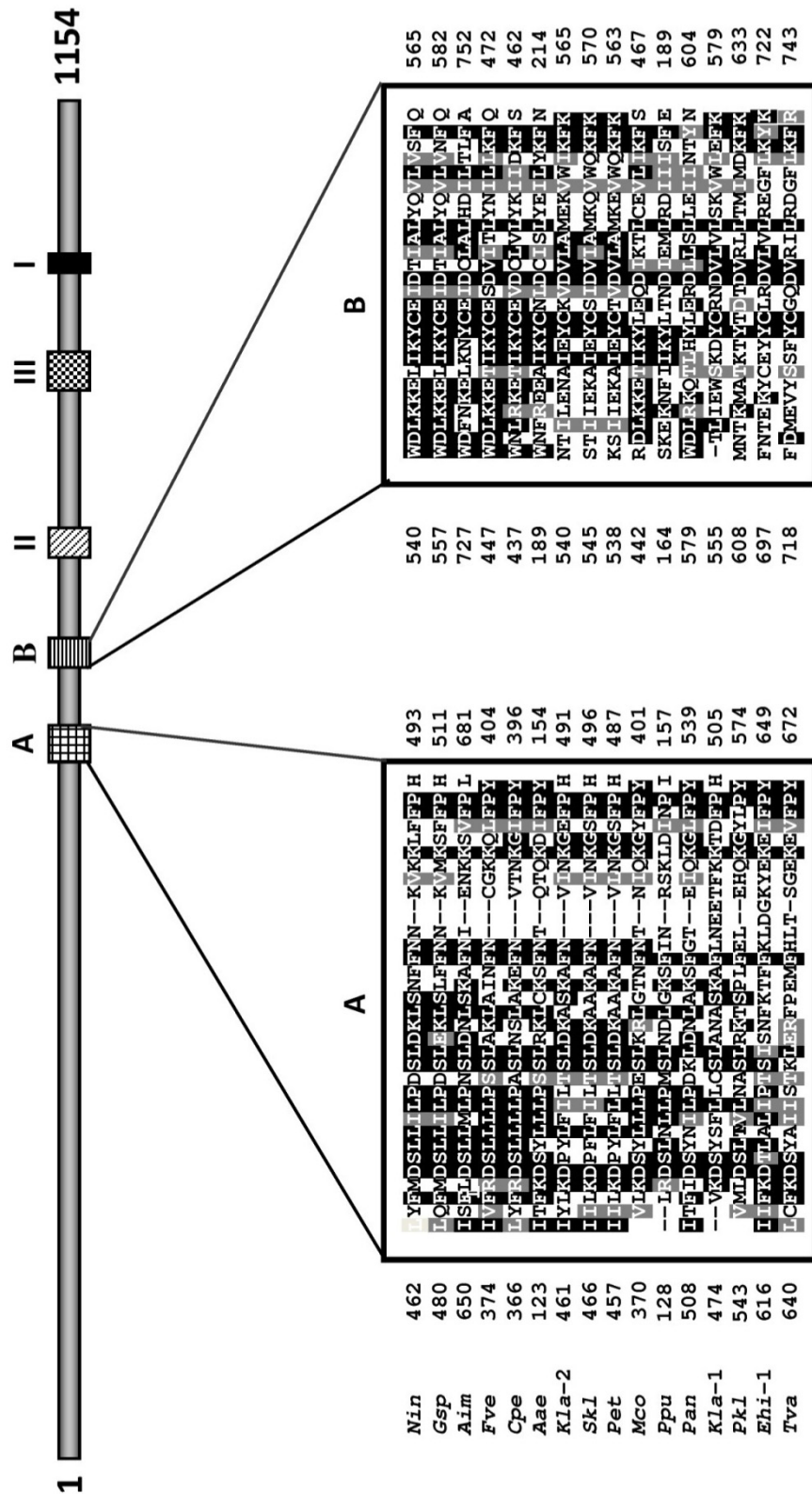


residuos F697 - K722 y tiene la secuencia FNTEKYCEYYCLRDVLVLREGFLKYK (Fig. 24). La conservación en EhODP1 de las cajas I, II y III, características de la familia B, además de la presencia de las cajas A y B conservadas en las DNA polimerasas codificadas en plásmidos mitocondriales nos sugirieron que EhODP1 podría ser una DNA polimerasa de tipo organelar perteneciente a la familia B.

3. *EhODP1* es un gen transcripcionalmente activo

Con la finalidad de determinar si el gen *Ehodp1* se estaba expresando en los trofozoítos de *E. histolytica*, amplificamos por RT-PCR dos fragmentos ubicados en los extremos de este gen (Fig. 25a). Para ello purificamos el RNA total de los trofozoítos (Fig. 25b), obtuvimos el cDNA por transcripción reversa y a partir del cDNA amplificamos un fragmento de 524 pb de la región 5' del gen *Ehodp1*, el cual corresponde a una región de 504 pb más 20 nucleótidos correspondientes a los sitios de restricción *Bgl* II y *Eco* RI presentes en el extremo 5' de cada uno de los oligonucleótidos en sentido y antisentido, respectivamente (ver Materiales y Métodos) (Fig. 25a, c). Amplificamos también un fragmento de 549 pb de la región 3' del gen, el cual corresponde a una porción de la región catalítica de la proteína EhODP1 (Fig. 25a, d). Al obtener ambos amplificados que correspondían a los extremos 5' y 3' de la región codificante del gen *Ehodp1*, concluimos que este gen era transcripcionalmente activo.

Figura 24. Secuencias de las cajas conservadas A y B identificadas en EhODP1 y en DNA polimerasas codificadas en plásmidos mitocondriales de hongos y en *T. vaginalis*. Las cajas se localizaron a partir de un multialineamiento usando el programa ClustalW. En las secuencias de aminoácidos de las cajas A y B los aminoácidos idénticos se enmarcan en negro y los cambios conservados se muestran en gris. Los números indican la posición de los aminoácidos en cada proteína. *Nin*: *Neurospora intermedia*; *Gsp*: *Gelasinospora sp*; *Ain*: *Ascobolus immersus*; *Fve*: *Flammulina velutipes*; *Cpe*: *Crinipellis perniciosa*; *Aae*: *Agrocybe aegerita*; *Kla-2*: *Kluyveromyces lactis* (DNA polimerasa 2); *Skl*: *Saccharomyces kluyveri*; *Pet*: *Pichia etchellsii*; *Mco*: *Morchella conica*; *Ppu*: *Porphyra purpurea*; *Pan*: *Podospora anserina*; *Kla-1*: *Kluyveromyces lactis* (DNA polimerasa 1); *Pkl*: *Pichia kluyveri*; *Ehi-1*: *Entamoeba histolytica* organellar DNA polymerase 1; *Tva*: *Trichomonas vaginalis*.



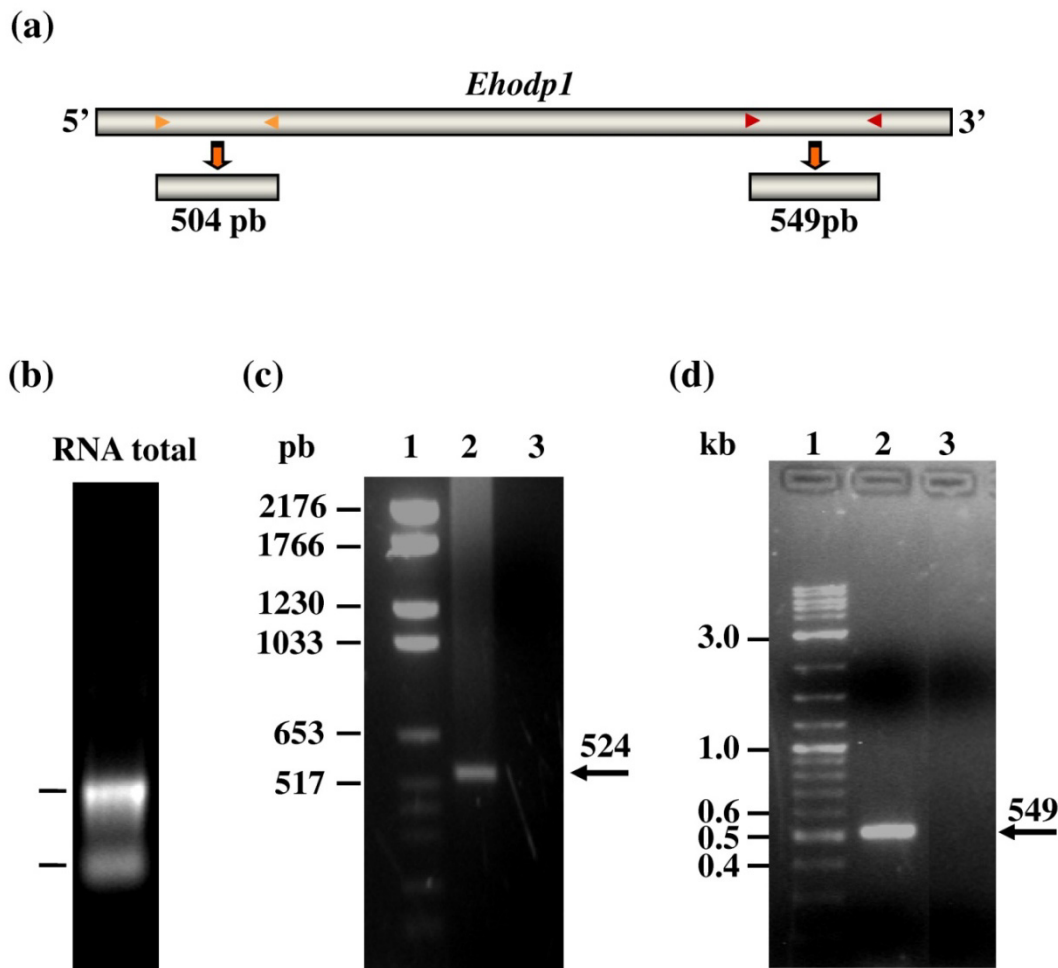


Figura 25. El gen *Ehodp1* de *E. histolytica* es transcripcionalmente activo. A partir del RNA total de los trofozoítos de la clona A, realizamos reacciones de RT-PCR para amplificar dos diferentes fragmentos del gen, uno ubicado en el extremo 5' y otro en el extremo 3'. **(a)** Esquema que muestra las regiones del gen *Ehodp1* seleccionadas para la amplificación por RT-PCR, así como los tamaños esperados de los amplicones. Las flechas indican la localización de los oligonucleótidos empleados para amplificar cada fragmento del gen. **(b)** Electroforesis en gel de agarosa al 1.2% conteniendo formaldehído del RNA total obtenido y visualizado con bromuro de etidio. **(c)** Electroforesis en gel de agarosa al 1% de las reacciones de RT-PCR del extremo 5' del gen *Ehodp1*. Carril 1: Marcadores de tamaño molecular de DNA (Marker VI); carril 2: Amplificado de 524 pb correspondiente al fragmento de 504 pb del gen *Ehodp1* conteniendo además, los sitios de corte para las enzimas *Bgl* II y *Eco* RI insertados en los oligonucleótidos en sentido y en antisentido en sus extremos 5', respectivamente; carril 3: Control negativo de la RT-PCR, donde no se incluyó la transcriptasa reversa (RT). **(d)** Electroforesis en gel de agarosa al 1% de las reacciones de RT-PCR del extremo 3' del gen *Ehodp1*. Carril 1: Marcadores de tamaño molecular (DNA 2 Log); carril 2: Amplificado de 549 pb del gen *Ehodp1*; carril 3: Control negativo de la RT-PCR donde no se incluyó RT.

4. Secuenciación parcial del gen *Ehodp1*

Para verificar la secuencia de nucleótidos del gen *Ehodp1* reportada en el banco de The Sanger Institute para el contig1, diseñamos varios oligonucleótidos para amplificar diferentes fragmentos del gen a partir de DNA genómico de la clona A o a partir de RNA cuando empleamos la técnica de 3'-RACE (ver Materiales y Métodos) (Fig. 26). A partir del extremo 5' del gen amplificamos por PCR, dos fragmentos, uno de 894 pb (Fig. 27a) y otro de 1,557 pb (Fig. 27b). El primero fue clonado en el vector pRSET A (Fig. 27a) para ser expresado en bacterias. A partir del extremo 3' del gen amplificamos dos fragmentos, uno por PCR a partir de DNA genómico que contenía 1,116 nucleótidos correspondiente a la región catalítica de la proteína, el cual fue clonado en el vector pGEM-T-EAasy (Fig. 27d, e), y un segundo fragmento de 2,029 pb (que incluye al primer fragmento) el cual fue amplificado por 3'-RACE (Fig. 27c). Con los productos amplificados realizamos las reacciones de secuenciación siguiendo el método de terminación de la cadena de la DNA polimerasa descrito por Sanger y col., (1977). Las secuencias que obtuvimos las comparamos con la reportada para el contig1 y las alineamos entre sí para armar la secuencia del gen *Ehodp1*. Como resultado de estas secuenciaciones leímos 2,522 nucleótidos, lo cual representa el 73% del gen completo reportado en el contig1 (Fig. 26b). La secuencia del gen *Ehodp1* de la clona A está disponible en la base de datos del GenBank con el número de acceso EU423197. En las secuencias de los productos de PCR obtenidos a partir de DNA genómico encontramos cambios en dos nucleótidos en relación con la secuencia reportada para el contig1, que se obtuvo a partir de la cepa

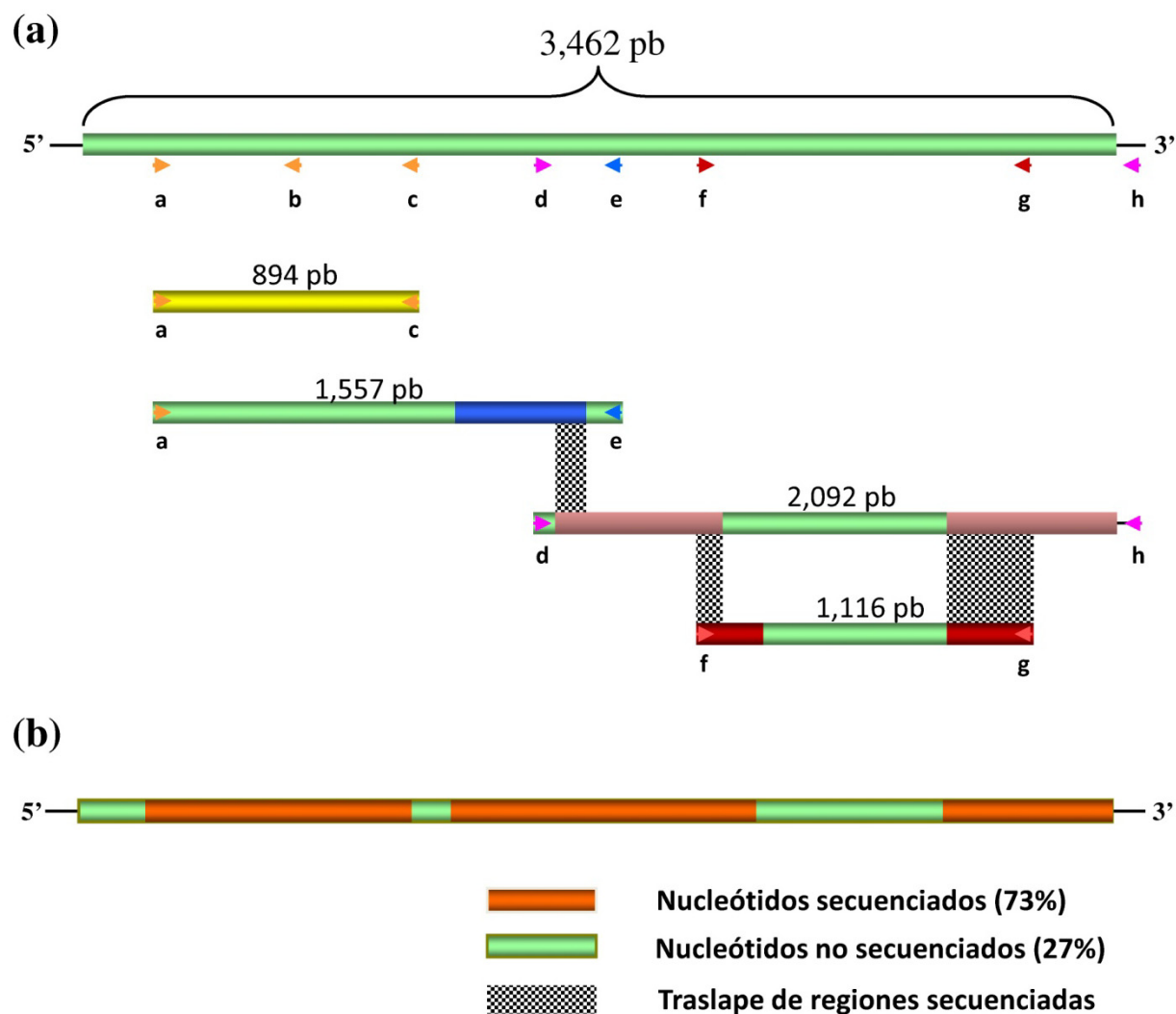
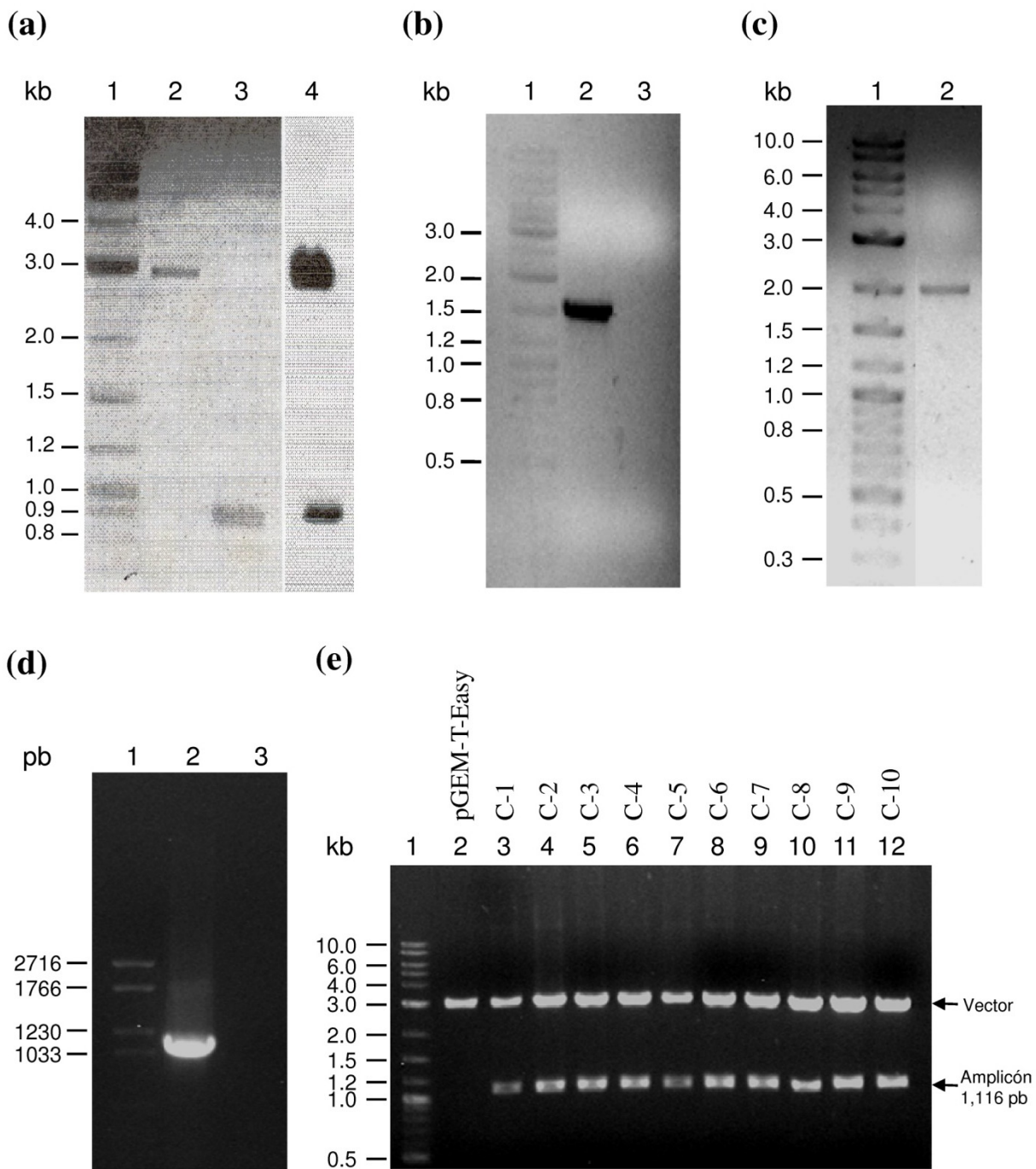


Figura 26. Esquema de las regiones amplificadas y secuenciadas del gen *Ehodp1*. (a) En la figura se muestra un esquema del gen de *Ehodp1* y los fragmentos amplificados por PCR. Las letras corresponden a los oligonucleótidos utilizados en la amplificación de cada fragmento (Materiales y Métodos) y las flechas indican su posición relativa en el gen. Las regiones secuenciadas a partir de diferentes fragmentos se muestran en colores: El amarillo corresponde al fragmento de 894 pb, el azul al de 1,557 pb, el rojo es parte del fragmento de 1,116 pb y el rosa corresponde al de 2,029 pb. En sombreado se indican las regiones compartidas entre diferentes fragmentos corroboradas por secuenciación. (b) Esquema que muestra las regiones secuenciadas en color naranja.

Figura 27. Análisis por electroforesis en gel de agarosa de los fragmentos del gen *Ehodp1* amplificados por PCR y que fueron secuenciados. Los amplicones se analizaron por electroforesis en geles de agarosa al 1% y se tiñeron con bromuro de etidio. **(a)** Amplificación del fragmento de 894 pb del extremo 5' del gen a partir de DNA genómico (gDNA) y su clonación en el vector pRSET A. Carril 1: Marcadores de tamaño molecular (DNA 2 Log); Carril 2: Vector pRSET A linearizado con *Eco* RI y *Bgl* II; carril 3: Fragmento purificado de 894 pb digerido con *Eco* RI y *Bgl* II; carril 4: DNA plasmídico de una clona recombinante cortada con *Eco* RI y *Bgl* II, donde se libera el fragmento de 894 pb. **(b)** Amplificación por PCR de un fragmento de 1,557 pb del extremo 5' del gen *Ehodp1* a partir de gDNA. Carril 1: Marcadores de tamaño molecular (DNA 2 Log); carril 2: Amplicón de 1,557 pb; carril 3: Control sin *Taq* DNA polimerasa. **(c)** Amplificación de un fragmento de 2,029 pb del extremo 3' del gen *Ehodp1* a partir de RNA total por 3'-RACE (ver Materiales y Métodos). Carril 1: Marcadores de tamaño molecular (DNA 2 Log); carril 2: Fragmento amplificado de 2,029 pb. **(d)** Amplificación del fragmento de 1,116 pb del extremo 3' del gen *Ehodp1* a partir de gDNA. Carril 1: Marcadores de tamaño molecular (Marker VI); carril 2: Amplicón de 1,116 pb; carril 3: Reacción de PCR control realizado sin *Taq* DNA polimerasa. **(e)** Clonación del fragmento de 1,116 pb del gen *Ehodp1* en el vector pGEM-T-Easy. Carril 1: Marcadores de tamaño molecular (DNA 2 Log); carril 2: pGEM-T-Easy linearizado con la enzima *Not* I; carriles 3 a 12: DNA plasmídico de las clonas transformantes (C-1 a C-10) digeridas con *Not* I, donde se observa la liberación del fragmento de 1,116 pb en todas clonas.



de *E. histolytica* HM1:IMSS. Ninguno de estos cambios conlleva a un cambio en el marco de lectura de la proteína; sin embargo, resultaron en la permuta de dos de los aminoácidos de la secuencia codificada en el contig1: treonina 934 (polar sin carga) por prolina (hidrofóbico) y glicina 1,114 (polar sin carga) por serina (polar sin carga).

5. El genoma de *E. histolytica* contiene ocho genes que codifican para probables DNA polimerasas de la familia A y de la familia B

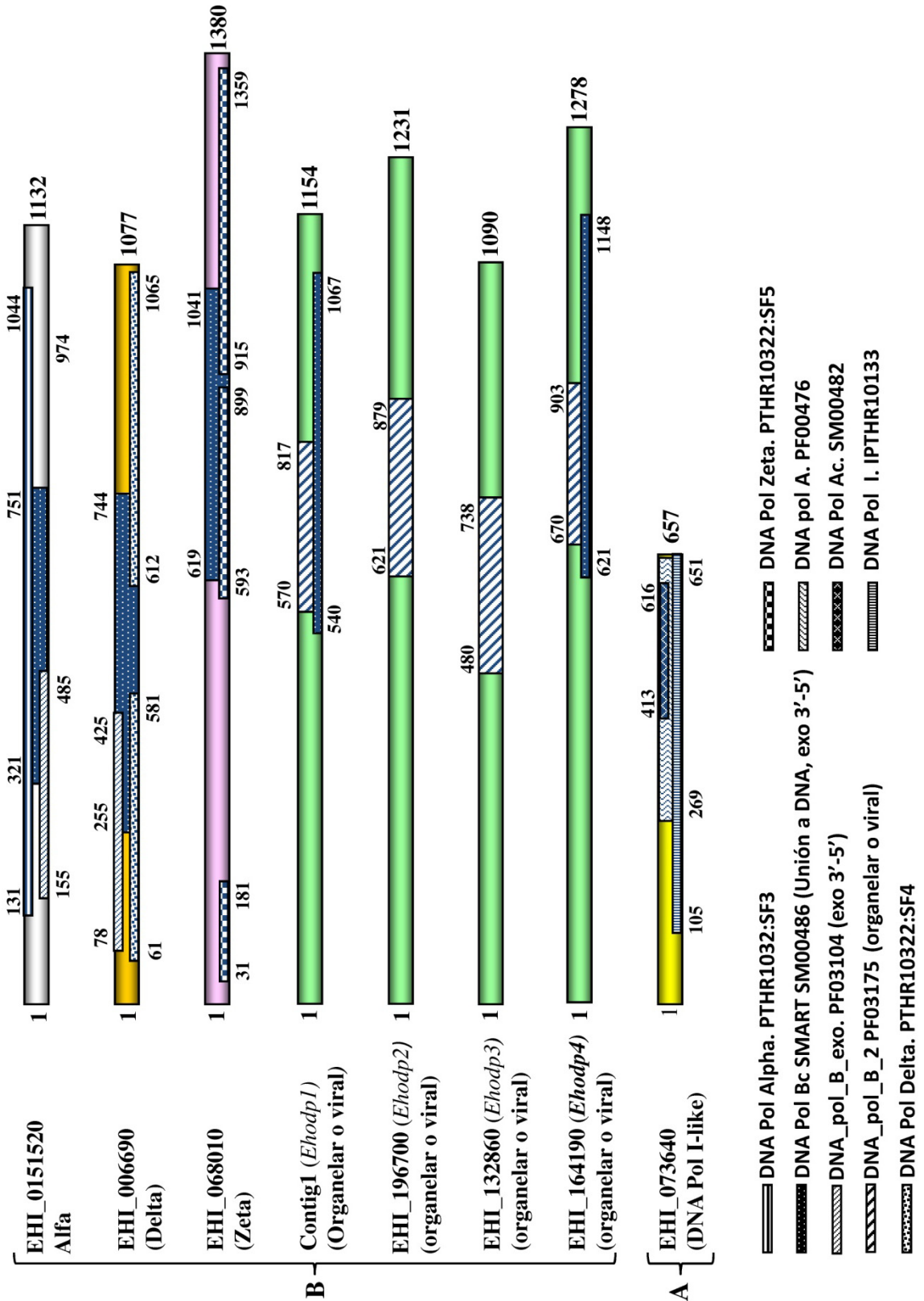
Con el propósito de tener un panorama más completo de las DNA polimerasas existentes en *E. histolytica*, y una vez liberada la base de datos del genoma de *E. histolytica* (<http://pathema.jcvi.org/Pathema/>) (Loftus y col., 2005), realizamos una nueva búsqueda de genes de DNA polimerasas y encontramos inicialmente otras seis secuencias que codifican para este tipo de enzimas. Posteriormente, en otra exploración en Pathema, encontramos un gen más con similitud a *Ehodp1*, resultando finalmente un total de 8 genes (incluyendo *Ehodp1*) codificadores de probables DNA polimerasas en *E. histolytica*. En estas secuencias procedimos a buscar los dominios característicos para cada una de las probables proteínas. Una de ellas tiene similitud con DNA polimerasas de la familia A y las siete restantes presentaron similitud con DNA polimerasas de la familia B (Fig. 28).

La secuencia EHI_073640 codifica para una DNA polimerasa de la familia A relacionada con DNA pol I y presenta los dominios DNA pol A (PF00476), Pol Ac.

(SM00482) y DNA Pol I-like (IPTHR10133) (Fig. 28). De las polimerasas de la familia B, tres son de ubicación nuclear. La proteína codificada en el locus EHI_0151520 presenta el dominio característico de DNA polimerasa α (PTHR1032:SF3), el dominio de actividad de exonucleasa 3'→5' (DNA_pol_B_exo. PF03104) y el dominio de unión aDNA (POLBc SMART SM00486). La secuencia del locus EHI_006690 codifica para una DNA polimerasa δ (PTHR10322:SF4) con los dominios de exonucleasa 3'→5' y de unión al DNA (PF03104, SM00486). La proteína codificada en EHI_068010 tiene las regiones que la clasifican como DNA polimerasas de tipo ζ (PTHR10322:SF) y los dominios de unión a DNA y de actividad de exonucleasa 3'→5' (POLBc SMART SM00486).

Las cuatro secuencias restantes: Contig1 (Ehodp1), EHI_196700, EHI_132860 y EHI_164190, codifican para proteínas con el dominio característico de DNA polimerasas de tipo organelar o viral DNA_pol_B_2 (PF03175) (Fig. 28). Las proteínas codificadas por *Ehodp1* y EHI_164190 presentan el dominio de unión a DNA y actividad de exonucleasa 3'→5' (POLBc SMART SM00486). Es importante mencionar que las secuencias putativas para DNA polimerasas de tipo organelar o viral fueron liberadas en los bancos en diferentes tiempos durante el proceso del presente trabajo, no obstante, por razones didácticas incluimos a partir de aquí el análisis de las cuatro secuencias, si bien EHI_164190 fue anotada en el banco de datos posteriormente a los otros tres genes.

Figura 28. Probables DNA polimerasas codificadas en el genoma de *E. histolytica*. En la figura se muestra el esquema de cada una de las DNA polimerasas presentes en el genoma amibiano, la localización de sus dominios característicos, su tamaño y sus números de acceso. Los dominios se localizaron en las secuencias mediante el uso de los programas Pfam, SMART, PANTHER e InterPro. **A**, DNA polimerasas de la familia A. **B**, DNA polimerasas de la familia B.



6. Análisis estructural de las cuatro probables DNA polimerasas de tipo organelar o viral pertenecientes a la familia B de *E. histolytica*

Los tres genes que codifican para probables DNA polimerasas de tipo organelar o viral, liberados en los bancos de datos para la cepa HM1:IMSS en fecha posterior a la fecha de liberación de la secuencia para *Ehodp1*, están registrados con los números de acceso EHI_196700 (GenBank ID: XM_643104), EHI_132860 (GenBank ID: XM_644753) y EHI_164190, y por analogía con *Ehodp1*, los nombramos *Ehodp2*, *Ehodp3* y *Ehodp4*, respectivamente. Como se mencionó previamente, la secuencia del gen *Ehodp1* (contig1) tiene un marco de lectura abierto de 3,462 nucleótidos que codifica para una proteína de 1,154 aminoácidos con una masa molecular teórica de 135.5 kDa. *Ehodp2* tiene un marco de lectura abierto de 3,696 pb y codifica para una proteína hipotética de 1,231 aa con un peso molecular teórico de 147.7 kDa, *Ehodp3* tiene una secuencia de 3,273 pb que codifica para un polipéptido de 1,090 aa con un peso molecular calculado de 129.2 kDa, mientras que el gen *Ehodp4* tiene una longitud de 3,897 pb y codifica para una probable proteína de 1,278 aa de 149.5 kDa. Para determinar el grado de similitud entre las DNA polimerasas codificadas por estos genes procedimos a realizar un alineamiento de las mismas con el programa ClustalW (Fig. 29). El análisis del resultado nos indicó que las cuatro proteínas son muy conservadas, sobre todo hacia el extremo carboxilo terminal, con identidades que variaron entre el 51 y el 63% (Tabla 5). Todas ellas

presentan las cinco cajas consenso (I, II, III, A y B) mencionadas en la organización estructural de EhODP1 (Fig. 29).

7. *Ehodp1*, *Ehodp2*, *Ehodp3* y *Ehodp4* son genes transcripcionalmente activos

Previamente habíamos comprobado que el gen *Ehodp1* es transcripcionalmente activo, pero en vista de la existencia de 4 genes codificadores de probables DNA polimerasas organelares en el genoma de *E. histolytica*, lo que hicimos subsecuentemente fue investigar si los otros tres genes se estaban expresando también en los trofozoítos. Para ello obtuvimos RNA total de trofozoítos de la clona A y realizamos amplificaciones a partir de cDNA con oligonucleótidos específicos para cada uno de los genes (Tabla 3, Fig. 29). Con los oligonucleótidos diseñados para *Ehodp1*, *Ehodp2*, *Ehodp3* y *Ehodp4*, amplificamos cada uno de los fragmentos esperados de 524 pb, 317 pb, 149 pb y 376 pb, respectivamente (Fig. 30). Como se esperaba, no se obtuvieron productos en las reacciones controles que se realizaron en las mismas condiciones excepto que no se añadió en cada caso la transcriptasa reversa (Fig. 30), para verificar la ausencia de DNA contaminante en el RNA.

Figura 29. Alineamiento múltiple de cuatro probables DNA polimerasas organelares presentes en el genoma de *E. histolytica*. Para realizar una comparación en la estructura de las probables DNA polimerasas organelares reportadas en el genoma de *E. histolytica*, se realizó un alineamiento de los polipéptidos correspondientes con el programa ClustalW. Los aminoácidos idénticos se marcan en fondo negro y los cambios conservados en fondo gris. Se enmarcan las regiones I, II y III específicas de la familia B y las regiones A y B que son compartidas con DNA polimerasas codificadas en plásmidos mitocondriales. Las cabezas de flecha señalan los residuos de ácido aspártico (D) necesarios para la actividad catalítica de las DNA polimerasas. La línea punteada subraya el dominio II de exonucleasa 3'→5'. Las flechas muestran los sitios que se utilizaron en el diseño de los oligonucleótidos específicos usados para realizar amplificaciones por RT-PCR. Los números 1, 2, 3 y 4 corresponden respectivamente a los genes *Ehodp1*, *Ehodp2*, *Ehodp3* y *Ehodp4* (ver Materiales y Métodos). Los números localizados a la izquierda de las secuencias indican la posición de los aminoácidos en cada polipéptido.

EhODP1	1	-----SKKDYERMEKTTTTFVSNELGSRHHLELEKTSNESHVAESEGHR	2	4
EhODP2	1	-----KDYLNFSHFKIYQMSYRKENLKTQBEILNLLRNNRRNTQKERRIQQIEETIEIEEKKEENIGHBT		
EhODP3	1	-----		
EhODP4	1	MSYRQNKNNIFNIKRKEQERRRQRRRQQLNDHRAIEDGTVDDHRRFRRVTRKKDYERMEKTTTTFVSNESDGDYAELEKTVTNSHSAFFENHR		
EhODP1	46	EVEKTTTSSHSYCFETIGDRVNRRESGRITQSFQVPPPPDFF-----VSPSRSEF	1	2
EhODP2	73	SEVERERNKRERERRRAERKEERERNQEBENENKEKTAITINDRINN-----INKNRNFHENSDSEYQRSK		
EhODP3	1	-----MKBERNTARR		
EhODP4	101	EVEKTTTSSHSYCFETIGDRVNRREAVTKSRPEPQASGEQAEFYEAIDSLAKEKASGTIGEYGAGAISARLSGDRSVSGASPTTFSPDPLNDF	3	4
EhODP1	101	SLPEETFNPSFTVZPIEPENDAQWMEPLDGEVAALLFEINHEEYTPLDILTLDVPPPTENEIQLQIARENTDDEIEFTVIKRDFGLENTAQA		
EhODP2	146	REDRAREKREKELNRNRIEEQEVNONGNONGNSNDTSNDEFEIIONELIENIPTQOEELQTTIERNPKRSYEFYKSKLQSGNEYEAE		
EhODP3	11	YNETAKETARIEEPTREEVEEREEAVQOQGEERSVSDSSNDEVLEFNLNNQNEQIDELINNNPYDDIILYNERLAD-----NDGLIPHRSSTEAE		
EhODP4	201	SQAPNPEETFEVPTNVFPNDQWMEPLDGEVAALLFEINHEENATLFLTLDRVPPPTENEIHLQARANNDDIEFVIKRDFGLENTAQA	3	
EhODP1	201	WRGMLGETYRISRLIKYGLIPLVELVFGCR---TRRFVNLNLEPQEFNCOVGFVDVGEFFWRSYDDRENEINIPPKLVNELLITILKPPORORI		
EhODP2	246	VENVREKTRAVKPEKQPSQVTHFGNGRVITKPEPHNMENINIEEFGALNDEETISFWRVYDDE-DNPPIPGCLVRQIKKIGEVKERRAI		
EhODP3	106	WNEAENVEDIVGTERNGHGARTITFGNGFTISNRPFQNNNNINIEEHLNFDGIEEFWRNYDDEGWNLVPPCALVREIVVESGLIPRRRI		
EhODP4	301	WRGMLGETYRISRLIKYGLIPLVELVFGCR---RRRFVNLNLEPQEFNCOVGFVDVGEFFWRSYDDESEINIPPKLVNELLITILKPPORORI	1	
EhODP1	297	EGALFNYYILVSHWAPERTLKKYQIYSKEDIVOLENCFHCLNHSHTLTKEMEKIRKQKGNVTYKKMKRIAPPHLNILFYNGEK---IVTNNTK		
EhODP2	345	EGGFTGYLKEDEWELASHFEKYOIYTKMTIRSENCFFNCLFESGVDDISLETIRSMIKGQTSKKNIKKICERGFRELAYVDEKEKVYKKEHIG		
EhODP3	206	EGGFTGYLKEDEWELASHFEKYOIYTKMTIRSENCFFNCLFESGVDDISLETIRSMIKGQTSKKNIKKICERGFRELAYVDEKEKVYKKEHIG		
EhODP4	397	DGAVFNYYIDSHWAPERTLKKYQIYVLDEIATENCFFNCLFESGVLTSEMTHTRSIIKGTISVTKKLLQABEELNLTLYYKGGK---HESSOIT		
EhODP1	394	HGEIITIKELIRNENFHYVDEKVPVLTTFYTHHYEIVNYCENENKDIKEENVRKKEGELIYHSLONTPLIKCKELREVGAKEIVNDMIRKRVY		
EhODP2	445	TEGNTIEMFLERWNGCHYINNEKPLTTFPIKKEKIKKYCEBENNKINKYLYTERKNCQVETLLOQKAPAOQLKEEGAPBEISKEDITQOHLV		
EhODP3	304	NECHITIELIRNKSPHYIFNEKVPVLTTFPIKKEKIKKYCEBENNKINKYLYTERKNCQVETLLOQKAPAOQLKEEGAPBEISKEDITQOHLV		
EhODP4	494	YGNRSVKIELERWRKNNHYIDTIVFTSYFITHYETVYAKENNEDITKYENVKERGOYRHSLSRFPAYCCKILCESNAKKEITRDCIKITRY		
EhODP1	494	SLFSPENISYVESKILVEDKKSSEITNATLADFECEFTSGEYKSCITVMEVGVKKFYGMNCDKFTINTOTIESPICYFHNLYGDRFLAAY		
EhODP2	545	DADKLOVRLTETPYPKYKICESKEIREVEYNVYADFEOMVKCEHHIPFCVVVIDKGVANTFYGLNCCKEFTIYLSNPNPICYFHNLYGDRFLAAY		
EhODP3	404	DADKLVKLOVDSNPKYKICESKEHEPRKNEVYADFEOMVKCEHHIPFCVVVIDKGVANTFYGLNCCKEFTIYLSNPNPICYFHNLYGDRFLAAY		
EhODP4	594	SLFDSINDEKIKESKIMGEIKKEVITNATLADFECEFTSGEYKSCITVMEVGVKKFYGMNCDKFTINTOTIESPICYFHNLYGDRFLAAY		
Caja A				
EhODP1	593	GIINLVKKGKVIYKMTIKIN-GKKIIFKDTLALIPSTISNFKIFFKLDGKYEKEIFPYIYYNEETNIGVIECNWKEPSSWSEKIACFKENLIRNKM		
EhODP2	645	GIICIRKGSNIYVMVIRTHGKKIIFKDTLGLIPSTISNFKIFFKLDGKYEKEIFPYIYYDYNTIEVGTIEGCWNNETPWPBESKIKFEKKNITGCL		
EhODP3	504	GIICIRKKGHNIVSMVIRTHGKKIRKDKSLGLIPSTISNFKIFFKLDGKYEKEIFPYIYYDYNTIEVGTIEGCWNNETPWPBESKIKFEKKNITGCL		
EhODP4	693	GIINLVKKGKVIYKMTIKIN-GKKIIFKDTLALIPSTISNFKIFFKLDGKYEKEIFPYIYYNEETNIGVIECNWKEPSSWSEKIACFKENLIRNKM		
Caja B				
EhODP1	692	INETINTEKYCEYYCLRDVVLVREGFLKYNMARENALDCTCFSTLSALSYFFKNNCEVQDFLFEYTCNVREYIKQAYGGRNMLGENKKNHMDREI		
EhODP2	745	LDNCFNTTKYCEYYCKRDVVLVREGFLKYNMARENALDCTCFSTLSALSYFFKNNCEVQDFLFEYTCNVREYIKQAYGGRNMLGENKKNHMDREI		
EhODP3	604	PNCFNTTKYCEYYCKRDVVLVREGFLKYNMARENALDCTCFSTLSALSYFFKNNCEVQDFLFEYTCNVREYIKQAYGGRNMLGENKKNHMDREI		
EhODP4	792	DDTTFNSKKYCEYYCLRDVVLVREGFLKYNMARENALDCTCFSTLSALSYFFKNNCEVQDFLFEYTCNVREYIKQAYGGRNMLGENKKNHMDREI		
Caja II				
EhODP1	792	VDFDACSLYPSAARLIPTGAPRVNKRLOIYMEHLMDEQQYETFOERYISYFVTEITAKVKKRRMPIIKKNGINCYVNEPSVTVDSIYLEDLI		
EhODP2	845	VDFDACSLYPSAARLIPTGAPRVNKRLOIYMEHLMDEQQYETFOERYISYFVTEITAKVKKRRMPIIKKNGINCYVNEPSVTVDSIYLEDLI		
EhODP3	704	VDFDACSLYPSAARLIPTGAPRVNKRLOIYMEHLMDEQQYETFOERYISYFVTEITAKVKKRRMPIIKKNGINCYVNEPSVTVDSIYLEDLI		
EhODP4	892	VDFDACSLYPSAARLIPTGAPRVNKRLOIYMEHLMDEQQYETFOERYISYFVTEITAKVKKRRMPIIKKNGINCYVNEPSVTVDSIYLEDLI		
Caja III				
EhODP1	892	KYQIEFNVKEGIYWGGRASLFKEKIRKIDYIRKORRAEDPSEVIFKLMNSYGKTIQKPIPEETIKLFRKHKMLSYWKRNLLEDILSGEOLYOSDIW		
EhODP2	945	KYQIEFNVKEGIYWGGRASLFKEKIRKIDYIRKORRAEDPSEVIFKLMNSYGKTIQKPIPEETIKLFRKHKMLSYWKRNLLEDILSGEOLYOSDIW		
EhODP3	804	KYQIEFNVKEGIYWGGRASLFKEKIRKIDYIRKORRAEDPSEVIFKLMNSYGKTIQKPIPEETIKLFRKHKMLSYWKRNLLEDILSGEOLYOSDIW		
EhODP4	992	KYQIEFNVKEGIYWGGRASLFKEKIRKIDYIRKORRAEDPSEVIFKLMNSYGKTIQKPIPEETIKLFRKHKMLSYWKRNLLEDILSGEOLYOSDIW		
Caja I				
EhODP1	992	IVNKKQIDDFYVFNIIIGVLLSMSKRIMNELIYLCELDHIVYQDTSIHKKDLIRKEKEKFKYGRDLVGSSEYQFHSDFPFVKGKPSWSIKSIF		
EhODP2	1045	IVNKKQIDDFYVFNIIIGVLLSMSKRIMNELIYLCELDHIVYQDTSIHKKDLIRKEKEKFKYGRDLVGSSEYQFHSDFPFVKGKPSWSIKSIF		
EhODP3	904	IVNKKQIDDFYVFNIIIGVLLSMSKRIMNELIYLCELDHIVYQDTSIHKKDLIRKEKEKFKYGRDLVGSSEYQFHSDFPFVKGKPSWSIKSIF		
EhODP4	1092	IVNKKQIDDFYVFNIIIGVLLSMSKRIMNELIYLCELDHIVYQDTSIHKKDLIRKEKEKFKYGRDLVGSSEYQFHSDFPFVKGKPSWSIKSIF		
EhODP1	1092	LGKRSYLDVLNEDGDIYILIRMGKIPKRVILGSAKEKFEQDVVALYELHYSYPLSPDLSEI-----	1154	
EhODP2	1145	LGKRSYLDVLNEDGDIYILIRMGKIPKRVILGSAKEKFEQDVVALYELHYSYPLSPDLSEI-----	1231	
EhODP3	1004	LGKRSYLDVLNEDGDIYILIRMGKIPKRVILGSAKEKFEQDVVALYELHYSYPLSPDLSEI-----	1090	
EhODP4	1192	LGKRSYLDVLNEDGDIYILIRMGKIPKRVILGSAKEKFEQDVVALYELHYSYPLSPDLSEI-----	1278	

Tabla 5. Valores de identidad y similitud entre las probables DNA polimerasas de tipo organelar de *Entamoeba histolytica*.

DNA polimerasas	aa alineados	I (%)	S (%)
EhODP1 vs EhODP2	1028	51	69
EhODP1 vs EhODP3	1031	51	67
EhODP1 vs EhODP4	1154	63	76

I: Porcentaje de identidad; S: porcentaje de similitud

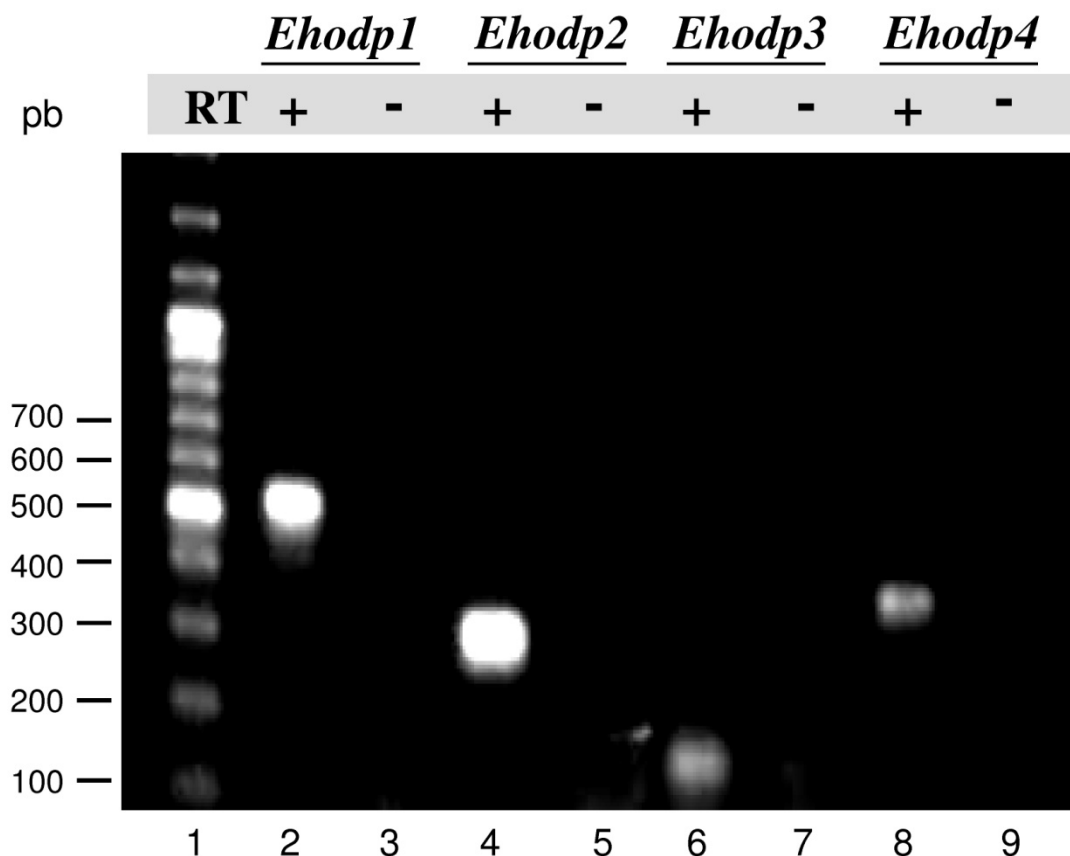


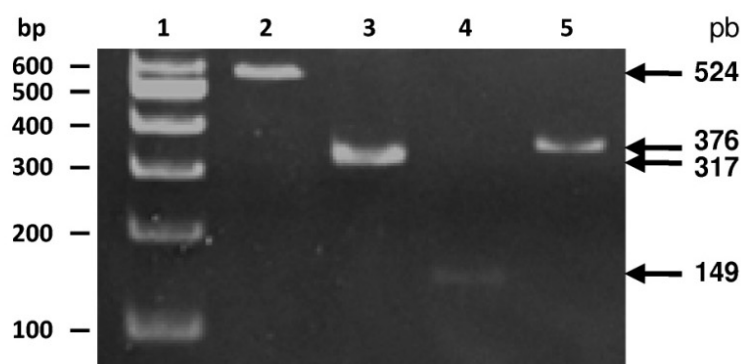
Figura 30. Los genes *Ehodp1*, *Ehodp2*, *Ehodp3* y *Ehodp4* se expresan en los trofozoítos de *E. histolytica*. Amplificación de cuatro fragmentos específicos para cada uno de los genes *Ehodp*'s mediante RT-PCR. Los productos de amplificación se analizaron mediante electroforesis en gel de poliacrilamida al 6% en TBE 0.5X y tinción con bromuro de etidio. Carril 1: Marcadores de tamaño molecular de DNA (100 pb ladder); carril 2: Fragmento amplificado de 524 pb del *Ehodp1*; carril 4: Fragmento amplificado de 317 pb del gen *Ehodp2*; carril 6: Amplicón de 149 pb del gen *Ehodp3*; carril 8: Amplificado por PCR del fragmento de 376 pb del gen *Ehodp4*. Los carriles (-) 3, 5, 7 y 9 son controles negativos de la RT-PCR para cada uno de los genes en cuyas reacciones no se adicionó la transcriptasa reversa.

Posteriormente, para determinar los niveles de expresión relativos de cada uno de los genes, realizamos RT-PCRs semicuantitativas (Fig. 31a) con los oligonucleótidos utilizados en el experimento anterior. Como control del nivel de expresión de cada uno de los genes, los datos fueron normalizados con base en la expresión del gen de actina (Fig. 31b). Previamente, estandarizamos las condiciones de la RT-PCR para cada uno de los genes de tal manera que el número de ciclos seleccionado en el experimento final, permitiera la cuantificación de los productos en la fase exponencial de cada reacción, que para todos los casos fue de 29 ciclos (resultados no mostrados). Los resultados obtenidos nos mostraron que bajo las condiciones experimentales realizadas los cuatro genes se expresan de manera diferencial en los trofozoítos. Debido a que el gen *Ehodp1* presentó el mayor nivel de expresión, éste fue considerado como el 100% para calcular la abundancia relativa de los otros tres genes, resultando así la expresión del gen *Ehodp2* del 96.7%, del gen *Ehodp3* tan sólo del 3.7% y del gen *Ehodp4* del 35% (Fig. 31c).

Una vez que habíamos comprobado que el gen *Ehodp1* se transcribe en los trofozoítos, proseguimos a investigar si la proteína correspondiente también se producía en *E. histolytica*. Para alcanzar este objetivo, procedimos en primera instancia a construir un plásmido recombinante conteniendo una región del extremo 5' del gen *Ehodp1* que codifica para un fragmento de 894 pb; posteriormente expresamos el polipéptido recombinante de EhODP1 para la producción de anticuerpos. Sin embargo, posteriormente a la liberación de la secuencia del genoma de la amiba encontramos los genes *Ehodp2* y *Ehodp3* y al realizar un alineamiento de las secuencias polipeptídicas nos percatamos de que tenían regiones de

Figura 31. Análisis de la expresión relativa de los genes *Ehodp1*, *Ehodp2*, *Ehodp3* y *Ehodp4* en trofozoitos de *E. histolytica*. Para determinar los niveles de expresión relativos de los genes *Ehodp*'s, realizamos RT-PCRs semicuantitativas para cada uno de ellos. **(a)** Productos de RT-PCR semicuantitativa separados en PAGE al 6% y teñidos con bromuro de etidio. Carril 1: Marcadores de tamaño molecular de DNA (100 pb ladder); carril 2: Amplificado de 524 pb del gen *Ehodp1*; carril 3: Fragmento de 317 pb del gen *Ehodp2*; carril 4: Amplificado de 149 pb del gen *Ehodp3*; carril 5: Amplificado de 376 pb del gen *Ehodp4*. Las flechas señalan los amplicones obtenidos. **(b)** Producto de amplificación por RT-PCR del gen de actina usado como control (fragmento de 222 pb). **(c)** Análisis densitométrico de la expresión de los genes *Ehodp*'s mostrados en **(a)**. El nivel de expresión de los genes *Ehodp*'s fue medida en pixeles y fue normalizada con respecto del nivel de expresión del gen de actina. La expresión de *Ehodp1* fue considerada como el 100% y se tomó como referencia para la expresión de los otros genes. Los datos son el promedio de tres experimentos.

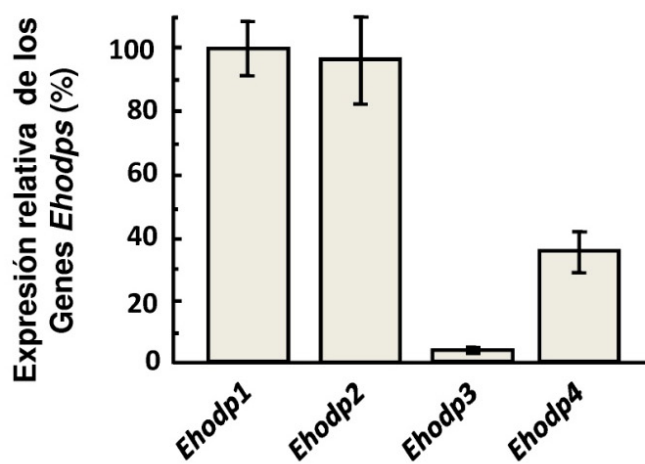
(a)



(b)



(c)



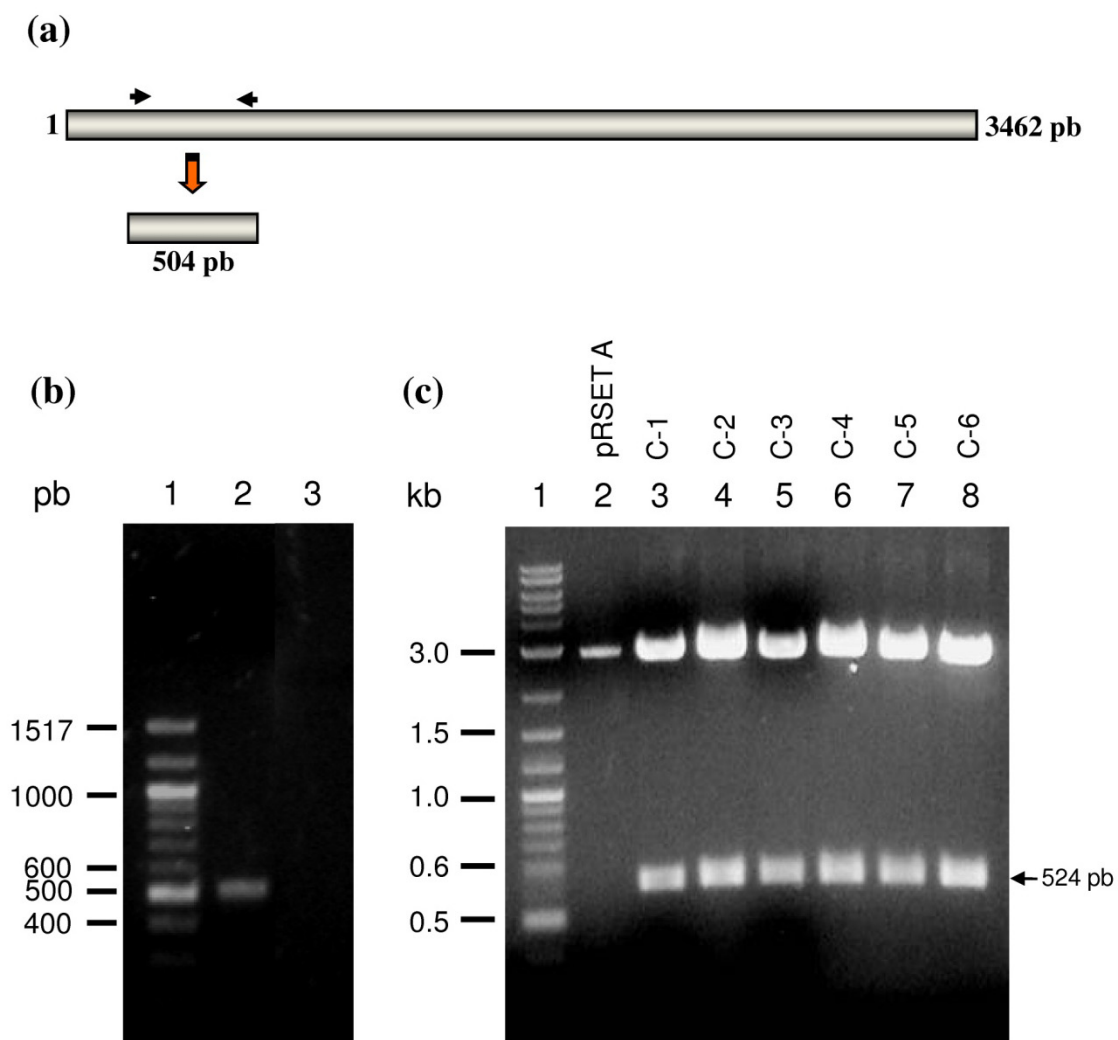
aminoácidos compartidas con el polipéptido recombinante expresado de EhODP1. Por esta razón procedimos a realizar otra construcción con una región del gen *Ehodp1* que no estuviera presente en *Ehodp2* y *Ehodp3*.

Para realizar esta construcción, amplificamos por PCR, a partir de DNA genómico de la clona A, un fragmento específico de *Ehodp1* de 504 pb localizado en la región 5' del gen (Fig. 25a, c; Figs. 29 y 32). Sin embargo, es importante señalar que para cuando ya se había realizado todo el trabajo hasta la obtención de los anticuerpos anti-EhODP1 que se describe más adelante, se anotó en el genoma amibiano la secuencia correspondiente al gen *Ehodp4*.

8. Construcción de los plásmidos recombinantes prRSET A-*Ehodp1*-894 y prRSET A-*Ehodp1*-504 (pr*Ehodp1*).

El fragmento amplificado de 504 pb se purificó y se ligó con el vector de expresión prRSET A y la construcción resultante (pr*Ehodp1*) se usó para transformar células competentes de *E. coli* DH5 α . Una vez crecidas las células transformantes, realizamos la purificación del DNA plasmídico de seis de las clonas transformantes obtenidas y lo digerimos con las enzimas de restricción *Bgl* II y *Eco* RI para verificar la presencia del inserto. El análisis electroforético de las digestiones mostró la presencia de dos bandas con los tamaños esperados de 2.9 kb para el vector y de 524 pb para el inserto clonado (504 pb más los 20 pb correspondiente a los dos sitios de restricción adicionados en los extremos) en todas las clonas transformantes analizadas (Fig. 32). Finalmente, una de las clonas se purificó y se secuenció como

Figura 32. Construcción del plásmido recombinante prRSET-A-*Ehodp1*-504 (pr*Ehodp1*). Con el objetivo de obtener un plásmido recombinante que contuviera un fragmento específico del gen *Ehodp1*, clonamos un fragmento de 504 pb localizado en la región 5' del gen *Ehodp1*. **(a)** Esquema del gen *Ehodp1* que muestra la localización relativa de los oligonucleótidos (flechas) empleados en la amplificación del fragmento de 504 pb. **(b)** Electroforesis en gel de agarosa al 1% del producto de amplificación por PCR teñido con bromuro de etidio. Carril 1: Marcadores de tamaño molecular (100 bp DNA ladder); carril 2: Amplificado de 524 pb correspondiente al fragmento de 504 pb de *Ehodp1* conteniendo los sitios de corte para las enzimas *Bgl* II y *Eco* RI insertados en los extremos 5' de los oligonucleótidos a y b, respectivamente (Tabla 3); carril 3: Control negativo de la PCR sin *Taq* DNA polimerasa. **(c)** Electroforesis en gel de agarosa al 1% y tinción con bromuro de etidio de los plásmidos recombinantes digeridos con las enzimas de restricción *Bgl* II y *Eco* RI. Carril 1: Marcadores de tamaño molecular (DNA 2 Log); carril 2: Vector prRSET A cortado con *Bgl* II y *Eco* RI; carriles 3 a 8: DNA plasmídico de las clonas transformantes obtenidas (C-1 a C-6), digeridas con *Bgl* II y *Eco* RI, donde se observa la liberación del fragmento clonado de 524 pb (flecha).



se indicó en Materiales y Métodos. Los resultados de la secuenciación confirmaron que el fragmento clonado correspondía en un 100% con la secuencia del gen *Ehodp1* y que la posición del mismo se encontraba en marco de lectura con la secuencia de aminoácidos codificada en el vector de expresión pRSET A (datos no mostrados).

9. Inducción de la proteína recombinante de 168 aa rEhODP1-168 y su purificación por cromatografía de afinidad

Una vez verificado por secuenciación que el vector *prEhodp1* contenía el fragmento esperado del gen *Ehodp1* y que estaba en marco de lectura con la secuencia de aminoácidos codificada en el vector de expresión, lo utilizamos para transformar células de *E. coli* BL21(DE3)pLysS para inducir la producción de la correspondiente proteína recombinante *prEhODP1-168*. Después de probar diferentes tiempos para la inducción, ésta se realizó con IPTG 1 mM durante 3 horas y, posteriormente, las proteínas totales se separaron por SDS-PAGE al 15% (Fig. 33).

Como resultado de la inducción observamos la presencia de dos bandas proteicas enriquecidas en los extractos totales, una con un peso molecular aparente de 23 kDa muy cercano al esperado para la proteína recombinante de 23.7 kDa y otra con un peso molecular aparente de 33 kDa (Fig. 33a). Procedimos entonces a purificar a la proteína recombinante con base en su afinidad por Ni^{2+} (provista por la región de 6 histidinas localizada en el extremo amino del polipéptido recombinante)

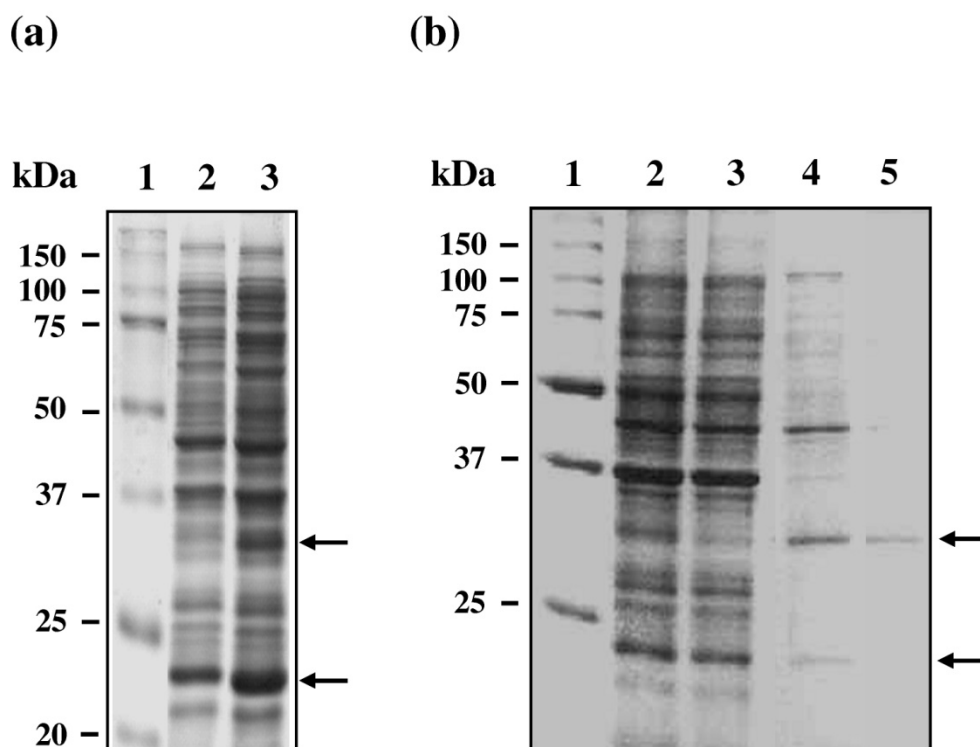


Figura 33. Inducción del polipéptido recombinante rEhODP1-168 en bacterias y su purificación por cromatografía de afinidad. Células competentes de *E. coli* BL21(DE3) pLysS fueron transformadas con el plásmido *prEhodp1* e incubadas a 37°C en presencia de IPTG 1 mM durante 3 horas. Posteriormente, las proteínas fueron separadas por SDS-PAGE al 15% y teñidas con azul de Coomassie. **(a)** Inducción de la proteína recombinante. Carril 1: Marcadores de peso molecular; carril 2: Extracto total de bacterias sin inducir; carril 3: Extracto total de bacterias inducidas. **(b)** Purificación de la proteína recombinante a través de una columna de Ni^{+2} -NTA-agarosa en condiciones desnaturalizantes. Carril 1: Marcadores de peso molecular; carril 2: Extracto de proteínas antes de pasarlo por la columna de afinidad; carril 3: Proteínas no unidas a la columna; carril 4: Proteínas eluidas con urea 8 M a pH 5.9 (Buffer D); carril 5: Proteínas eluidas con urea 8 M a pH 4.5 (Buffer E). Las flechas señalan a las dos proteínas que copurifican.

por cromatografía de afinidad a metal inmovilizado en una columna de Ni^{2+} -nitrilotriacetato-agarosa (Ni^{2+} -NTA-agarosa). Sorprendentemente, las dos proteínas enriquecidas durante la inducción se unieron a la columna y copurificaron en el amortiguador de elución con un pH de 5.9 (Fig. 33b, carril 4). De aquí surgió la cuestión sobre cuál de las dos bandas correspondía a la proteína recombinante esperada. Si fuese la de mayor peso molecular, entonces la de menor tamaño podría ser un fragmento proteolítico procedente del de mayor tamaño y que aún poseería la etiqueta de seis histidinas.

10. Inmunodetección de rEhODP1-168 con anticuerpos monoclonales anti-histidinas

Para determinar cuál de los dos polipéptidos copurificados a partir de la columna de afinidad a Ni^{2+} -NTA-agarosa correspondía con la proteína recombinante esperada realizamos un Western blot con las proteínas purificadas a pH 5.9 empleando anticuerpos monoclonales contra histidinas (Fig. 34b).

El anticuerpo inmunoreaccionó con la banda de 33 kDa, mientras que el péptido de 23 kDa no fue reconocido, indicándonos que la proteína recombinante correspondía a la banda de 33 kDa y que por tanto, la banda de 23 kDa carecía de la etiqueta de seis histidinas; sin embargo, debido a que el tamaño esperado para la proteína recombinante era de aproximadamente 24 kDa y debido al enriquecimiento de la banda de 23 kDa durante la inducción y a su copurificación con la banda de 33 kDa, decidimos verificar si la proteína de 23 kDa había sufrido alguna degradación

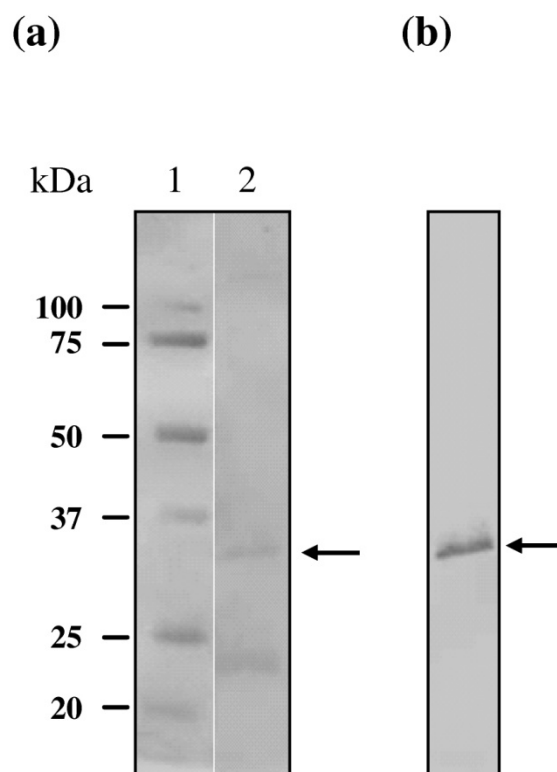


Figura 34. Inmunodetección del polipéptido recombinante rEhODP1-168 con anticuerpos anti-histidinas mediante Western blot. Las proteínas de la fracción D obtenidas durante la purificación a través de una columna de Ni^{2+} -NTA-agarosa se separaron por SDS-PAGE al 15% y se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa. **(a)** Membrana de nitrocelulosa teñida con Rojo de Ponceau. Carril 1: Marcadores de peso molecular; carril 2: Proteínas purificadas de la fracción de elución D. **(b)** Western blot de las proteínas mostradas en el carril 2 del panel **(a)**, inmunodetectadas con anticuerpos monoclonales anti-histidinas y carnero anti-ratón acoplado a peroxidasa y reveladas con 3, 3'-diaminobenzidina. La flecha señala la banda reconocida por los anticuerpos monoclonales.

pero correspondía también con la proteína recombinante. Entonces, para verificar la identidad de los polipéptidos copurificados por cromatografía de afinidad procedimos a separar las proteínas por electroforesis bidimensional (electroforesis 2D).

11. Identificación de la proteína recombinante por electroforesis 2D

Con la finalidad de conocer la identidad de los dos polipéptidos copurificados por la columna de afinidad, decidimos realizar una segunda purificación de los polipéptidos separados a pH 5.9 y 4.5 por electroforesis 2D. Los patrones obtenidos nos mostraron en primera instancia que las dos proteínas eluidas a los pH's de 5.9 y 4.5 estaban altamente purificadas y nos indicaron que sus puntos isoeléctricos estaban en un rango muy cercano al valor teórico esperado para la proteína recombinante (pI de 4.48) (Fig. 35a, b).

Dado que a partir de los valores de pI no pudimos discriminar cuál de ellas correspondía con la proteína esperada, cortamos los dos polipéptidos del gel y se analizaron mediante espectrometría de masas (previa digestión con tripsina, grado espectrometría de masas) en un sistema MALDI-TOF. Con los péptidos identificados en el análisis (Fig. 35c), se ratificó con una cobertura del 51% del polipéptido, que la proteína con peso aparente de 33 kDa correspondía a la proteína recombinante prEhODP1-168, mientras que el polipéptido de 23 kDa presentó similitud con la peptidil-prolil cis-trans isomerasa del tipo FKBP (NCBI, Acc. Num: 16422012), una proteína bacteriana rica en histidinas, lo cual explicaba su unión a la columna de Ni²⁺-NTA-agarosa y por ende que copurificara con la proteína recombinante de interés.

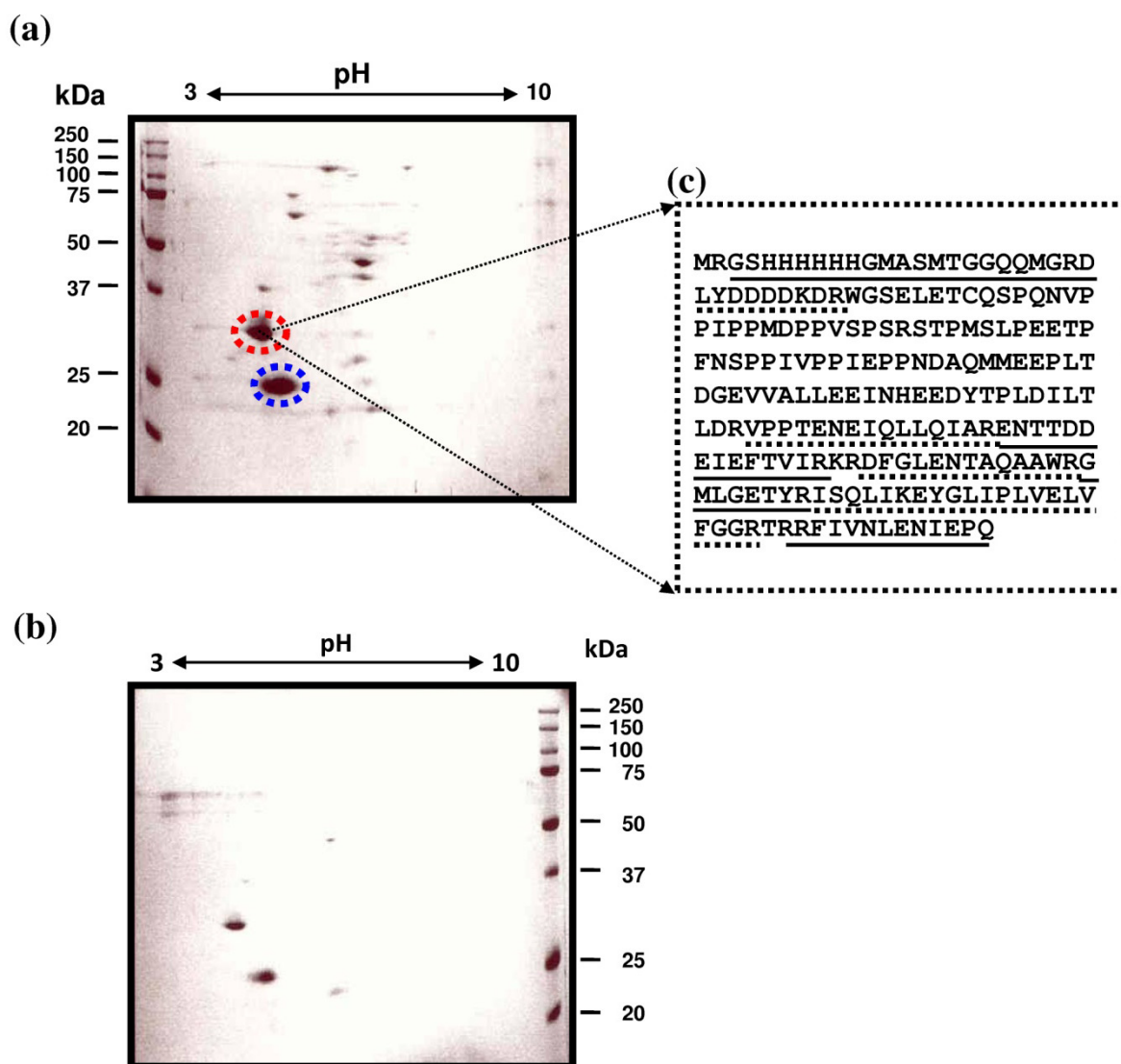


Figura 35. Separación por electroforesis bidimensional (2D) de las proteínas inducidas en *E. coli* BL21(DE3)pLysS y su identificación por MALDI-TOF. Los polipéptidos eluidos a pH 5.9 (buffer D) y 4.5 (buffer E) en condiciones desnaturalizantes a partir de una columna de afinidad en Ni²⁺-NTA-agarosa, fueron desalados y concentrados para su posterior análisis por electroforesis 2D. Los geles 2D se tiñeron con azul de Coomassie. **(a)** 2D de la muestra eluida de la columna de afinidad a pH 5.9. **(b)** 2D de la muestra eluida a pH 4.5 de la columna de afinidad. **(c)** Secuencia de la proteína recombinante eluida a pH 5.9 cuyos péptidos fueron identificados por espectrometría de masas en MALDI-TOF. Los péptidos identificados en el análisis de masas aparecen subrayados en líneas punteadas y continuas para distinguirlos entre sí.

12. Purificación de la proteína recombinante rEhODP1-168 por electroelución

Una vez definida la identidad de la proteína recombinante de nuestro interés, procedimos a separar las proteínas obtenidas de las columnas de afinidad por SDS-PAGE en geles preparativos (Fig. 36a). La banda de interés se cortó y las proteínas se purificaron por electroelución. La proteína purificada fue concentrada por precipitación con desoxicolato de sodio (como acarreador) y ácido tricloroacético, la proteína se analizó nuevamente por SDS-PAGE al 15% y se utilizó para la producción de anticuerpos (ver Materiales y Métodos) (Fig. 36b).

13. Producción de anticuerpos contra la proteína recombinante rEhODP1-168 e inmunodetección de la proteína EhODP1 en extractos totales de trofozoítos y en EhkOs purificados

Con la proteína recombinante rEhODP1-168 purificada se indujo la producción de anticuerpos policlonales contra EhODP1 en ratas Wistar siguiendo el protocolo descrito en Materiales y Métodos. Una vez obtenidos los anticuerpos realizamos ensayos de Western blot con extractos totales frescos de los trofozoítos separados en SDS-PAGE al 10% y transferidos a nitrocelulosa. Los anticuerpos anti-rEhODP1-168 reconocieron en las preparaciones una proteína con una migración aparente de 150 kDa dentro de una región difusa (Fig. 37a, carril 2). El peso molecular teórico esperado para la proteína EhODP1, con base en su secuencia de aminoácidos, es de 135.5 kDa; la diferencia observada en la migración de la proteína podría ser

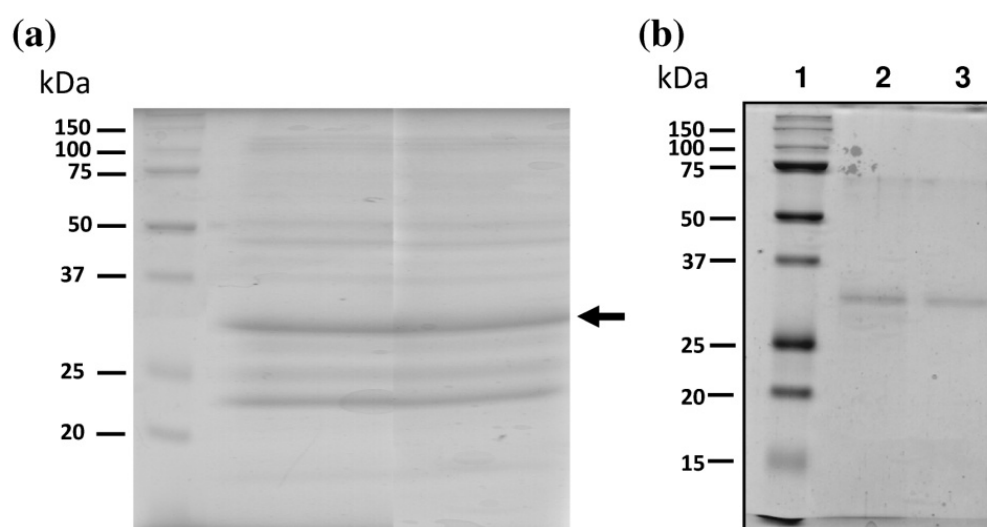


Figura 36. Purificación por electroelución de la proteína recombinante rEhODP1-168. Para incrementar el grado de pureza de la proteína recombinante rEhODP1-168, se realizó una electroforesis en gel preparativo y su posterior electroelución para utilizarla como inmunógeno para la producción de anticuerpos. **(a)** Gel preparativo al 15 % con las muestras eluidas en columnas de afinidad a pH 5.9 (Buffer D). La flecha señala la proteína recombinante. **(b)** SDS-PAGE al 15 % con la proteína recombinante rEhODP1-168 purificada por electroforesis preparativa y electroelución del gel. Carril 1: Marcadores de peso molecular; carriles 2 y 3: Dos fracciones de proteína recombinante purificada. En ambos casos los geles se tiñeron con azul de Coomassie.

ocasionada por la presencia de residuos acídicos en la proteína que pueden provocar retardamientos en la migración de las mismas (Graceffa y col., 1992), así como a modificaciones postraduccionales como glicosilaciones y fosforilaciones. Ningún reconocimiento fue detectado cuando se usó el suero pre-inmune como control negativo (Fig. 37a, carril 5).

La hipótesis de este trabajo se centró en el hecho de que los EhkOs contienen DNA. Por esta razón para investigar la posible presencia de EhODP1 en los EhkOs, llevamos a cabo el marcaje del DNA de los trofozoítos con [^3H]-timidina y purificamos los EhkOs como se describió en Materiales y Métodos. En la figura 37 (panel b) se muestra el perfil de radiactividad incorporada al DNA de las fracciones obtenidas en un gradiente discontinuo de Nycodenz del 30 al 50% de la fracción correspondiente a los EhkOs. Como puede verse la mayor parte de la radiactividad se localizó en la fracción 9. Con esta fracción realizamos un ensayo de Western blot (Fig. 37a) donde observamos que los anticuerpos reconocieron una sola banda de 70 kDa (Fig. 37a, carril 4). Después de realizar varios experimentos con el mismo resultado, asumimos que EhODP1 estaba siendo degradada durante el proceso de purificación de los EhkOs. Para indagar la posibilidad de que la proteína fuese fácilmente degradable durante los procesos de purificación, realizamos ensayos de Western blot con extractos totales de trofozoítos frescos y extractos congelados, incluyendo en ambos casos un cocktail de inhibidores de proteinasas (ver Materiales y Métodos). En los extractos congelados el anticuerpo reconoció una banda de 70 kDa que comigró con la banda detectada en la fracción de los EhkOs y una banda de alrededor de 105 kDa (Fig. 37a, carril 3). En contraste, en los extractos proteicos frescos de trofozoítos

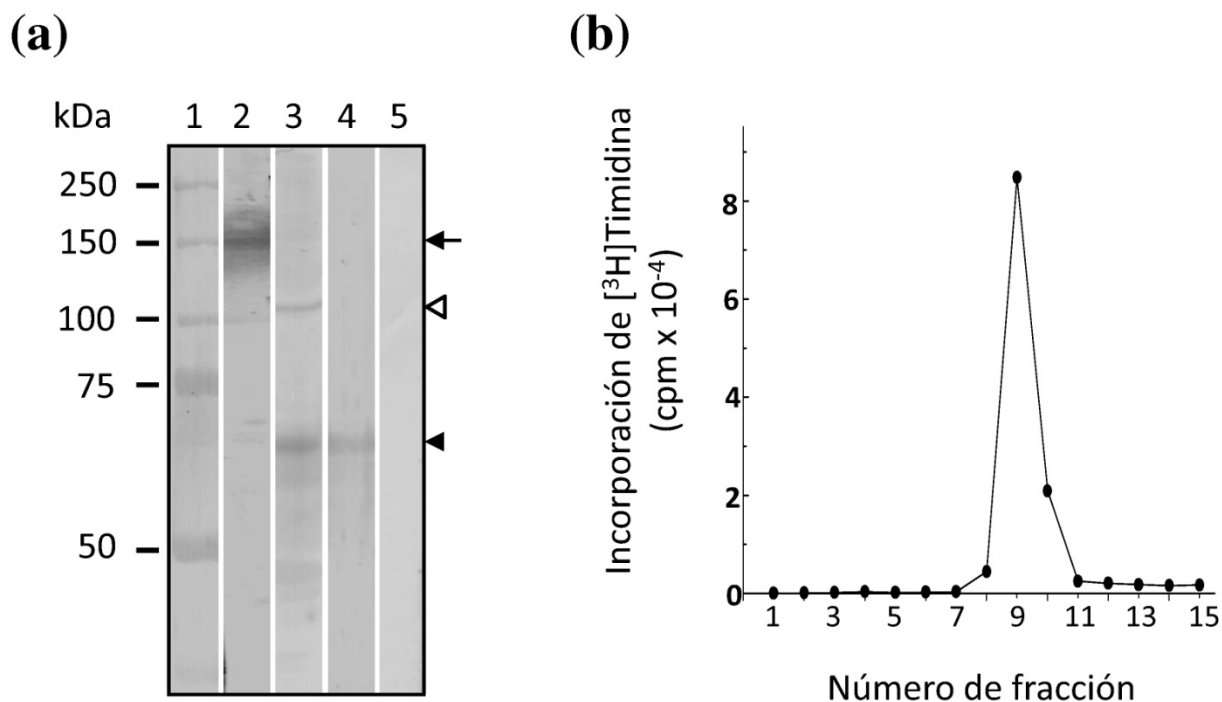


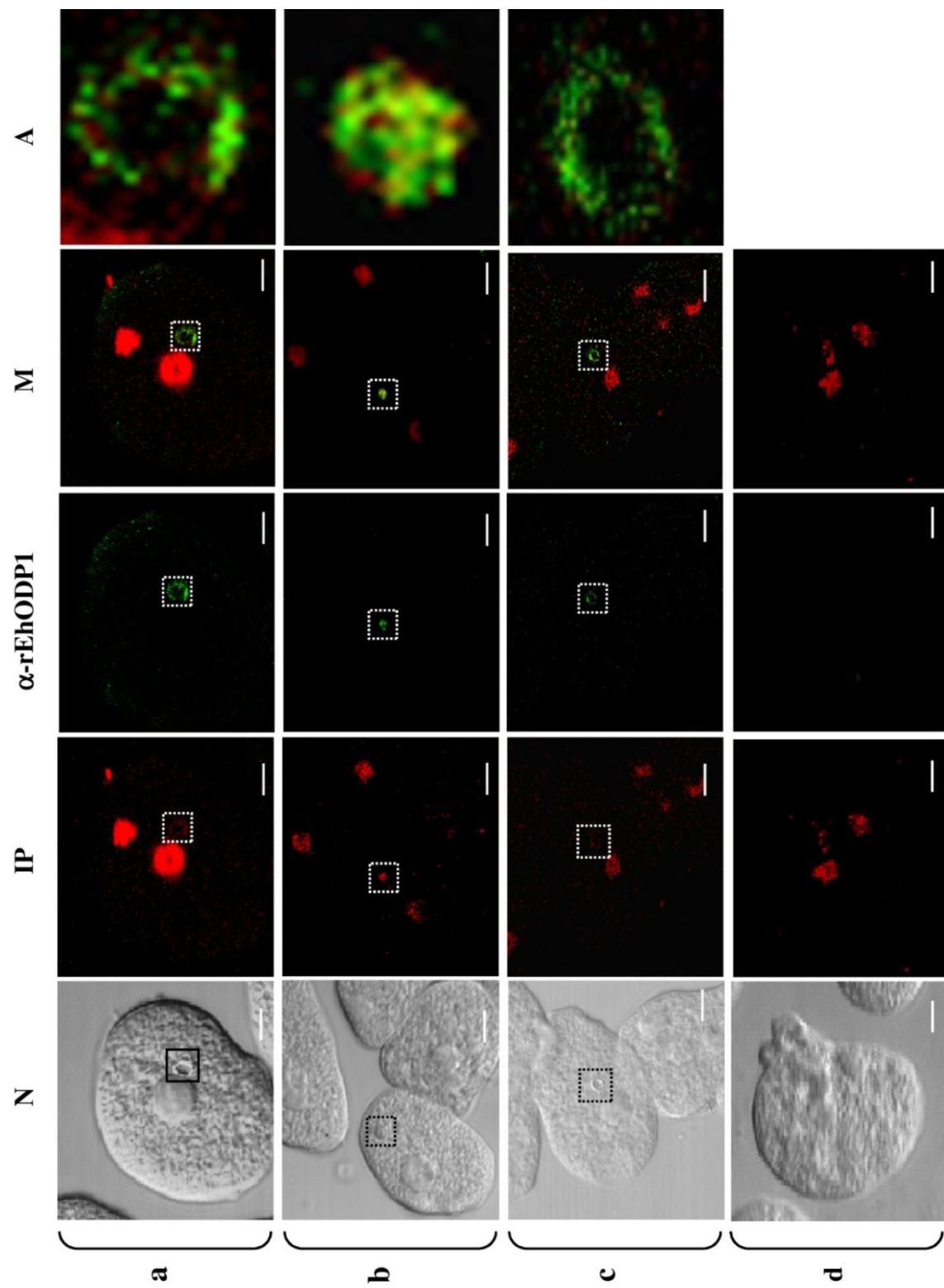
Figura 37. Inmunodetección de la proteína EhODP1 en extractos totales de trofozoítos y en la fracción enriquecida en EhkOs. Con los anticuerpos anti rEhODP1-168, realizamos ensayos de Western blot para detectar a la proteína en extractos totales de trofozoítos, y en extractos de EhkOs purificados. **(a)** Western blot de proteínas separadas por SDS-PAGE al 10% utilizando anticuerpos policlonales de rata anti-rEhODP1-168 (1:1,000), anticuerpos de cabra contra rata acoplados a HRP (1:2,000) y reveladas con 3, 3'-diaminobenzidina. Carril 1: Marcadores de peso molecular preteñidos; carril 2: Extractos frescos de proteínas totales de trofozoítos; carril 3: Extractos congelados de proteínas totales de trofozoítos; carril 4: Extractos de proteínas de la fracción de EhkOs purificados que corresponden a la fracción 9 del panel **(b)**; Carril 5: Extractos frescos de proteínas incubados con el suero preinmune. La flecha señala la proteína de 150 kDa, la cabeza de flecha vacía muestra la banda de 105 kDa mientras que la cabeza de flecha negra la banda de 70 kDa. **(b)** Los EhkOs fueron purificados por centrifugación diferencial a través de un gradiente discontinuo de Nycodenz a partir de trofozoítos crecidos en fase exponencial con $[^3\text{H}]$ -Timidina (ver Materiales y Métodos). Se midió la radiactividad de las fracciones del gradiente y se graficó la radiactividad total incorporada en el DNA de cada fracción. La fracción con mayor radiactividad (fracción No. 9) se utilizó para realizar los ensayos de Western blot descritos en **(a)**.

los anticuerpos reaccionaron con una banda de 150 kDa (Fig. 37a, carril 2). Estos resultados sugieren fuertemente que la proteína EhODP1 es degradada durante el proceso de purificación de los EhkOs.

14. Localización subcelular de la proteína EhODP1 en trofozoítos fijados

Para ratificar la presencia de EhODP1 en la fracción enriquecida de los EhkOs, hicimos reacciones de inmunodetección de la proteína con los anticuerpos anti-rEhODP1-168 directamente en trofozoítos de la clona A de *E. histolytica* fijados y permeabilizados, y los observamos por microscopía confocal de fluorescencia donde el DNA se contrastó con ioduro de propidio (IP). En las muestras detectamos el DNA de los núcleos y de los EhkOs (Fig. 38a-d, IP). La inmunorreacción con los anticuerpos α -rEhODP1 dio señal positiva en los EhkOs pero no se observó en los núcleos (Fig. 38a-c, canal verde correspondiente a la columna α -rEhODP1). Las imágenes sobrepuestas en los canales rojo y verde muestran la colocalización del DNA y EhODP1 en los EhkOs y no así en los núcleos, que sólo muestran fluorescencia roja (Fig. 38a-c, columna M). Como controles negativos omitimos el primer anticuerpo (no mostrado) o utilizamos el suero preinmune (Fig. 38d), en ninguno de estos casos se detectaron señales positivas. En la columna A de la figura 38 se muestran las ampliaciones de los cuadros punteados en la columna M para observar con más detalle la colocalización del IP y del anticuerpo anti-rEhODP1-168. Estos resultados indican que la proteína EhODP1 se localiza únicamente en los EhkOs.

Figura 38. EhODP1 se localiza en los EhkOs de los trofozoítos de *E. histolytica*. Trofozoítos de la clona A se fijaron y permeabilizaron con acetona y se incubaron con anticuerpos policlonales de rata anti-rEhODP1-168 (1:500) y con anticuerpos de cabra anti-IgG de rata marcados con fluoresceína (1:1,000); posteriormente se contratiñeron con ioduro de propidio (IP) y se observaron por fluorescencia y microscopía confocal. **a, b y c.** Inmunolocalización de EhODP1 en EhkOs. **d.** Control negativo realizado con suero preinmune. **N.** Trofozoítos observados por microscopía de Nomarsky. **IP.** Células teñidas con ioduro de propidio (canal rojo). **α -rEhODP1.** EhODP1 inmunolocalizada en EhkOs con anticuerpos anti-rEhODP-168 (canal verde). **M.** Sobreposición de las señales observadas en los canales rojo y verde. **A.** Amplificación de las señales sobrepuestas enmarcadas en M. La escala de la barra corresponde a 8 μ m.



15. Estandarización de la técnica de PCR *in situ*

Una vez que establecimos que la proteína EhODP1 estaba presente en los EhkOs, a partir de fracciones enriquecidas en EhkOs, así como por la detección por inmunofluorescencia y microscopía confocal de EhODP1 directamente en trofozoítos fijados, la pregunta que surgió era si también el gen se encontraría en los EhkOs o sólo en los núcleos o en ambos organelos.

Con el objeto de determinar la localización subcelular del gen *Ehodp1*, procedimos primeramente a implementar la técnica de PCR *in situ* mediante la amplificación de un control positivo correspondiente a un fragmento de 222 pb del gen de actina, probando varias condiciones para estandarizar eficazmente la amplificación de este fragmento en los trofozoítos, las cuales incluían diferentes concentraciones de proteinasa K, tiempos de incubación con esta enzima, número de lavados de los reactivos, entre otras (Tabla 6). Como controles negativos realizamos reacciones sin *Taq* DNA polimerasa o sin oligonucleótidos. Las reacciones sin *Taq* DNA polimerasa tuvieron como objetivo determinar si las condiciones de lavado de las muestras eliminaban completamente el nucleótido marcado con la carbocianina. Por otro lado, las reacciones sin oligonucleótidos nos indicarían, en caso de amplificación, la presencia de “nicks” en el DNA que podrían haber sido usados por la *Taq* DNA polimerasa para incorporar el nucleótido marcado. Las condiciones finales para la PCR *in situ* del gen de actina se indican en Materiales y Métodos.

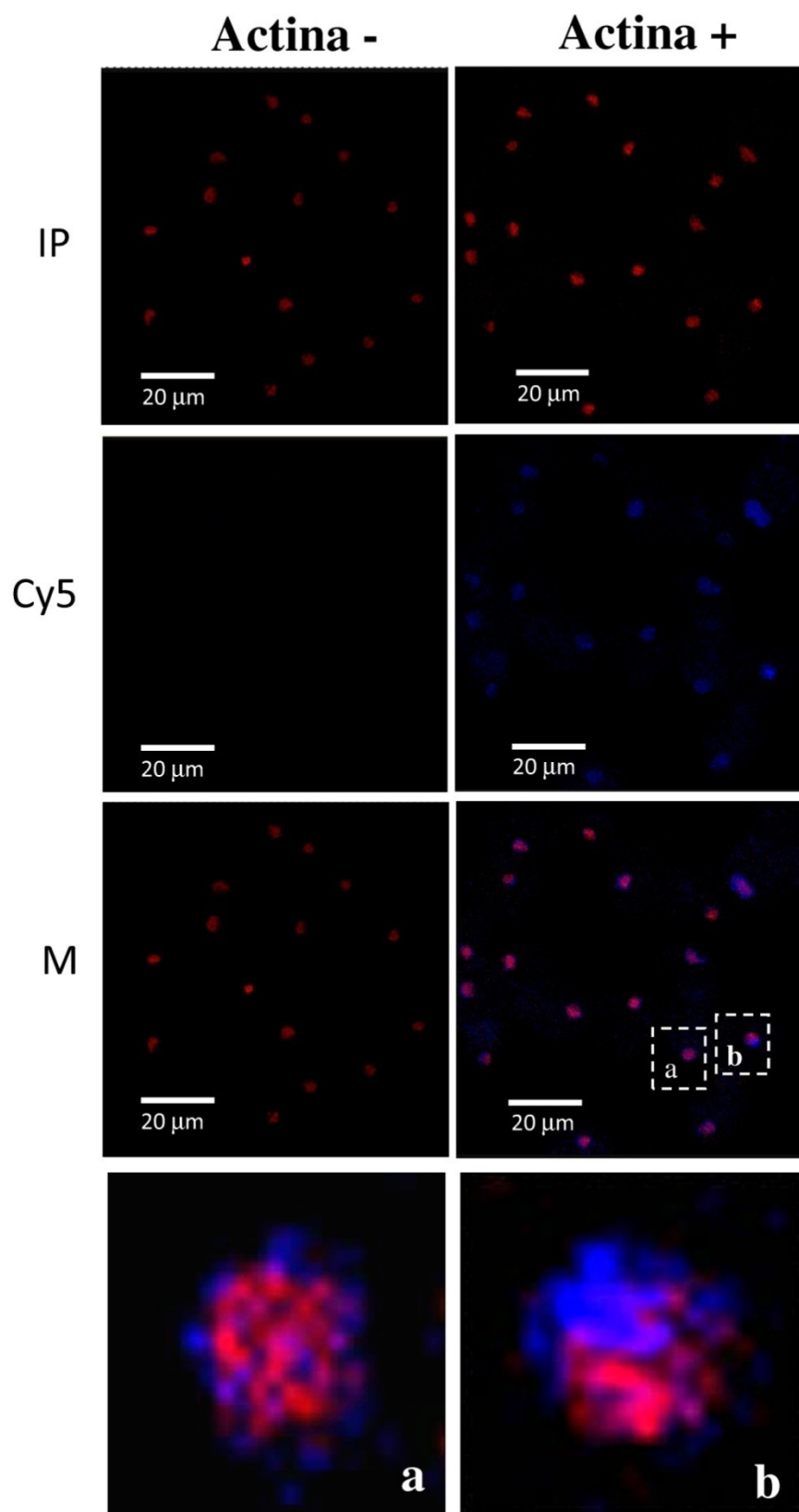
En la figura 39 se muestra el producto de amplificación del gen de actina (fila Cy5, columna Actina +). En cambio, en el control negativo no se observan señal

Tabla 6. Condiciones probadas para la estandarización de la técnica de PCR *in situ*.

Variable estudiada	Condiciones ensayadas
Inclubación con Proteinasa K	
Concentración	1, 5, 10 mg/mL
Temperatura	40°C, 44°C
Tiempo	15 min, 30 min
Lavados del dCTP-Cy5	
Soluciones	PBS, SSC 2X
Temperatura	T.A., 40°C
RNasa libre de DNasas	
Tempaeratura	T.A., 37°C
Tiempo	20 min, 30 min
Condiciones de PCR	
Número de ciclos	20 ciclos, 30 ciclos
Tiempo de extensión	0 min, 7 min

Las condiciones en negritas fueron las determinadas como óptimas.

Figura 39. Estandarización de la técnica de PCR *in situ* para el gen de actina. Se probaron diferentes condiciones para la amplificación directa en los trofozoítos de *E. histolytica* utilizando un fragmento del gen de actina como se indica en Materiales y Métodos. Las células se observaron por fluorescencia y microscopía confocal. **Actina -**: Control negativo de PCR *in situ* realizado sin *Taq* DNA polimerasa. **Actina +**: Amplificación *in situ* de un fragmento del gen de actina de 222 pb. **IP**: Trofozoítos teñidos con ioduro de propidio (canal rojo). **Cy5**: PCR *in situ* del gen de actina marcado con Cy5-dCTP (canal azul). **M**: Sobreposición de las señales fluorescentes de los canales rojo y azul. **a y b**: Ampliación de las señales fluorescentes enmarcadas mostradas en M actina +.

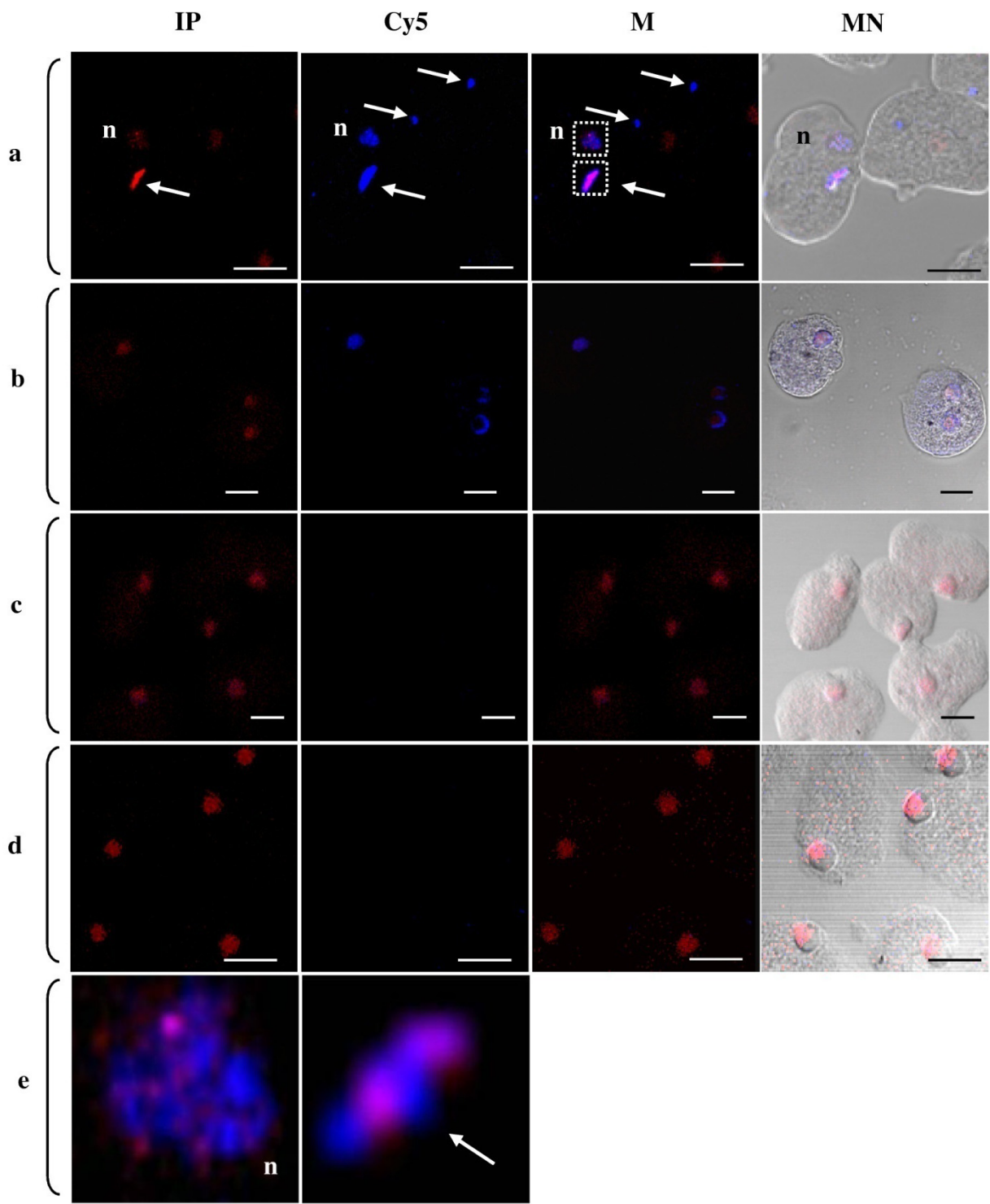


positivas fluorescentes (fila Cy5, columna Actina -). Adicionalmente se puede observar la colocalización de las señales del DNA teñido con ioduro de propidio con las señales del amplicón producidas por la incorporación del dCMP-Cy5 en la fila M. Para observar mayores detalles se hicieron dos ampliaciones digitales de las imágenes enmarcada como a y b (Fig. 39).

16. Localización subcelular del gen *Ehodp1* en trofozoítos de *E. histolytica*

Conforme se fueron estableciendo las condiciones de amplificación por PCR *in situ* para el gen de actina en los trofozoítos de *E. histolytica*, procedimos a realizar las PCRs para el gen *Ehodp1* con los cambios específicos para el mismo, indicados en Materiales y Métodos. Para ello, usamos los oligonucleótidos a y b (materiales y métodos) para amplificar el fragmento de 524 pb específico de la región 5' del gen *Ehodp1* (Figs. 25 y 32) en trofozoítos fijados y permeabilizados de la clona A y finalmente, los productos se observaron por microscopía confocal de fluorescencia. Las células fueron teñidas con IP para detectar los organelos conteniendo DNA, previa digestión con RNasas (Fig. 40a-d, canal rojo IP). Como resultado de las reacciones de PCR *in situ*, nosotros observamos el producto de la amplificación del gen *Ehodp1* tanto en núcleos (Fig. 40a, b, canal azul Cy5) como en EhkOs (Fig. 40a, canal azul Cy5). La superposición de las señales fluorescentes muestra la localización del DNA y de los amplificados de *Ehodp1* en ambos organelos. Como controles negativos para las PCRs *in situ* realizamos dos diferentes reacciones, una sin *Taq* DNA polimerasa y otra sin oligonucleótidos, en ninguno de los controles se

Figura 40. Localización del gen *Ehodp1* en núcleos y en EhkOs. Trofozoítos de la clona A fijados con paraformaldehído se usaron para localizar el gen *Ehodp1* mediante reacciones de PCR *in situ* con los oligonucleótidos a y b descritos previamente y utilizando dCTP marcado con Cy5 (ver Materiales y Métodos). Posteriormente, las preparaciones se trataron con RNasa, se contratiñeron con ioduro de propidio y se observaron por microscopía confocal. **a, b.** Amplificación del gen *Ehodp1* por PCR *in situ*. **c.** Control negativo de la PCR *in situ* realizado sin *Taq* DNA polimerasa. **d.** Control negativo sin los oligonucleótidos específicos para *Ehodp1*. **e.** Amplificación de las imágenes de los organelos enmarcados mostrados en M. **IP.** Trofozoítos teñidos con ioduro de propidio (canal rojo). **Cy5.** Amplificación de un fragmento del gen *Ehodp1* marcado con Cy5-dCMP (canal azul). **M.** Sobreposición de las señales fluorescentes de los canales rojo y azul. **MN.** Sobreposición de las señales fluorescentes con la imagen de microscopía de Nomarsky. **n.** núcleo. Las flechas señalan los EhkOs. La escala de la barra corresponde a 8 μ m.



observaron señales positivas (Fig. 40c, d, canal azul Cy5). La integridad de los trofozoítos se muestra por microscopía de Nomarsky. El hecho de encontrar el amplificado del gen *Ehodp1* por PCR *in situ* tanto en el núcleo como en el EhkO, demuestra que el gen está presente en ambos organelos.

17. Análisis filogenético de probables DNA polimerasas de *E. histolytica* (EhODPs)

Para establecer las relaciones filogenéticas entre EhODP1, EhODP2, EhODP3, EhODP4 con sus ortólogos de otras especies, construimos un árbol filogenético usando el algoritmo “Neighbor Joining”. En el árbol se observa que las EhODPs están más relacionadas con sus ortólogos de *T. vaginalis* y *C. briggsae*. Esta relación está soportada con un “bootstrap” del 100% (Fig. 41). Las secuencias restantes se agruparon en tres ramas, una de ellas tiene DNA polimerasas mitocondriales únicamente de hongos (Fig. 41c), otra rama incluye DNA polimerasas mitocondriales de hongos y de plantas (Fig. 41a) y la tercera rama tiene DNA polimerasas de bacteriófagos (Fig. 41 b).

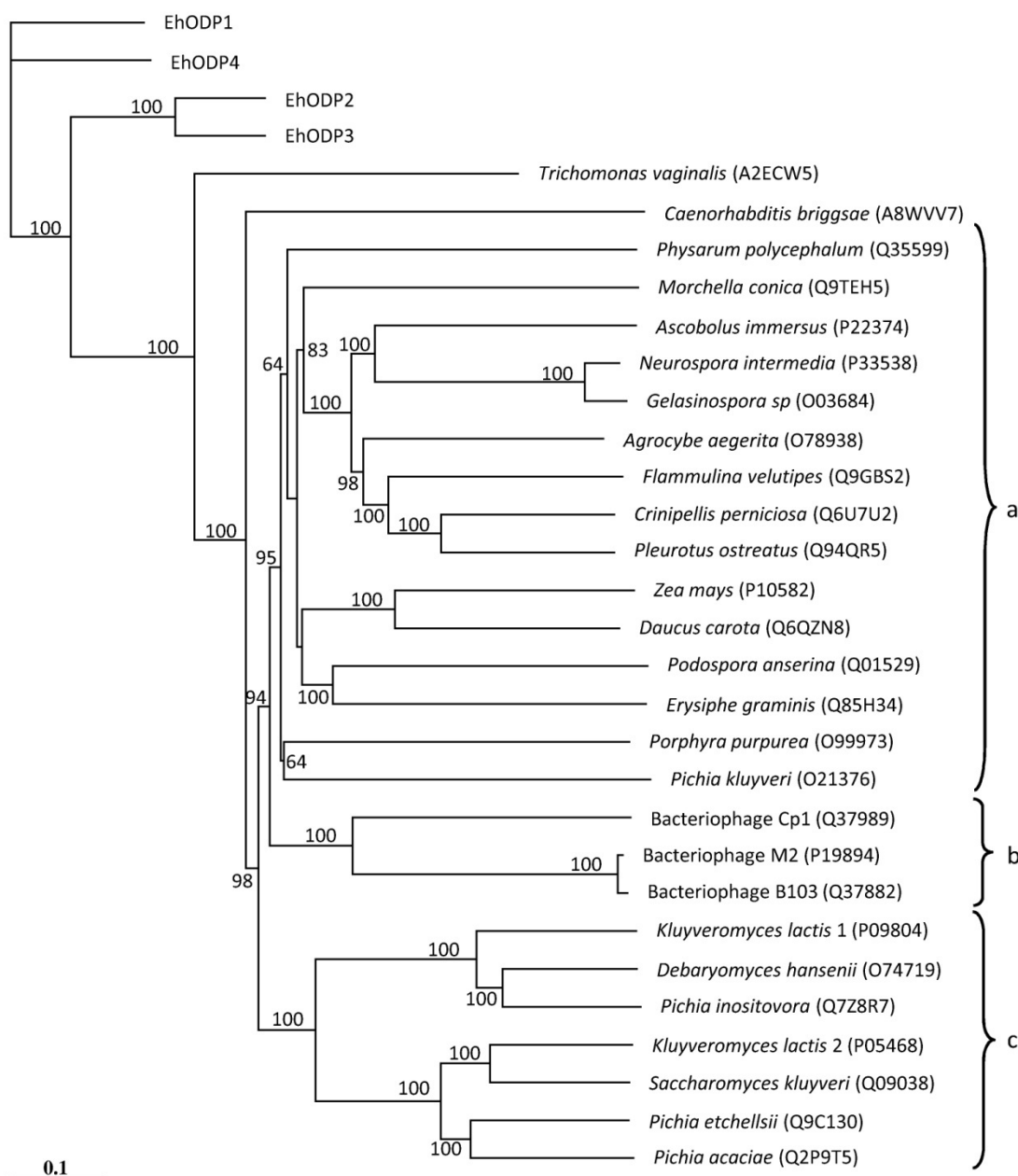


Figura 41. Análisis filogenético de las DNA polimerasas organelares de *E. histolytica*. Las secuencias de aminoácidos de los polipéptidos EhODP1, EhODP2, EhODP3 y EhODP4 se alinearon con las correspondientes secuencias de aminoácidos de DNA polimerasas organelares de diferentes organismos. Los números de acceso se indican en la figura. Sólo se presentan valores de bootstrap mayores al 50%. La escala señala el número de sustituciones por sitio. **a**, DNA polimerasas de mitocondriales de hongos y plantas; **b**, DNA polimerasas de bacteriófagos; **c**, DNA polimerasas codificadas en plásmidos mitocondriales de hongos.

VI. DISCUSIÓN

E. histolytica es considerado en la actualidad como un eucarionte que tuvo una pérdida secundaria de mitocondrias (Clark y Roger, 1995; Bakatselou y col., 2003) debido a que se han encontrado evidencias de la presencia de genes que codifican proteínas relacionadas con las mitocondrias como el gen *hsp70* (Bakatselou y col., 2000; Arisue y col., 2002), el gen *hsp60* (Mai y col., 1999), el gen *cpn10* (van der Giezen y col., 2005). Además se ha detectado la actividad de la enzima nicotinamida nucleótido transhidrogenasa (Harlow y col., 1976), el gen que codifica para la piridina nucleótido transhidrogenasa (Clark y Roger, 1995) y la coenzima Q o ubiquinona (Ellis y col., 1994). No obstante, los genes que codifican para enzimas del ciclo de los ácidos tricarboxílicos y de la cadena respiratoria no han sido detectados en el genoma de *E. histolytica* (Loftus y col., 2005). También se ha localizado en estructuras citoplásmicas de los trofozoítos a la proteína piruvato:ferredoxina óxidoreductasa (Rodríguez y col., 1998); esta enzima está presente en los hidrogenosomas de *T. vaginalis*, los cuales tienen un origen evolutivo en común con las mitocondrias (Williams y col. 1987; Bui y col., 1996; Müller, 1997; Embley y col. 2003).

Además de la presencia de proteínas relacionadas con mitocondrias, los trofozoítos tienen un organelo citoplásmico llamado mitosoma, el cual es considerado un remanente mitocondrial que carece de DNA (León-Avila y Tovar, 2004). Por otro lado, *E. histolytica* posee otros dos organelos citoplásmicos, ambos contienen DNA y están rodeados por una doble membrana: Criptón, que posee también características

mitocondriales como la presencia de la proteína Hsp60, y el organelo EhkO, en el que se ha detectado a la enzima PFO y que tiene características tanto mitocondriales como nucleares (Mai y col., 1999; Ghosh y col., 2000, Orozco y col., 1997; Rodríguez y col., 1998; Luna-Arias y col., 1999; Solis y col., 2002).

El EhkO fue descubierto en el grupo de trabajo de nuestro laboratorio. Para proseguir con el estudio de estos organelos y dado que contienen DNA, en el presente trabajo nos propusimos investigar si en los trofozoítos existe alguna DNA polimerasa que pudiera estar relacionada con DNA polimerasas organelares y que ésta estuviera ligada al organelo EhkO.

La DNA polimerasa organelar clásica encargada de la replicación del DNA mitocondrial en animales y hongos es la DNA polimerasa γ , la cual pertenece a la familia A (Sherbakova y Kunkel, 2006). Así, como primera estrategia, nosotros realizamos una búsqueda de genes con similaridad a DNA polimerasas de tipo γ en *E. histolytica*. Esta búsqueda se llevó a cabo en los bancos de datos del “J. Craig Venter Institute” (antes conocido como “Tiger” o “Institute for Genomic Research”) y “The Sanger Institute” (Sanger), utilizando como sondas secuencias de DNA polimerasas de tipo γ de diferentes organismos. Con esta estrategia, no encontramos ninguna secuencia relacionada que codificara para este tipo de DNA polimerasas, lo cual fue ratificado posteriormente cuando se publicó el genoma de *E. histolytica* (Loftus y col., 2005). No obstante, dada la presencia de DNA en el organelo EhkO, debería de existir una DNA polimerasa encargada de su replicación y de ser así, probablemente esta proteína sería específica del organelo, lo cual sería una herramienta muy útil para el estudio del mismo, por lo cual se realizó la búsqueda de

genes con similitud a DNA polimerasas empleando como sonda secuencias de DNA polimerasas de tipo mitocondrial, aunque menos comunes, pertenecientes a la familia B.

A partir de la búsqueda realizada en este trabajo, utilizando como sonda la secuencia de la DNA polimerasa de *Gelasinospora* sp codificada por el plásmido mitocondrial lineal Gel-kal (Yuewang y col., 1996) encontramos la existencia de cuatro genes en el genoma de *E. histolytica*, los cuales codifican para una familia de DNA polimerasas de la familia B, a los cuales denominamos *Ehodp1*, *Ehodp2*, *Ehodp3* y *Ehodp4*. Al analizar las secuencias polipeptídicas codificadas por esos genes encontramos los mayores valores de similaridad con DNA polimerasas codificadas en plásmidos mitocondriales de hongos y con una DNA polimerasa de *T. vaginalis* (Tabla 4), lo cual nos indicaba que existía una estrecha relación entre ellas, relación que fue ratificada posteriormente por medio de un análisis filogenético (Fig. 41).

Al analizar las secuencias de aminoácidos de las cuatro EhODPs, encontramos que todos los polipéptidos tienen el dominio DNA_pol_B_2 (PF03175). En esta región están incluidos el dominio de actividad 3'-5' exonucleasa II y las cajas conservadas I, II y III que son características de las DNA polimerasas pertenecientes a la familia B (Figs. 23, 28 y 29). Adicionalmente, identificamos en las secuencias polipeptídicas dos cajas que denominamos cajas A y B, las cuales no estaban descritas con anterioridad y que están también presentes en las secuencias de DNA polimerasas de *T. vaginalis* y en aquéllas codificadas en plásmidos mitocondriales de hongos (Figs. 22, 24, 28 y 29).

Los valores de similitud entre las DNA polimerasas codificadas por los genes *Ehodp1*, *Ehodp2*, *Ehodp3* y *Ehodp4* de *E. histolytica* con aquéllas codificadas en plásmidos mitocondriales, la conservación de los dominios DNA_pol_B_2 (PF03175) y las cajas I, II y III, clasifica a las EhODPs como DNA polimerasas de la familia B. Aunado a esto, la presencia de las cajas A y B nos sugirió que las EhODPs podrían tener una ubicación organelar a semejanza de las polimerasas codificadas en los plásmidos mitocondriales.

Conforme fuimos obteniendo las secuencias de los genes codificadores de las polimerasas, debido a que éstas fueron liberadas en el banco en diferentes tiempos, procedíamos a investigar si estos genes se estaban expresando en los trofozoítos. Observamos que los cuatro genes eran activos y que tenían diferentes niveles de expresión. Los genes que se expresaron con mayor abundancia fueron los genes *Ehodp1* y *Ehodp2*, mostrando niveles de expresión entre ellos muy similares, seguidos del gen *Ehodp4* con un nivel de expresión de un tercio en relación a los primeros y el gen *Ehodp3*, el cual se expresó 27 veces menos que los genes *Ehodp1* y *Ehodp2* (Figs. 30 y 31). Es importante señalar que estos niveles de expresión se determinaron en cultivos asincrónicos y por lo tanto, no sabemos si estos niveles tendrán variaciones a través del ciclo celular.

La presencia de varios genes que codifican para DNA polimerasas organelares de la familia B ha sido también reportada en el genoma de otros organismos. En el genoma de *Agrocibe aegerita* existen dos secuencias pol B, el gen *Aa-pol B* que es potencialmente funcional y un gen interrumpido o truncado denominado *Aa-pol B P1*, mientras que en el genoma de *A. chaxingu* hay dos

secuencias pol B que contienen marcos de lectura abiertos interrumpidos, los cuales podrían codificar enzimas no funcionales (Mouhamadou y col., 2004). A este respecto, los marcos de lectura abiertos para las cuatro DNA polimerasas que reportamos en este trabajo no están interrumpidos y además sus secuencias conservan el dominio catalítico, lo cual sugiere que las DNA polimerasas de *E. histolytica* pueden ser funcionales.

Durante el transcurso del trabajo, una vez que habíamos encontrado el primer gen candidato para una DNA polimerasa y que habíamos verificado que se expresaba en los trofozoítos, expresamos la proteína recombinante rEhODP1-168, la cual corresponde con una región específica de la proteína EhODP1. Al expresar a la proteína recombinante que contiene esta región de EhODP1, encontramos que se inducían dos polipéptidos, uno de 23 y otro de 33 kDa, mientras que el peso molecular teórico esperado para la proteína de fusión era de 23.7 kDa (Figs. 33 y 34). El análisis de Western blot con anti-histidinas reconoció sólo a la banda de 33 kDa (Fig. 34b). Posteriormente, por análisis bidimensional y espectrometría de masas se demostró que la proteína recombinante correspondía a la banda con un peso molecular aparente de 33 kDa (Fig. 35). El peso molecular observado por rEhODP1-168 se puede explicar por la presencia de residuos acídicos en su secuencia, los cuales pueden afectar la migración electroforética, como se ha descrito para las proteínas caldesmón, tropomiosina y calsecuestrina (Graceffa y col., 1992).

Después de que ratificamos la identidad de la proteína, obtuvimos anticuerpos y procedimos a buscarla en una fracción purificada de EhkOs y por medio de

ensayos de Western blot con los anticuerpos generados anti-rEhODP1-168 inmunolocalizamos a la proteína EhODP1 en los EhkOs (Fig. 37). Como se mencionó en la sección de resultados, los anticuerpos identificaron una banda de 150 kDa rodeada por una región difusa pero esto solamente se observó en los extractos totales frescos. Cuando se utilizaron extractos totales congelados se inmunodetectaron dos bandas, una de 105 y otra de 70 kDa, mientras que cuando se utilizaron fracciones enriquecidas en EhkOs sólo se identificó la banda de 70 kDa. El peso molecular teórico para la proteína intacta es de 135.5 kDa, pero nosotros observamos una de 150 kDa. Esta diferencia en el peso molecular, al igual que el péptido recombinante, puede deberse a la presencia de residuos acídicos en la proteína (Graceffa y col., 1992), aunque no podemos descartar la presencia de modificaciones postraduccionales. Por otro lado, las bandas de 105 y de 70 kDa podrían ser productos de degradación de la proteína completa. A este respecto, Hübscher y col. (1981) reportaron que las DNA polimerasas replicativas procarióticas y eucarióticas son extremadamente sensibles al corte proteolítico, aún en la presencia de inhibidores de proteinasas. Estos autores detectaron actividad de DNA polimerasas en bandas de 110, 74 y 35 kDa en extractos de timo de ternera, fibroblastos humanos y células HeLa, mientras que en extractos de *Ustilado maydis*, *D. melanogaster* y *E. coli*, se detectó la mayor actividad en las bandas de 110 y 74 kDa. Estos autores sugirieron que el hecho de una remarcada similaridad en los tamaños y en el número de polipéptidos generados por el almacenamiento de los extractos, puede resultar de la conservación evolutiva de las secuencias de aminoácidos o de las conformaciones de los polipéptidos que son particularmente

susceptibles al corte proteolítico, generando fragmentos activos de tamaños específicos. Por otro lado, Spanos y col. (1981) encontraron en una preparación fresca homogénea de la DNA polimerasa I de *E. coli*, una banda de 109 kDa que correspondía a la DNA polimerasa activa, pero notaron que cuando la preparación se conservaba a -20°C, también aparecían otras dos bandas, una de 76 y otra de 72 kDa. Adicionalmente, estos autores observaron la conversión total del polipéptido de 109 kDa en las bandas de 76 y 72 kDa en un almacenamiento prolongado a -20°C. Dado lo anterior, es posible que las bandas de 150 y 105 kDa que fueron detectadas respectivamente en los extractos frescos y congelados de trofozoítos no hayan sido detectadas en la fracción enriquecida de EhkOs debido a un incremento en su degradación proteolítica, como resultado de las condiciones de preparación y almacenamiento durante la purificación de los EhkOs.

Una vez que habíamos detectado a EhODP1 en la fracción purificada de EhkOs, debido a la posibilidad de que la fracción enriquecida de EhkOs estuviese contaminada con núcleos, realizamos una inmunodetección *in situ* para verificar si la proteína estaba presente en los EhkOs y descartar así que la señal detectada correspondiera a proteínas nucleares. Los resultados de inmunofluorescencia y microscopía confocal directamente en los trofozoítos fijados ratificaron que EhODP1 está presente en los EhkOs (Fig. 38). Contrariamente, los anticuerpos no dieron señal positiva en los núcleos, por lo cual EhODP1 podría ser considerada como un marcador del organelo EhkO, aunque hay que considerar que, debido a que EhODP1 y EhODP4 tienen alta similitud, no podemos descartar la posibilidad de que ocurra una reacción cruzada y que también estemos detectando a EhODP4. El hecho de

que EhODP1 y/o EhODP4 estén presentes en los EhkOs, aunado a que estas proteínas conservan los dominios catalíticos de las DNA polimerasas, es indicativo de que podrían estar involucradas en la replicación del DNA de este organelo.

Las cuatro EhODPs reportadas en este trabajo están relacionadas con DNA polimerasas de la familia B codificadas principalmente en plásmidos mitocondriales. En general, la función de estos plásmidos es desconocida; sin embargo, se ha visto que en algunos hongos los plásmidos están involucrados en rearrreglos del DNA genómico mitocondrial y como consecuencia de su integración en el mismo se han observado diferentes efectos fenotípicos en los organismos que los portan. En algunos hongos se han visto efectos en la senescencia de especies de *Neurospora* (Griffiths y col., 1992). Los plásmidos Kalilo y Maranh se insertan en el DNA mitocondrial (mitDNA) en *N. intermedia*, lo que conlleva a una fisiología mitocondrial anormal y a la muerte del cultivo (Bertrand y col., 1986). Por otro lado, en *P. anserina*, un hongo normalmente de rápida senescencia, existe una cepa de vida larga que contiene el plásmido pAL2.1. Hermanns y col. (1994) realizaron cruces de la cepa AL-2 con la cepa silvestre y encontraron que la progenie que no presentó el plásmido murió rápidamente, por lo cual sugirieron que el plásmido era el responsable del incremento en el lapso de vida de *P. anserina*. En un trabajo posterior, estos autores lograron inducir longevidad en una cepa silvestre de *P. anserina* por la transferencia del plásmido lineal pAL2.1 de la mutante de vida larga AL2, en la cepa silvestre (Hermanns y Osiewacz, 1996). Por otro lado, en cuanto a las polimerasas codificadas en este tipo de plásmidos, en estudios realizados con levaduras de *Kluyveromyces lactis* se encontró que los genes de la DNA polimerasa

y de la RNA polimerasa codificados en el plásmido mitocondrial pGKL2, son esenciales para la integridad y mantenimiento del plásmido (Schaffrath y col., 1995). Actualmente no se conoce si los genes de las DNA polimerasas organelares en *E. histolytica* (*Ehodps*) están presentes en plásmidos o en otro tipo de elementos móviles. Algunos genes que codifican para DNA polimerasas de la familia B han sido encontrados también en elementos móviles de algunos genomas eucariontes. Pritham y col. (2007) describieron una clase de transposones o elemento móviles llamados Mavericks, los cuales contienen entre otros genes, uno que codifica para una DNA polimerasa de la familia B que está relacionado con las DNA polimerasas encargadas de replicar tanto cromosomas lineales de adenovirus como el del bacteriófago PRD1 y con DNA polimerasas codificadas en plásmidos mitocondriales de hongos y de plantas.

En el genoma de *T. vaginales* se ha reportado una alta frecuencia de elementos Mavericks. La DNA polimerasa codificada en el elemento *Mav_Tv1.1* tiene una similitud del 36% y una identidad del 29% con EhODP1. El genoma de *E. histolytica* es abundante en retrotransposones LTR (non-long Terminal repeats) de las clases LINES y SINES (Bakre y col, 2005), pero no se han reportado elementos tipo Mavericks; sin embargo, dada la presencia de estos elementos en una amplia gama de organismos eucariontes y con base en la similitud del ORF codificado en *Ehodp1* y de genes relacionados con la DNA polimerasa codificada en *Mav_Tv1.1*, existe la posibilidad de que en *E. histolytica* también estén o hayan estado presentes este tipo de elementos móviles.

Al investigar la localización organelar del gen *Ehodp1* empleando la técnica de PCR *in situ*, lo encontramos codificado tanto en los núcleos como en los EhkOs (Fig. 40). Actualmente, no sabemos si existe en la amiba una transferencia de genes entre estos organelos. A este respecto es importante señalar que el EhkO es un organelo singular que parece estar estrechamente relacionado con el núcleo, ya que en éste se han encontrado también los factores de transcripción nuclear EhTPB (Luna-Arias y col., 1999), Ehp53 (Mendoza y col., 2003), EhC/EBP (Marchat y col., 2003) y además, el RNA ribosomal 16S (Báez-Camargo y col., 1997). La relación entre EhkOs y núcleos ha sido sugerida por Solis y col. (2002) quienes encontraron vesículas con DNA en el núcleo y el citoplasma de los trofozoítos de *E. histolytica*, similares a las vesículas presentes en los EhkOs. Adicionalmente, el hecho reportado en el presente trabajo sobre la presencia del gen *Ehodp1* en el DNA de ambos organelos, apoya de manera importante la propuesta de una posible interacción entre los EhkOs y los núcleos. Futuros trabajos encaminados a estudiar la proteómica y genómica de los EhkOs, ayudarán a conocer más acerca del origen y la función de estos organelos. En el laboratorio hemos observado que la presencia de los EhkOs es más abundante en cultivos en fase tardía de crecimiento (Orozco E., comunicación personal), lo cual podría estar relacionado con la longevidad de los trofozoítos; por otra parte, se sabe que la patogenicidad de *E. histolytica* disminuye en los cultivos mantenidos en el laboratorio. En los cultivos amibianos realizados en nuestro laboratorio hemos observado una disminución de los organelos EhkOs aunque no sabemos si esta disminución en el número de los EhkOs está relacionada o no con la virulencia de este parásito.

Finalmente, la presencia de los cuatro genes de DNA polimerasas de tipo organelar en *E. histolytica* y la presencia de al menos una de las proteínas en los EhkOs es un paso más en el conocimiento acerca de su replicación. El presente trabajo es el primer reporte de este tipo de DNA polimerasas en *E. histolytica* y de los resultados obtenidos se desprende la importancia de los estudios sobre la organización y replicación del DNA de EhkO y su interacción con el núcleo, a partir de los cuales se podrá obtener información relevante acerca de la biología y la evolución de este patógeno humano.

VII. CONCLUSIONES

- 1) En *E. histolytica* existe una familia de genes (*Ehodp1*, *Ehodp2*, *Ehodp3* y *Ehodp4*) que codifican para DNA polimerasas de la familia B de tipo organelar.
- 2) Los cuatro genes son transcripcionalmente activos y presentaron diferencias en sus niveles de expresión.
- 3) Las secuencias de las proteínas EhODP1, EhODP2, EhODP3 y EhODP4 tienen similitud con DNA polimerasas codificadas en plásmidos mitocondriales de hongos y con DNA polimerasas codificadas en Mavericks de *T. vaginalis*.
- 4) Las secuencias de las proteínas EhODP1, EhODP2, EhODP3 y EhODP4 conservan los dominios y residuos necesarios para la actividad enzimática.
- 5) La proteína EhODP1 y/o EhODP4 están presentes únicamente en los EhkOs.
- 6) Existen dos copias del gen *Ehodp1*, una localizada en el DNA nuclear y otra en el organelo EhkO.

VIII. BIBLIOGRAFÍA

1. Aladjem MI, Falaschi A., Kowalski D. (2006). Eukaryotic DNA replication Origins. In DNA replication and Human Disease, Edited by Melvin L. DePamphilis, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, USA. pp 31-61.
2. Albà M. (2001). Replicative DNA polymerases. *Genome Biology*, **2**: 3002.1-3002.4.
3. Albach R.A., Booden T., Boonlayangoor P. and Downing S. (1977). *Entamoeba histolytica*: Autoradiographic analysis of nuclear sites of RNA synthesis. *Exp.Parasitol.* **42**:248-259.
4. Arisue N., Sanchez L.B., Weiss L.M., Müller M, Hashimoto T. (2002). Mitochondrial-type hsp70 genes of the amitochondriate protist, *Giardia intestinalis*, *Entamoeba histolytica* and two microsporidians. *Parasitol Int.* **51**:9-16.
5. Ausubel F.M., Brent R., Kingston R.E., Moore D.D., Seidman J.G., Smith J.A., Struhl, K. (Eds.) (1994). Current Protocols in Molecular Biology. Current Protocol and John Wiley & Sons. USA.

6. Báez-Camargo M., Sánchez T., Solís F., Rodríguez M.A., Contreras G., Chávez P., Riverón A.M., Orozco E. (1997) Cytoplasmic DNA in *Entamoeba histolytica*: its biological significance. *Arch Med Res* **28**:5-9.
7. Bakatselou C., Kidgell C., Clark C.G. (2000). A mitochondrial-type hsp70 gene of *Entamoeba histolytica*. *Mol Biochem Parasitol* **110**:177-182.
8. Bakatselou C., Beste D., Kadri A.O., Somanath S., Clark C.G. (2003). Analysis of genes of mitochondrial origin in the genus *Entamoeba*. *J Eukaryot Microbiol* **50**:210-214.
9. Bakre A., Rawal K., Ramaswamy R., Bhattacharya A., Bhattacharya S. (2005). The LINES and SINES of *Entamoeba histolytica*: Comparative analysis and genomic distribution. *Experimental Parasitology* **110**: 207-213.
10. Bernad A., Zaballos A., Salas M., Blanco L. (1987). Structural and functional relationships between prokaryotic and eukaryotic DNA polymerases. *EMBO J.* **6**:4219-4225.
11. Bertrand H., Griffiths A.J., Court D.A., Cheng C. K. (1986). An extrachromosomal plasmid is the etiological precursor of kalDNA insertion sequences in the mitochondrial chromosome of senescent *Neurospora*. *Cell* **47**: 829-837.

12. Bui E.T., Bradley P.J., Johnson P.J. (1996) A common evolutionary origin for mitochondria and hydrogenosomes. *Proc Natl Acad Sci USA* **18**:9651-9656.
13. Clark C.G. and Diamond L.S. (1992). Differentiation of pathogenic *Entamoeba histolytica* from other intestinal protozoa. *Arch. Med. Res.* **23**:15-16.
14. Clark G. and Roger A.J. (1995). Direct evidence for secondary loss of mitochondria in *Entamoeba histolytica*. *Proc Natl Acad Sci USA* **92**:6518-6521.
15. Conde-Bonfil M.C. y de la Mora-Zerpa (1992). *Entamoeba histolytica*: un desafío vigente. *Salud Pública Méx.* **34**: 335-341.
16. Das S. and Lohia A. (2000). MCM proteins of *Entamoeba histolytica*. *Archives of Medical Research* **31**:S269-S270.
17. Das S., Mukherjee C., Sinha P., Lohia A. (2005). Constitutive association of Mcm2-3-5 proteins with chromatin in *Entamoeba histolytica*. *Cellular Microbiology* **7**:259-267.
18. DePamphilis M. and Blow J.J. (2006). Regulating Initiation Events in Metazoa. In *DNA replication and Human Disease*, Edited by Melvin L. DePamphilis, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, USA. pp 313-328.

19. Diamond L.S., Harlow D.R., Cunnich C.C. (1978). A new medium for the axenic cultivation of *Entamoeba histolytica* and other *Entamoeba*. *Trans R Soc Trop Med Hyg* **72**, 431-432.
20. Eichinger L. and Noegel, A.A. (2005). Comparative genomics of *Dictyostelium discoideum* and *Entamoeba histolytica*. *Curr. Op. Microbiol.* **8**:606–611.
21. Ellis J.E., Setchell K.D.R., Kaneshiro E.S. (1994). Detection of ubiquinone in parasitic and free-living protozoa, including species devoid of mitochondria. *Mol Biochem Parasitol* **65**: 213-224.
22. Embley T.M., van der Giezen M., Horner D.S., Dyal P.L., Foster P. (2003). Mitochondria and hydrogenosomes are two forms of the same fundamental organelle. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* **358**:191-202.
23. Grabowski B. and Kelman Z. (2003). Archeal DNA replication: eukaryal proteins in a bacterial context. *Annual Review of Microbiology* **57**:487-516.
24. Graceffa P., Jancso A., Mabuchi K. (1992). Modification of acidic residues normalizes sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis of caldesmon and other proteins that migrate anomalously. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **297**:46–51.

25. Ghosh S.K., Field J., Frisardi M., Rosenthal B., Mai Z., Rogers R., Samuelson J. (1999). Chitinase Secretion by Encysting *Entamoeba invadens* and Transfected *Entamoeba histolytica* Trophozoites: Localization of Secretory Vesicles, Endoplasmic Reticulum, and Golgi Apparatus. *Infection and Immunity* **67**:3073–3081.
26. Ghosh S., Field J., Rogers R., Hickman M., Samuelson J. (2000). The *Entamoeba histolytica* mitochondrion-derived organelle (crypton) contains doublestranded DNA and appears to be bound by a double membrane. *Infect Immun* **68**:4319-4322.
27. Griffiths A.J. (1992). Fungal senescence. *Ann. Rev. Genetics* **26**:351-372.
28. Guerrant R.L. (1986) Amebiasis: introduction, current status, and research questions. *Rev. Infec. Dis.* **8**:218-227.
29. Hanahan D. (1985). Techniques for transformation of *E. coli*. En: DNA cloning. A practical approach. Vol.1. Glover, DM (Ed). IRL Press, Oxford.
30. Harlow D.R., Weinbach E.C., Diamond L.S. (1976). Nicotinamide nucleotide transhydrogenase in *Entamoeba histolytica*, a protozoan lacking mitochondria. *Comp Biochem Physiol B* **53**:141-144.

31. Harlow, E. Lane, D. (1988). Antibodies. A Laboratory Manual. Cold Spring Laboratory Press. Cold Spring Harbor, NY. USA.
32. Hermanns J., Asseburg A., Osiewacz H.D. (1994). Evidence for a life span-prolonging effect of a linear plasmid in a longevity mutant of *Podospora anserine*. *Molecular and General Genetics* **243**:297-307.
33. Hermanns J. and Osiewacz H.D. (1996). Induction of longevity by cytoplasmic transfer of a linear plasmid in *Podospora anserine*. *Current Genetics* **29**:250-256.
34. Hübscher U., Spanos A., Albert W., Grumm F., Banks G.R. (1981). Evidence that a high molecular weight replicative DNA polymerase is conserved during evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **78**:6771–6775.
35. Kelly T.J and Stillman B. (2006). Duplication of DNA in Eukaryotic Cells. In DNA replication and Human Disease, Edited by Melvin L. DePamphilis, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, USA, pp 1-29.
36. Kucik C.J., Martin G.L., Sortor B.V. (2004). Common Intestinal Parasites. *American Family Physician* **69**: 1161-1168.

37. Leon-Avila G, Tovar J. (2004). Mitosomes of *Entamoeba histolytica* are abundant mitochondrion-related remnant organelles that lack a detectable organellar genome. *Microbiology* **150**:1245-1250.
38. Loftus B., Anderson I., Davies R., Alsmark U.C., Samuelson J., Amedeo P., Roncaglia P., Berriman M., Hirt R.P., Mann B.J. y col. (2005). The genome of the protist parasite *Entamoeba histolytica*. *Nature* **433**:865-868.
39. Luna-Arias J.P., Hernández-Rivas R., de Dios-Bravo G., García J., Mendoza L., Orozco E. (1999). The TATA-box binding protein of *Entamoeba histolytica*: cloning of the gene and location of the protein by immunofluorescence and confocal microscopy. *Microbiology* **145**: 33-40.
40. Luna-Arias J.P., Sanchez T., Herrera-Aguirre M.E., Chavez P., Garrido E., Orozco E. (2003). Purification of *Entamoeba histolytica* DNA containing organelles (EkhOs): a further characterization. *J Eukaryot Microbiol* **5**: 706-708.
41. Mai Z., Ghosh S., Frisardi M., Rosenthal B., Rogers R., Samuelson J. (1999). Hsp60 is targeted to a cryptic mitochondrion-derived organelle ("crypton") in the microaerophilic protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. *Mol. Cell. Biol.* **19**:2198-2205.

42. Makioka A., Kobayashi S., Takeuchi T. (1996). Detection and characterization of DNA polymerase activity in *Entamoeba histolytica*. *Parasitology Research* **82**:87-89.
43. Makioka A., Ohtomo H., Kobayashi S., Takeuchi T. (1998). Effects of aphidicolin on *Entamoeba histolytica* growth and DNA synthesis. *Tokai Journal of Experimental and Clinical Medicine* **23**:417-422.
44. Marchat L.A., Pezet-Valdez, M., Lopez-Camarillo C., Orozco E. (2003). *Entamoeba histolytica* expression and DNA binding of CCAAT/enhancer-binding proteins are regulated through the cell cycle. *Exp Parasitol* **103**: 82-87.
45. Martínez-Palomo A. (1982). The biology of *Entamoeba histolytica*. Research Studies Press. Jhon Wiley and Sons. England. pp-5-56.
46. Martínez-Palomo A. (1987). The pathogenesis of amoebiasis. *Parasitology Today* **3**: 111-118.
47. Martínez-Palomo A. (1989). Biología de *Entamoeba histolytica*. En: Amibiasis. Martínez-Palomo, A. (Ed.). Editorial Médica Panamericana. México, D.F.
48. Mazzuco A., Benchimol M., De Souza W. (1997). Endoplasmic reticulum and Golgi-like elements in *Entamoeba*. *Micron*. **28**:241-247.

49. Melendez-Hernandez M.G., Labra-Barrios M.L., Orozco E., Luna-Arias J.P. (2008). The vacuolar ATPase from *Entamoeba histolytica*: Molecular cloning of the gene encoding for the B subunit and subcellular localization of the protein. *BMC Microbiol* **8**:235.
50. Mendoza L., Orozco E., Rodrigue, M.A., García-Rivera G., Sanchez T., García E., Gariglio P. (2003). Ehp53, an *Entamoeba histolytica* protein, ancestor of the mammalian tumor suppressor p53. *Microbiology* **149**:885-893.
51. Mouhamadou B., Barroso G., Labarere J. (2004). Molecular evolution of a mitochondrial polB gene, encoding a family B DNA polymerase, towards the elimination from *Agrocybe* mitochondrial genomes. *Mol Genet Genomics* **272**:257-263.
52. Müller M. (1997) Evolutionary origin of hydrogenosomes. *Parasitol Today* **13**:166-167.
53. Ono Y., Sakai A., Takechi K., Takio S., Takusagawa M., Takano H. (2007). NtPoll-like1 and NtPoll-like2, bacterial DNA polymerase I homologs isolated from BY-2 cultured tobacco cells, encode DNA polymerases engaged in DNA replication in both plastids and mitochondria. *Plant Cell Physiology* **48**:1679-1692.

54. Orozco E., Gharaibeh R., Riverón A.M. Delgadillo D.M., Mercado M., Sánchez T., Gómez-Conde E., Vargas M.A., López-Revilla R. (1997). A novel cytoplasmic structure containing DNA networks in *Entamoeba histolytica* trophozoites. *Mol Gen Genet* **254**:250-257.
55. Pan C.T. and German G.M. (1955). Comparative studies of intestinal amebae. I. Distribution and cyclic changes of the nucleic acids in *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba coli*. *Am. J. Hyg.* **62**:66-79.
56. Petri W.A. Jr, Singh U. (1999). Diagnosis and management of amebiasis. *Clin Infect Dis* **29**:1117-1125.
57. Pritham E.J., Putliwala T., Feschotte C. (2007). Mavericks, a novel class of giant transposable elements widespread in eukaryotes and related to DNA viruses. *Gene* **390**: 3-17.
58. Proctor E.M. and Gregory, M.A. (1973). Ultrastructure of *E. histolytica*--strain NIH 200. *Int J. Parasitol.* **3**:457-60.
59. Pumarola A., Rodríguez A., García-Rodríguez J.A., Piedrola-Angulo G. (1991). Microbiología y Parasitología Médica. Ediciones científicas y técnicas. 2ª. Ed. Barcelona, España.

60. Ravdin J.I. (1986). Pathogenesis of disease caused by *Entamoeba histolytica*: studies of adherence, secreted toxins, and contact-dependent cytolysis. *Rev.Infect.Dis.* **8**:247-260.
61. Ravdin, J.I. (1995). Amebiasis. *Clin. Infect. Dis.* **20**:1453-1466.
62. Rodríguez M.A., Hidalgo M.E, Sánchez T., Orozco E. (1996). Cloning and characterization of the *Entamoeba histolytica* pyruvate: ferredoxin oxidoreductase gene. *Mol Biochem Parasitol* **78**: 273-7.
63. Rodríguez M.A., García-Pérez R.M., Mendoza L., Sánchez T., Guillen N., Orozco E. (1998). The pyruvate:ferredoxin oxidoreductase enzyme is located in the plasma membrane and in a cytoplasmic structure in *Entamoeba*. *Microb Path* **25**:1-10.
64. Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. (1989). Molecular cloning, a Laboratory Manual. 2nd. Ed. Cold Spring Harbor Laboratory. Cold Spring Harbor, New York.
65. Sanger F., Niklen S., Coulson A.R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad.Sci. USA.* **74**: 5463-5467.

66. Schaffrath R., Soond S.M., Meacock P.A. (1995). The DNA and RNA polymerase genes of yeast plasmid pGKL2 are essential loci for plasmid integrity and maintenance. *Microbiology* **141**: 2591-2599.
67. Schervakova P.V and Kunkel T.A. (2006). DNA polymerases and the fidelity of DNA replication. In DNA replication and Human Disease, Edited by Melvin L. DePamphilis, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, USA, pp 391-409.
68. Sealey, D.C.F., Harrington, L., Zakian V.A. (2006). Telomere DNA replication, Telomerase, and Human Disease. In DNA replication and Human Disease, Edited by Melvin L. DePamphilis, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, USA, pp 561-591.
69. Sepúlveda B. (1982). Amebiasis host-pathogen biology. *Rev. Infect. Dis.* **4**: 836-842.
70. Sivrapasad U., Dutta A., Bell S.P. (2006). Assembly of Pre-replication Complexes. In DNA replication and Human Disease, Edited by Melvin L. DePamphilis, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, USA, pp 63-88.

71. Solís F., Orozco E., Córdova L., Rivera B., Luna-Arias J.P., Gómez-Conde E., Rodríguez M.A. (2002). *Entamoeba histolytica*: DNA carrier vesicles in nuclei and kinetoplast-like organelles (EhkOs). *Mol Gen Genom* **267**: 622-628.
72. Spanos A., Sedgwick S.G., Yarranton G.T., Hübscher U., Banks G.R. (1981). Detection of the catalytic activities of DNA polymerases and their associated exonucleases following SDSpolyacrylamide gel electrophoresis. *Nucleic Acids Research* **9**:1825–1839.
73. Steitz T.A. (1998) A mechanism for all polymerases. *Nature* **391**:231–232.
74. Steitz T.A. (1999). DNA polymerases: structural diversity and common mechanisms. *J Biol Chem.* **274**:17395–17398.
75. Terán-Figueroa Y., Arteaga-Nieto P., Bethancourt-Rodríguez A., Labra-Barrios, M.L., Luna-Arias J.P., Flores-Carreón A., Cano-Canchola C., López-Romero E., Calvo-Méndez C. (2009). *Entamoeba histolytica*, heterologous expression and in situ immunolocalization of ornithine decarboxylase (EhODC). *Experimental Parasitology* **123**: 99–104.
76. Torres-Guerrero A., Peattie D.A., Meza I. (1991). Chromatin organization in *Entamoeba histolytica*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **45**:121-130.

77. Tovar J., Fischer A., Clark C.G. (1999). The mitosome, a novel organelle related to mitochondria in the amitochondrial parasite *Entamoeba histolytica*. *Mol Microbiol*, **32**:1013-1021.
78. van der Giezen M., León-Avila G., Tovar J. (2005). Characterization of chaperonin 10 (Cpn10) from the intestinal human pathogen *Entamoeba histolytica*. *Microbiology*, **151**:2107-3115.
79. Walter J.C. and Hiroiyuki, A. (2006). Activation of pre-replication Complexes. In DNA replication and Human Disease, Edited by Melvin L. DePamphilis, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, USA. pp 89-104.
80. Wang T.S., Wong S.W., Korn D. (1989). Human DNA polymerase α : predicted functional domains and relationships with viral DNA polymerases. *The FASEB J.* **3**: 14-21.
81. Watson J.D., Baker T.A., Bell S.P., Gann A., Levine M., Losick R. (2004). *Molecular Biology of the Gene* 5th ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
82. WHO (1997) WHO/PAHO/UNESCO report of a consultation of experts on amebiasis. *Week. Epidem. Rep. WHO.* **72**: 97-99.

83. Williams K., Lowe P.M., Leadly P.F. (1987). Purification and characterization of pyruvate:ferredoxin oxidoreductase from the anaerobic protozoon *Trichomonas vaginalis*. *Biochem J.* **246**:529-536.
84. Yuewang W., Yang X., Griffiths A.J. (1996). Structure of a *Gelasinospora* linear plasmid closely related to the kalilo plasmid of *Neurospora intermedia*. *Curr Genet* **29**:150-158.

IX. APÉNDICE: Artículo publicado.

Research Article

Identification of Four *Entamoeba histolytica* Organellar DNA Polymerases of the Family B and Cellular Localization of the *Ehodp1* Gene and EhODP1 Protein

María Esther Herrera-Aguirre,¹ Juan Pedro Luna-Arias,² María Luisa Labra-Barrios,² and Esther Orozco³

¹ Posgrado en Ciencias Genómicas, Universidad Autónoma de la Ciudad de México, San Lorenzo 290, Col. Del Valle, CP 03100 México, DF, Mexico

² Departamento de Biología Celular, Cinvestav-IPN, Av. IPN 2508, Col. Zacatenco, CP 07360 México, DF, Mexico

³ Departamento de Infectómica y Patogénesis Molecular, Cinvestav-IPN, Av. IPN 2508, Col. Zacatenco, CP 07360 México, DF, Mexico

Correspondence should be addressed to Esther Orozco, esther@cinvestav.mx

Received 18 August 2009; Accepted 15 December 2009

Academic Editor: Isaac K. O. Cann

Copyright © 2010 María Esther Herrera-Aguirre et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

We report the identification of a family of four active genes (*Ehodp1*, *Ehodp2*, *Ehodp3*, and *Ehodp4*) encoding putative DNA polymerases in *Entamoeba histolytica*, the protozoan parasite responsible of human amoebiasis. The four *Ehodp* genes show similarity to DNA polymerases encoded in fungi and plant mitochondrial plasmids. EhODP polypeptides conserve the 3'-5' exonuclease II and 5'-3' polymerization domains, and they have the I, II, and III conserved boxes that characterize them as DNA polymerases of family B. Furthermore, we found in EhODP polymerases two novel A and B boxes, present also in DNA polymerases encoded in fungi mitochondrial plasmids. By in situ PCR, *Ehodp1* gene was located in nuclei and in DNA-containing cytoplasmic structures. Additionally, using polyclonal antibodies against a recombinant rEhODP1-168 polypeptide, and confocal microscopy, EhODP1 was located in cytoplasmic DNA-containing structures.

1. Introduction

Entamoeba histolytica is the protozoan parasite causative of human amoebiasis [1]. Replication in *E. histolytica* is inhibited by aphidicolin [2, 3], a specific inhibitor of mammalian α , δ and ϵ DNA polymerases. Additionally, *EhMCM2*, *EhMCM3* and *EhMCM5* genes, whose products are part of the helicase complex, have been cloned and characterized [4, 5]. Although nuclear α and δ DNA polymerase sequences are present in *E. histolytica* genome [6], DNA polymerase encoding genes have not been isolated or characterized and DNA replication processes are poorly understood in this parasite.

In eukaryotes, replicative DNA polymerases are grouped in two families: (1) family A, which includes γ DNA polymerases of animals and fungi, and Pol I-like DNA polymerases responsible for mitochondrial DNA replication

in plants and slime mold. (2) family B comprises the α , δ and ϵ DNA polymerases involved in nuclear DNA replication [7–9], archaeobacterial, viral, bacteriophage DNA polymerases such as those present in phages T4 and RB69 and DNA polymerases encoded in fungi and plant mitochondrial plasmids [10]. Commonly, the fungal plasmids are linear and they have been frequently found in filamentous fungi [11]. Transcription and replication of linear plasmids are initiated in terminal inverted repeats by a plasmid encoded phage-like single subunit RNA polymerase and by a DNA polymerase of the family B, respectively [12]. Replication in these plasmids is thought to occur by a protein-primed mechanism, similar to that described for *Bacillus subtilis* phage phi29 [13]. The B DNA polymerases are distinguished by the presence of up to six common regions in their amino acid sequences (boxes I to VI). The most conserved regions (I and II) include aspartic acid residues essential to catalytic polymerase activity [10].

Although it has been reported that *E. histolytica* had a secondary mitochondrial lost [14], no genes encoding γ DNA polymerase responsible for mitochondrial DNA replication have been detected [6]. However, trophozoites carry mitosomes, a mitochondrial cytoplasmic remnant organelle lacking DNA [15, 16], and crypton and EhkO [17–20], two DNA-containing cytoplasmic organelles, with a double membrane. Crypton is a 0.5 to 1 μ m organelle that carries the mitochondrial chaperonin Hsp60 [17, 18], whereas EhkO varies from 0.5 to 5 μ m and it has the EhPFO enzyme [21]. Some authors have suggested that crypton and EhkO could be the same structure [18]; however, their morphological and biochemical characteristics need to be better studied to define this.

The mechanism of DNA replication and the proteins and genes involved in this process in *E. histolytica* are unknown. To better understand the DNA replication process in this parasite we have initiated the search and study of its DNA polymerase genes. Here, we report the identification of a gene family (*Ehodp1*, *Ehodp2*, *Ehodp3* and *Ehodp4*) encoding putative *E. histolytica* DNA polymerases. All of them correspond to the family B, with a high similarity to fungi and plant DNA polymerases encoded in mitochondrial plasmids. RT-PCR experiments indicated that the four genes are expressed in trophozoites. Additionally, in situ PCR assays demonstrated that *Ehodp1* gene is located in nuclei and in cytoplasmic DNA-containing structures. By confocal microscopy using polyclonal antibodies against a recombinant EhODP1 fragment, the EhODP1 polypeptide was only detected in cytoplasmic structures, but not in nuclei.

2. Materials and Methods

2.1. *E. histolytica* Cultures. Trophozoites of *E. histolytica* clone A were axenically cultured in TYI-S-33 medium at 37°C and harvested during the exponential growth phase as described [22]. For purification of EhkOs, the medium was supplemented with 2 μ Ci/mL [methyl-³H]-Thymidine (Amersham) for 48 hours [23].

2.2. Search of Genes Encoding DNA Polymerases in the *E. histolytica* Genome Databases. To identify a DNA polymerase encoding gene, a BLAST search was performed in the *E. histolytica* genome databases at The Sanger Institute <http://www.sanger.ac.uk/> and Pathema from The J. Craig Venter Institute <http://www.jcvi.org/>. As query, we used the polypeptide sequence of the *Gelasinospira* sp DNA polymerase encoded on mitochondrial plasmids [UniProt Knowledgebase (UniProtKB)/TrEMBL accession number (AN) O03684] and the WU-BLAST version 2.0 program and BLOSUM62 matrix. DNA sequences were translated to proteins with the Translate tool at the ExPASy Proteomics Server <http://www.expasy.org/>. BLAST search for each EhODP polypeptide sequence was done with BLASTP 2.2.14 algorithm in the UniProtKB at the ExPASy Proteomics server of the Swiss Institute of Bioinformatics using the BLOSUM62 matrix. Alignments were performed with ClustalW version

1.83 algorithm at the European Bioinformatics Institute (EBI, <http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustaw2/index.html>).

2.3. Semiquantitative RT-PCR Assays. Total RNA was isolated with TRIzol (Invitrogen). cDNA was synthesized with 200 U of SuperScript II reverse transcriptase (Invitrogen) and 40 U of RNasin ribonuclease inhibitor (Promega). PCR assays were performed with 3 μ L of cDNA mixture, 400 μ M dNTPs, 2 mM MgCl₂, 200 nM of specific primers for each gene and 4 U of *Taq* DNA polymerase (Invitrogen). For *Ehodp1* gene we used *odp1*-f (forward), 5'-GAAGATCTGCCAATCCCCACAAAACGTCAC-3', and *odp1*-r (reverse), 5'-GGAATTCTTATTGCGGTTCTGATTTTCTAAGTT-3' primers (T_m of 59°C), containing the *Bgl*II and *Eco*RI restriction sites at their 5' ends, respectively. For *Ehodp2* gene we used the primers *odp2*-f, 5'-ATCGTCGAAATACAAGACAAA-3' and *odp2*-r, 5'-TCTTTGATATTCTTCATCACTGG-3' (T_m of 54°C). For *Ehodp3* gene we used *odp3*-f, 5'-TGAAAGAAGAGAGAAATACAAAG-3' and *odp3*-r, 5'-ATCACTAACTCTTTCTTCCC-3' primers (T_m of 54°C). For *Ehodp4* we used *odp4*-f, 5'-ATCTGACTTAGATGGCTATGCTGA-3', and *odp4*-r, 5'-GTCATTAAGGGGATCTGGTG-3' oligonucleotides (T_m of 54°C). As an internal control, we used (sense) 5'-AGCTGTTCTTTCATTATATGC-3' and (antisense) 5'-TTCTCTTTCAGCACTAGTGGT-3' actin oligonucleotides (T_m of 54°C). PCR conditions were; 94°C (5 minutes), followed by 29 cycles at 94°C (30 seconds), annealing at specific T_m for each pair of primers (60 seconds) and extension at 72°C (60 seconds). RT-PCR products were separated by 6% PAGE gels in 0.5 $\times$ TBE (90 mM Tris, 90 mM H₃BO₃, 2 mM EDTA, pH 8.3), stained with ethidium bromide and visualized with a UV transilluminator (Gel Doc Documentation System, Bio-Rad). For densitometry analysis we used the Quantity One software version 4.6.1 (Bio-Rad).

2.4. Cloning of a 504 bp DNA Fragment from the *Ehodp1* Gene. A 504 bp DNA fragment from contig1 sequence (from 232 to 735 bp) was PCR amplified from *E. histolytica* total DNA using 200 nM of each primer (*odp1*-f and *odp1*-r), 400 μ M dNTPs, 2 mM MgCl₂ and 2 U of *Taq* DNA polymerase. PCR was performed using the conditions mentioned above. Amplified DNA was purified and cloned into pRSET A vector (Invitrogen) to generate the recombinant pRSET A-*Ehodp1*-504 plasmid (prEhodp1). Sequencing of cloned DNA was carried out using the Big Dye Terminator kit version 3.1 (Applied Biosystems) in an Automated DNA Sequencer (310 Genetic Analyzer, Applied Biosystems). Nucleotide sequence data of the *Ehodp1* gene is available in the GenBank database under the accession number EU423197.

2.5. Expression and Purification of the Recombinant rEhODP1-168 Polypeptide in *Escherichia coli*. *E. coli* BL21(DE3)pLysS (Invitrogen) competent cells were transformed with prEhodp1 plasmid. rEhODP1-168 polypeptide production was induced with 1 mM isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside (IPTG) for 3 hours at 37°C. Cells were harvested, resuspended in lysis buffer (6 M guanidine-HCl, 0.1 M NaH₂PO₄,

0.01 M Tris-HCl, pH 8.0) and disrupted by sonication at 4°C. Recombinant polypeptide was purified under denaturing conditions by immobilized metal affinity chromatography (IMAC) through a Ni²⁺-NTA agarose column (Qiagen) in buffer D (8 M urea, 100 mM NaH₂PO₄, 10 mM Tris HCl, pH 5.9) and buffer E (8 M urea, 100 mM NaH₂PO₄, 10 mM Tris HCl, pH 4.5), following the manufacturer's protocol. Then, rEhODP1-168 polypeptide purification was improved by electroelution from preparative 15% SDS-PAGE gels using a Model 422 Gel Electro-eluter (Bio-Rad).

2.6. Two Dimensional-Gel Electrophoresis and MALDI-TOF Analysis. Purified fractions, obtained from the Ni²⁺-NTA-agarose affinity chromatography, were analyzed in 2D-gels. Isoelectric focusing was performed with ZOOM strips (linear pH 3–10 gradient) in an XCell SureLock Mini-Cell system (Invitrogen) at 200 V (20 minutes), 450 V (15 minutes), and 2,000 V (30 minutes). Second dimension was done through a 15% SDS-PAGE with a Mini-Protean II system (Bio-Rad). Then, gels were Coomassie Brilliant Blue stained and selected spots were cut and sent to the Protein Chemistry Core Facility at Columbia University for analysis by mass spectrometry in a MALDI-TOF system.

2.7. Generation of Rat Polyclonal Antibodies Against rEhODP1-168 Polypeptide and Western Blot Assays. Wistar rats were three times intramuscularly immunized with 15 µg of purified rEhODP1-168 polypeptide mixed with diluted 1:10 (v/v) Titer Max Gold (CytRx Corporation) in PBS at 15 days intervals. Then, immune serum was collected 14 days after last immunization. Rats were bled before the first immunization to obtain preimmune serum. For Western blot assays, purified rEhODP1-168 polypeptide was separated by 15% SDS-PAGE and transferred to a nitrocellulose membrane. Membranes were blocked with 3% (w/v) nonfat milk in PBS for one hour [24]. Immunodetection of His-tagged polypeptide was done by incubation with 0.3 µg/mL mouse anti-6His monoclonal antibodies (Roche) for 1 hour at 37°C. Membranes were washed 3 times with PBS, followed by incubation with horseradish peroxidase-conjugated goat anti-mouse IgG secondary polyclonal antibodies (Zymed) (1:2,000) at room temperature (RT) for 1 hour. Immunoreactive bands were visualized using 3, 3'-diaminobenzidine and 0.025% (v/v) H₂O₂ [25]. For Western blot of trophozoite total extracts supplemented with 1 × complete protease inhibitors (Roche) and EhkO-enriched fraction, proteins were separated through 10% SDS-PAGE and transferred to nitrocellulose membranes that were treated as mentioned above. Then, membranes were incubated with either rat anti-rEhODP1-168 polyclonal antibodies or preimmune serum (1:1,000) overnight at 4°C, and revealed as described [25].

2.8. Immunofluorescence and Confocal Microscopy. Trophozoites adhered on cover slips, were paraformaldehyde fixed (4% w/v) at RT (1 hour) and treated with 50 mM NH₄Cl at 37°C (1 hour). Then, cells were permeabilized with acetone at -20°C (7 minutes), immersed in blocking solution

(2% BSA, w/v, in PBS) at RT (2 hours) and incubated with rat anti-rEhODP1-168 antibodies (1:500) at 4°C overnight. Next, they were washed with PBS, incubated with fluorescein-labeled goat anti-IgG rat secondary antibodies (1:1,000) in blocking solution at RT (2 hours), washed with PBS, counterstained with 20 µg/mL propidium iodide (PI) (Fluka) for 5 minutes, and observed through a Leica DM-IRE2 confocal microscope. As a negative control, cells were treated as above, but incubation with anti-rEhODP1-168 antibodies was omitted or preimmune serum was used.

2.9. Isolation of an EhkO-Enriched Fraction. EhkOs were purified from [³H]-Thymidine labeled trophozoites as described [23]. Cells were washed with PBS and resuspended in 8 volumes of buffer A (10 mM EDTA, 10 mM DTT, 10 mM HEPES, pH 7.9) containing 1× complete protease inhibitors (Roche) and 250 mM sucrose. Then, cells were gently disrupted on ice using a Potter homogenizer and centrifuged at 160 ×g for 10 minutes. The supernatant was centrifuged at 10,000 ×g for 10 minutes at 4°C, and the pellet was resuspended in 15% (v/v) Nycodenz (Axis-Shield) in buffer A and top loaded on a Nycodenz discontinuous gradient (30%, 40% and 50%, all v/v). Then, pellet was centrifuged at 13,000 ×g for 60 minutes at 4°C. Fractions of 0.5 mL were collected with a DensiFlow II C system (Buchler Instruments) and a RediFrac 1,000 fraction collector (Bio-Rad). 100 µL aliquots of each fraction were 10% (w/v) TCA precipitated and their radioactivity content was determined in a LS6500 liquid scintillation counter (Beckman). EhkO-containing fractions were identified by [³H]-Thymidine incorporation.

2.10. In Situ PCR. Assays were performed according to protocols included in the In Situ-PCR (IS-PCR) manual (Perkin-Elmer). Exponentially growing trophozoites were attached to glass slides, washed with PBS at 37°C and paraformaldehyde fixed (4% w/v) at RT for 60 minutes. Fixed trophozoites were incubated in 20 mM HCl (15 minutes), washed twice in PBS (5 minutes), incubated in 0.01% (v/v) Triton X-100 (90 seconds), washed in PBS and treated with 1 µg/mL proteinase K at 40°C (25 minutes). Next, cells were dehydrated in ethanol solutions (30%, 50%, 70% and 100%, v/v) at 4°C (5 minutes). For IS-PCR, samples were covered with 50 µL of reaction mixture containing 200 µM dNTPs, 400 µM of each odp1-f and odp1-r primers (described in Materials and Methods, Section 2.3), 4.5 mM MgCl₂, 10 U of AmpliTaq DNA Polymerase IS (Perkin-Elmer) and 0.1 µL of Cy5-dCTP (Amersham). PCR conditions were as follows: one cycle at 94°C (3 minutes), followed by 30 cycles of annealing at 59°C (60 seconds) and extension at 72°C (60 seconds). A final extension step was carried out at 72°C (7 minutes). Then, samples were fixed with 2% (w/v) paraformaldehyde at RT (5 minutes), washed with PBS, incubated with 25 mg/mL RNase A (Roche) (20 minutes), washed with PBS, counterstained with 20 µg/mL PI (5 minutes), and observed through a Leica DM-IRE2 confocal microscope. IS-PCR negative controls were carried out, one without Taq DNA polymerase and the second containing all the reaction components except for oligonucleotides.

TABLE 1: Comparison of the *E. histolytica* organellar DNA polymerase 1 (EhODP1) with DNA polymerases mostly encoded in mitochondrial plasmids.

Organism	AN	Cod	L (aa)	I (%)	S (%)	AA compared	Score	E
<i>T. vaginalis</i>	A2ECW5	nd	1232	33	53	929	447	$1e^{-123}$
<i>F. velutipes</i>	Q9GBS2	M	925	22	40	781	116	$8e^{-24}$
<i>Gelasinospora sp</i>	003684	M (Gel-kal)	987	21	39	847	116	$8e^{-24}$
<i>A. immersus</i>	P22374	M (Pa12)	1202	25	42	494	108	$2e^{-21}$
<i>C. perniciosa</i>	Q6U7U2	M	899	21	39	642	107	$4e^{-21}$
<i>S. kluyveri</i>	Q09038	M (pSKL)	999	24	40	654	102	$1e^{-19}$
<i>N. intermedia</i>	P33538	M (kalilo)	969	22	41	514	102	$1e^{-19}$
<i>P. etchellsii</i>	Q9C130	C (pPE1B)	1013	23	41	541	78	$3e^{-12}$
<i>K. lactis1</i>	P09804	M (pGKL-1)	995	24	39	771	97	$7e^{-18}$
<i>K. lactis2</i>	P05468	M (pGKL-2)	994	22	41	668	92	$2e^{-16}$
<i>P. purpurea</i>	O99973	M	620	23	41	541	78	$3e^{-12}$
<i>A. aegerita</i>	O78938	M	571	22	41	515	83	$1e^{-13}$
<i>P. kluyveri</i>	O21376	M (pPK2)	1118	20	39	531	63	$1e^{-07}$
<i>M. conica</i>	Q9TEH5	M (pMC3-2)	901	28	44	216	60	$1e^{-07}$
<i>P. anserina</i>	Q01529	M (pAL2-1)	1197	22	40	614	59	$2e^{-06}$

AN (UniProtKB/TrEMBL Accession Number). Cod (Coded in mitochondrion (M) or cytoplasm (C) or not determined (nd)). L (Total aa length of the protein). I (Identity). S (Similarity). E (Expected value).

3. Results

3.1. Identification of Four Genes Encoding *E. histolytica* DNA Polymerases of Family B. *E. histolytica* has DNA-containing cytoplasmic organelles that could be related to mitochondrion. Therefore, we performed a BLAST search in the *E. histolytica* genome databases using as query several γ DNA polymerase sequences from different organisms, but we did not find any related sequence to them. Then, we employed as query the *Gelasinospora* DNA polymerase sequence (UniProtKB/TrEMBL AN O03684) encoded by the mitochondrial linear plasmid Gel-kal [26]. First, we found in the Wellcome Trust Sanger Institute database a 3,462 bp ORF sequence annotated as contig1, which encodes for a 1,154 amino acid polypeptide with a 135.5 kDa predicted molecular mass. This polypeptide sequence displayed 20% to 28% identity and 39% to 44% similarity to organellar DNA polymerases of family B encoded in mitochondrial plasmids and 33% identity and 53% similarity to a *Trichomonas vaginalis* putative DNA polymerase (Table 1). We called this gene *E. histolytica* organellar-like DNA polymerase 1 (*Ehodp1*). Then, using the *Ehodp1* sequence as query we detected at Pathema, three other *E. histolytica* related sequences: EHL196700/GenBank ID: XM_643104 (*Ehodp2*) that has 3,696 bp and encodes for a putative 1,231 amino acid polypeptide (147.7 kDa), EHL132860/GenBank ID: XM_644753 (*Ehodp3*) with 3,273 bp and encodes for a 1,090 amino acid polypeptide (129.2 kDa) and EHL164190 (*Ehodp4*) that has 3,897 bp and encodes for a 1,278 amino acid protein (149.5 kDa) (Figure 1). EhODP1 is 51% identical to EhODP2 and EhODP3, and 63% to EhODP4 and it shows 69%, 67% and 76% similarity to EhODP2, EhODP3 and EhODP4, respectively.

3.2. Structural Organization of Putative *E. histolytica* DNA Polymerases. The alignment of EhODP1, EhODP2, EhODP3 and EhODP4 protein sequences with other DNA polymerases of family B with the ClustalW program, showed in EhODP amino acid sequences the presence of I, II and III conserved boxes described in DNA polymerases from other organisms (Figures 2 and 3) [12, 27]. Boxes I and II contain part of the catalytic domain, which includes two aspartic acid residues that interact with Mg^{2+} ions [28]. In EhODP1, EhODP2, EhODP3 and EhODP4, the corresponding aspartic acid residues are D1040 and D795, D1093 and D848, D952 and D707, and D1140 and D895, respectively (Figures 1 and 3(a)).

Interestingly, we also identified here two other novel boxes (A and B) in EhODP sequences that we also located in fungi mitochondrial plasmids and in the putative *T. vaginalis* DNA polymerase (Figures 1, 2 and 3(b)). In EhODP1, Box A (IIFKDTLALIPTSISNFKTFFKLDGKYEKEIFPY) spans from I616 to Y649, in EhODP2 from I669 to Y702, in EhODP3 from I528 to Y561 and in EhODP4 from I716 to Y749. Box B in EhODP1 (FNTEKYCEYYCLRDVLVL-REGFLKYK) spans from F697 to K722, while in EhODP2, EhODP3 and EhODP4, box B corresponds to the regions located at F750 to K775, F609 to K634 and F797 to K822, respectively.

Then, using the Simple Modular Architecture Research Tool (SMART), we found in EhODPs the characteristic DNA.pol.B.2 (PF03175) domain of organellar and viral DNA polymerases of family B (Figure 1). In EhODP1 this domain is located at amino acids 570 to 1042 (e value 1.1×10^{-11}), in EhODP2 at amino acids 621 to 1095 (e value 1.9×10^{-15}), in EhODP3, at amino acids 480 to 954 (e value 1×10^{-10}) and in EhODP4 at amino acids 670

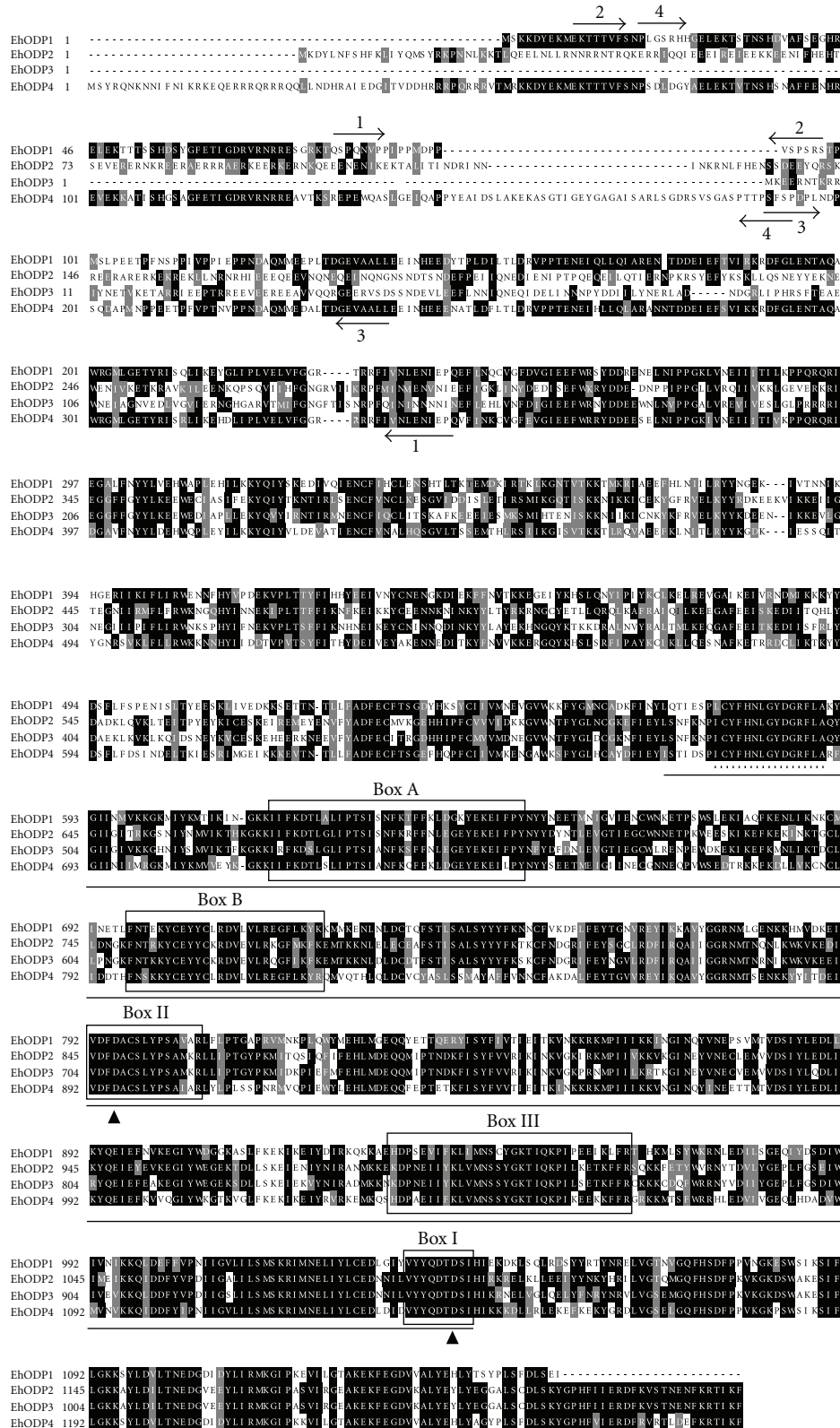


FIGURE 1: Alignment of the *E. histolytica* putative organellar DNA polymerases. The five conserved boxes I, II, III, A and B are framed. Identical amino acids are shown in black. Conserved changes are shown in grey. Numbers indicate the positions of amino acids in each polypeptide. Arrows locate the region used to design specific oligonucleotide pairs to amplify each gene by RT-PCR, and numbers 1, 2, 3, and 4 correspond to *Ehodp1*, *Ehodp2*, *Ehodp3* and *Ehodp4* genes, respectively. Putative DNA_{pol}.B.2 (PF03175) domain (described for organellar and viral DNA polymerases of family B) is underlined. Exonuclease II domain is indicated with a dotted underlining. Arrowheads indicate the aspartic acid residues that are required for the catalytic activity.

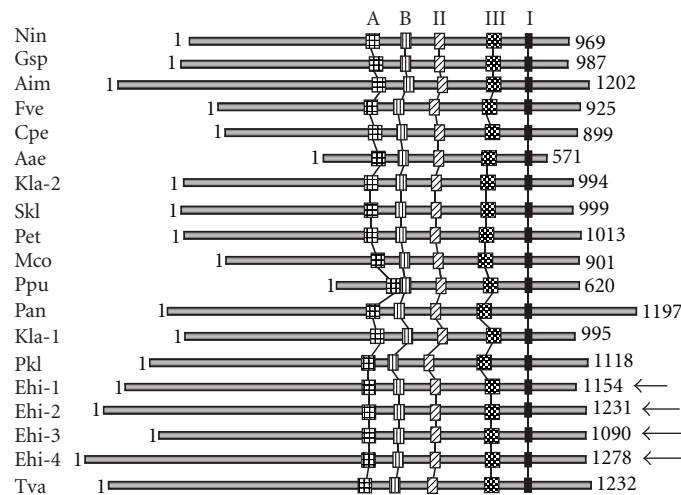


FIGURE 2: Structural organization of the *E. histolytica* DNA polymerases of family B. A graphical alignment of EhODP1, EhODP2, EhODP3 and EhODP4 with DNA polymerases of different fungi mitochondrial plasmids and a putative DNA polymerase of *T. vaginalis* was obtained based on an alignment with the ClustalW program as described in Materials and Methods. Boxes I, II and III, marked in the bars, are specific to family B. Boxes A and B correspond to two conserved regions found in fungi organellar DNA polymerases and that from *T. vaginalis*. Numbers at the beginning of bars correspond to the first methionine, and at the end of the bars to the full length for each polypeptide. Arrows indicate the organellar DNA polymerases of *E. histolytica*. Nin: *Neurospora intermedia*; Gsp: *Gelasinospora sp*; Aim: *Ascobolus immersus*; Fve: *Flammulina velutipes*; Cpe: *Crinipellis perniciosa*; Aae: *Agrocybe aegerita*; Kla-2: *Kluyveromyces lactis* DNA polymerase 2, found in plasmid pGKL-2; Skl: *Saccharomyces kluyveri*; Pet: *Pichia etchellsii*; Mco: *Morchella conica*; Ppu: *Porphyra purpurea*; Pan: *Podospira anserina*; Kla-1: *Kluyveromyces lactis* DNA polymerase 1, found in plasmid pGKL-1; Pkl: *Pichia kluyveri*; Ehi-1: *Entamoeba histolytica* organellar DNA polymerase 1; Ehi-2: *Entamoeba histolytica* organellar DNA polymerase 2; Ehi-3: *Entamoeba histolytica* organellar DNA polymerase 3; Ehi-4: *Entamoeba histolytica* organellar DNA polymerase 4; Tva: *Trichomonas vaginalis*.

to 1142 (e value 4.3×10^{-10}). In addition, we found in them the 3'-5' exonuclease II domain [29] (Figure 3). The presence of boxes I, II, III, A and B in the four EhODP polypeptides, conserved in DNA polymerases encoded in mitochondrial plasmids, as well as the detection of the 3'-5' exonuclease II domain, strongly suggests that these *E. histolytica* polymerases constitute a family of putative organellar DNA polymerases belonging to family B.

3.3. Transcription of the Ehodp1, Ehodp2, Ehodp3 and Ehodp4 Genes in *E. histolytica* Trophozoites. To determine if Ehodp genes were expressed in trophozoites, we performed RT-PCR assays with specific oligonucleotide pairs for each gene. Results showed that the amplified products presented the expected 524, 317, 149 and 376 bp sizes for Ehodp1, Ehodp2, Ehodp3 and Ehodp4 genes, respectively (Figure 4(a)), suggesting that the four Ehodp genes are transcriptionally active. The expression level of each gene was measured by semiquantitative RT-PCR (Figures 4(b)–4(d)) and data were normalized against the amount of actin transcript simultaneously obtained. We calculated the relative abundance of the Ehodp genes considering Ehodp1 gene expression level as 100%. Thus, Ehodp2 exhibited 96.7%, Ehodp4 showed 35%, while Ehodp3 was expressed only at 3.7%. Negative RT-PCR controls with the same RNA were performed for each gene in the same conditions, but without reverse transcriptase (Figure 4(a)).

3.4. Localization of the Ehodp1 Gene in Nuclei and Cytoplasmic DNA-Containing Structures by In Situ PCR. To determine the cellular location of Ehodp1 gene, we amplified by IS-PCR a specific DNA fragment of this gene in fixed and permeabilized trophozoites. Cells were stained with propidium iodide to detect DNA-containing organelles (Figure 5, PI). Through confocal microscope, we observed amplification of Ehodp1 DNA in both nuclei and cytoplasmic organelles (Figures 5(a), 5(b), Cy5). Merging of fluorescent signals showed the colocalization of DNA and the amplification of Ehodp1 in both organelles (Figures 5(a), 5(b), M). As negative controls, we alternatively performed reactions without Taq DNA polymerase and without Ehodp1 specific oligonucleotides. No fluorescent signals were obtained in these cases (Figures 5(c), 5(d), Cy5). Integrity of trophozoites was confirmed by Nomarsky microscopy (Figure 5, MN). These results demonstrate that Ehodp1 gene is located in nuclei and in cytoplasmic DNA-containing structures that may correspond to EhkOs [19–21] or cryptons [17, 18], or both.

3.5. Expression of a Recombinant EhODP1 Polypeptide. To initiate the characterization of the EhODP gene family, we cloned an Ehodp1 504 bp DNA fragment to obtain the recombinant plasmid prEhodp1 that was used to transform *E. coli* BL21(DE3)pLysS cells to produce a histidine-tagged

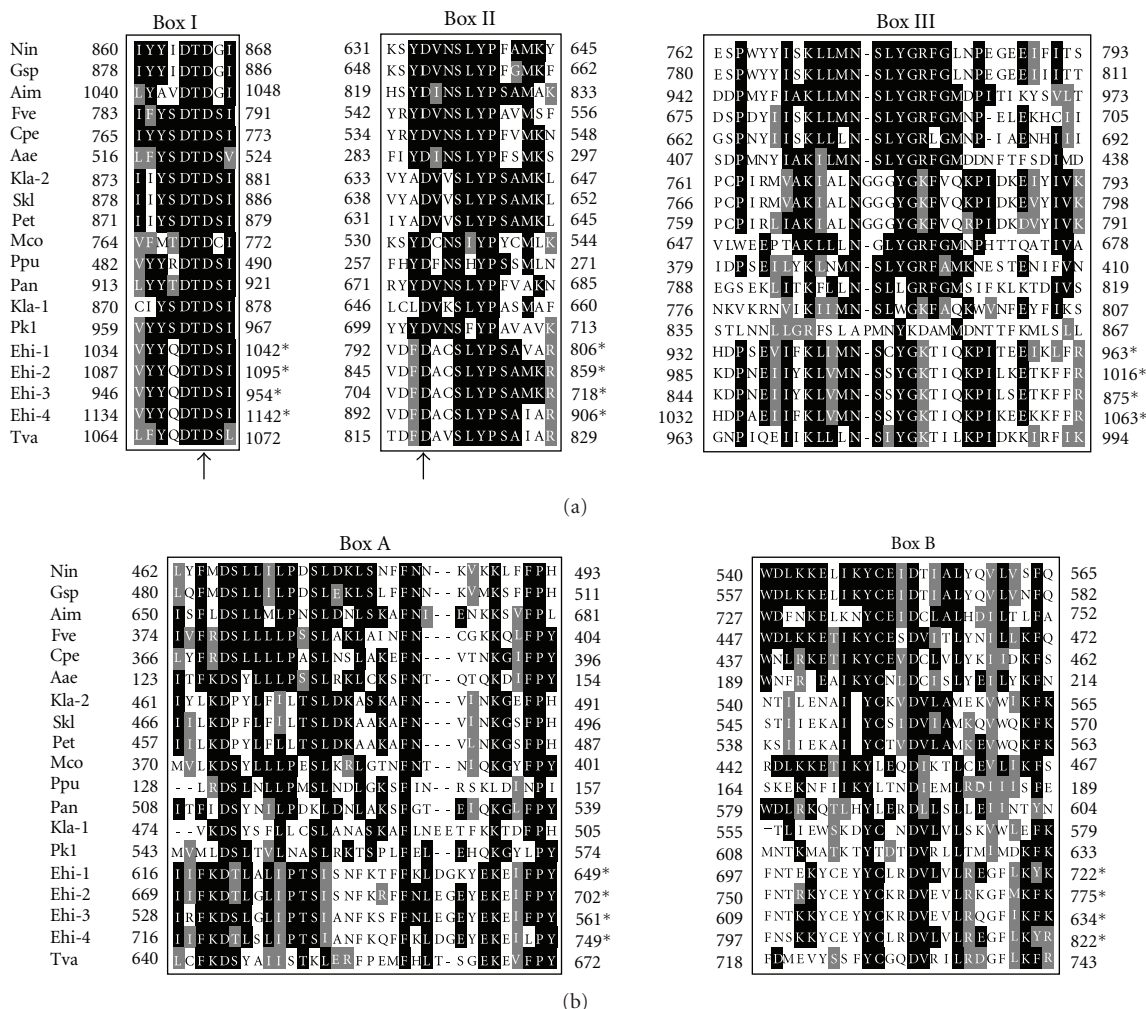


FIGURE 3: Alignment of the conserved boxes identified in EhODP1, DNA polymerases encoded in fungi mitochondrial plasmids and in a *T. vaginalis* protein. (a) Amino acid sequences corresponding to boxes I, II and III which characterize the family B of DNA polymerases. (b) Amino acid sequences of boxes A and B conserved in the aligned polypeptides that were found in this work. Identical amino acids are shown in black. Conserved changes are shown in grey. Numbers correspond to the first and last residues in conserved boxes for each polypeptide. Arrows indicate the aspartic acid residues that are required for the catalytic activity of DNA polymerases. Asterisks indicate sequences corresponding to EhODPs. *Nin*: *Neurospora intermedia*; *Gsp*: *Gelasinospora sp*; *Aim*: *Ascobolus immersus*; *Fve*: *Flammulina velutipes*; *Cpe*: *Crinipellis perniciosa*; *Aae*: *Agrocybe aegerita*; *Kla-2*: *Kluyveromyces lactis* DNA polymerase 2, found in plasmid pGKL-2; *Skl*: *Saccharomyces kluyveri*; *Pet*: *Pichia etchellsii*; *Mco*: *Morchella conica*; *Ppu*: *Porphyra purpurea*; *Pan*: *Podospira anserina*; *Kla-1*: *Kluyveromyces lactis* DNA polymerase 1, found in plasmid pGKL-1; *Pkl*: *Pichia kluyveri*; *Ehi-1*: *E. histolytica* organellar DNA polymerase 1; *Ehi-2*: *E. histolytica* organellar DNA polymerase 2; *Ehi-3*: *E. histolytica* organellar DNA polymerase 3; *Ehi-4*: *E. histolytica* organellar DNA polymerase 4; *Tva*: *T. vaginalis*.

rEhODP1-168 polypeptide (23.7 kDa). Electrophoretic analysis of proteins from transformed bacteria revealed the presence of 23 and 33 kDa induced bands (Figure 6(a)). Both polypeptides copurified when extracts from induced bacteria were passed through a Ni^{2+} -NTA-agarose column under denaturing conditions (Figure 6(b)). Then, the recombinant protein was detected by mouse monoclonal antibodies against the 6His tag. Antibodies only recognized the 33 kDa band (Figures 6(c), 6(d)), and they did not react with the 23 kDa band. To obtain further data to identify the rEhODP1-168 polypeptide, we analyzed the purified fraction by 2D gels. Both proteins in the fraction presented a

closely related isoelectric point to the expected value of 4.5 (Figure 6(e)). Therefore, we excised the spots from the 2D gel and performed a MALDI-TOF mass analysis. Amino acid sequences indicated that the 33 kDa polypeptide corresponded to rEhODP1-168 (Figures 6(e), 6(f)), whereas the 23 kDa polypeptide (Figure 6(e)) was a histidine-rich bacterial protein, with similarity to a bacterial FKBP-type peptidyl-prolyl cis-trans isomerase. The molecular weight showed in SDS-PAGE by rEhODP1-168 could be explained by the presence of acidic residues in its sequence, which affects electrophoretic migration, as it has been described for caldesmon, tropomyosin and calsequestrin proteins [30].

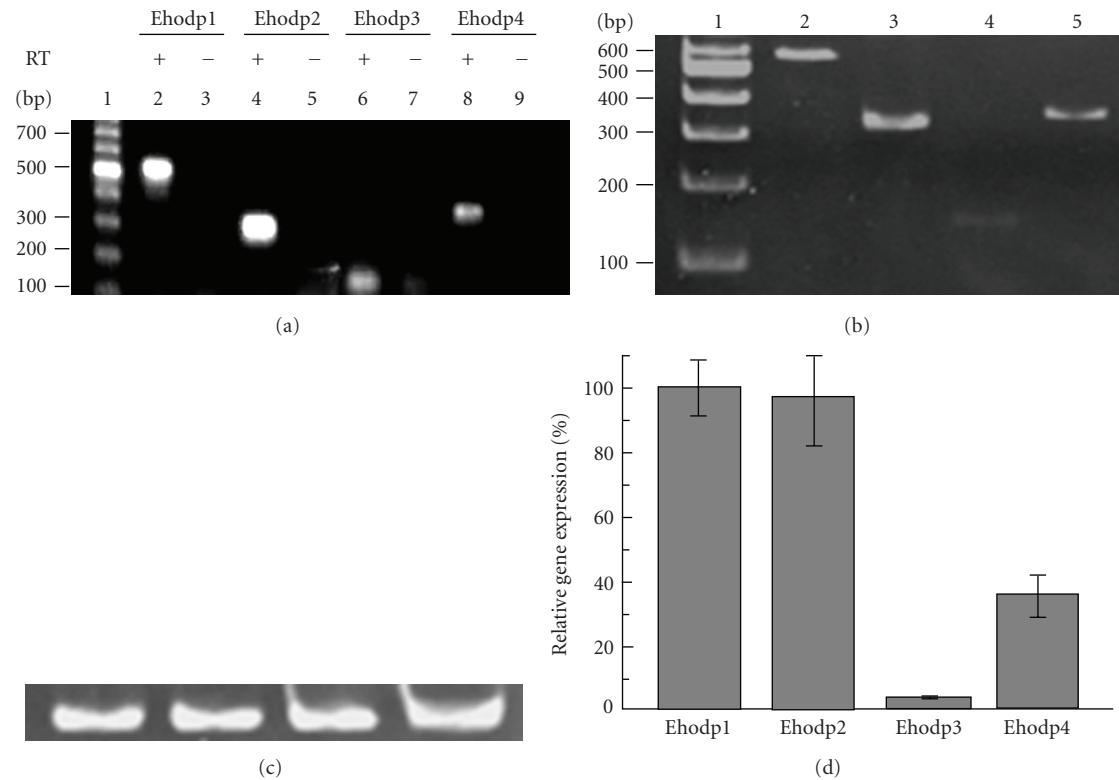


FIGURE 4: Expression analysis of the *Ehodp1*, *Ehodp2*, *Ehodp3* and *Ehodp4* genes. (a) RT-PCR products separated by 6% PAGE and ethidium bromide stained. Lane 1, DNA molecular markers (100 bp ladder); lanes 2, 4, 6, 8, amplified 524, 317, 149, and 376 bp DNA fragments (+) corresponding to *Ehodp1*, *Ehodp2*, *Ehodp3* and *Ehodp4* genes, respectively; lanes 3, 5, 7, 9, are the corresponding negative controls (–) for each gene in which no RT was included. (b) Semiquantitative RT-PCR. Gene products were analyzed by 6% PAGE and gels were ethidium bromide stained. Lane 1, size DNA molecular markers; lane 2, amplified 524 bp DNA fragment from *Ehodp1*; lane 3, amplified 317 bp DNA fragment from *Ehodp2*; lane 4, amplified 149 bp DNA fragment from *Ehodp3*; lane 5, amplified 376 bp DNA fragment from *Ehodp4*. (c) RT-PCR amplification product (222 bp) for actin gene used as control. (d) Densitometry analysis of the *Ehodp* gene expression shown in (b). Expression of *Ehodp1* measured in pixels was considered as 100%. Data is the average of three experiments.

3.6. Immunodetection of EhODP1 in Trophozoite Total Extracts and in EhkO-Enriched Fractions. To search for the presence of EhODPs in EhkOs, we purified these organelles (Figure 7(a)) as described in Materials and Methods [23] and carried out Western blots with rat anti-EhODP1 polyclonal antibodies. As a control, we used trophozoite total extracts obtained at the same time and similar conditions than EhkOs and kept at -20°C during the EhkOs purification process [23] and fresh prepared trophozoite total extracts. In all samples we used the proteinase inhibitor cocktail [23]. The antibodies recognized a 150 kDa band surrounded by a fuzzy region (Figure 7, line 2) only in fresh trophozoite extracts. In frozen trophozoite extracts they immunodetected two bands of 105 and 70 kDa, and in the EhkO-enriched fraction antibodies only detected the 70 kDa band. No signal was obtained in total protein extracts when preimmune serum was used as a negative control (Figure 7(b), lane 5). Theoretical molecular weight of EhODP1 is 135.5 kDa. However, we observed a 150 kDa band. This difference in the molecular weight may be due to the presence of acidic residues in the protein [30], although posttranslational modifications cannot be disregarded. On the other hand, the 105 and

70 kDa bands that appeared in gels could be degradation products of the EhODP1 polypeptide. Hübscher et al. [31] reported that prokaryotic and eukaryotic replicative DNA polymerases are extremely sensitive to proteolytic cleavage, even in the presence of protease inhibitors. They detected major polymerase activity in the 110, 74 and 35 kDa polypeptides in extracts of calf thymus, human fibroblasts and HeLa cells, while in *Ustilago maydis*, *Drosophila melanogaster* and *E. coli* extracts they detected major activity in 110 and 74 kDa bands. These authors suggested that the remarkable similarity in sizes and numbers of polypeptides generated by storage of extracts may result from the conservation of localized amino acid sequences or polypeptide conformations that are particularly susceptible to proteolytic cleavage, generating active fragments of defined sizes. Spanos et al. [32] found a 109 kDa band corresponding to active DNA polymerase in freshly prepared homogeneous *E. coli* DNA polymerase I, but when they kept this preparation at -20°C , they also found the 76 and 72 kDa bands. In addition, they observed complete conversion of 109 kDa polypeptide to 76 and 72 kDa bands on prolonged storage at -20°C . Therefore, it could be possible that the 105 kDa polypeptide detected

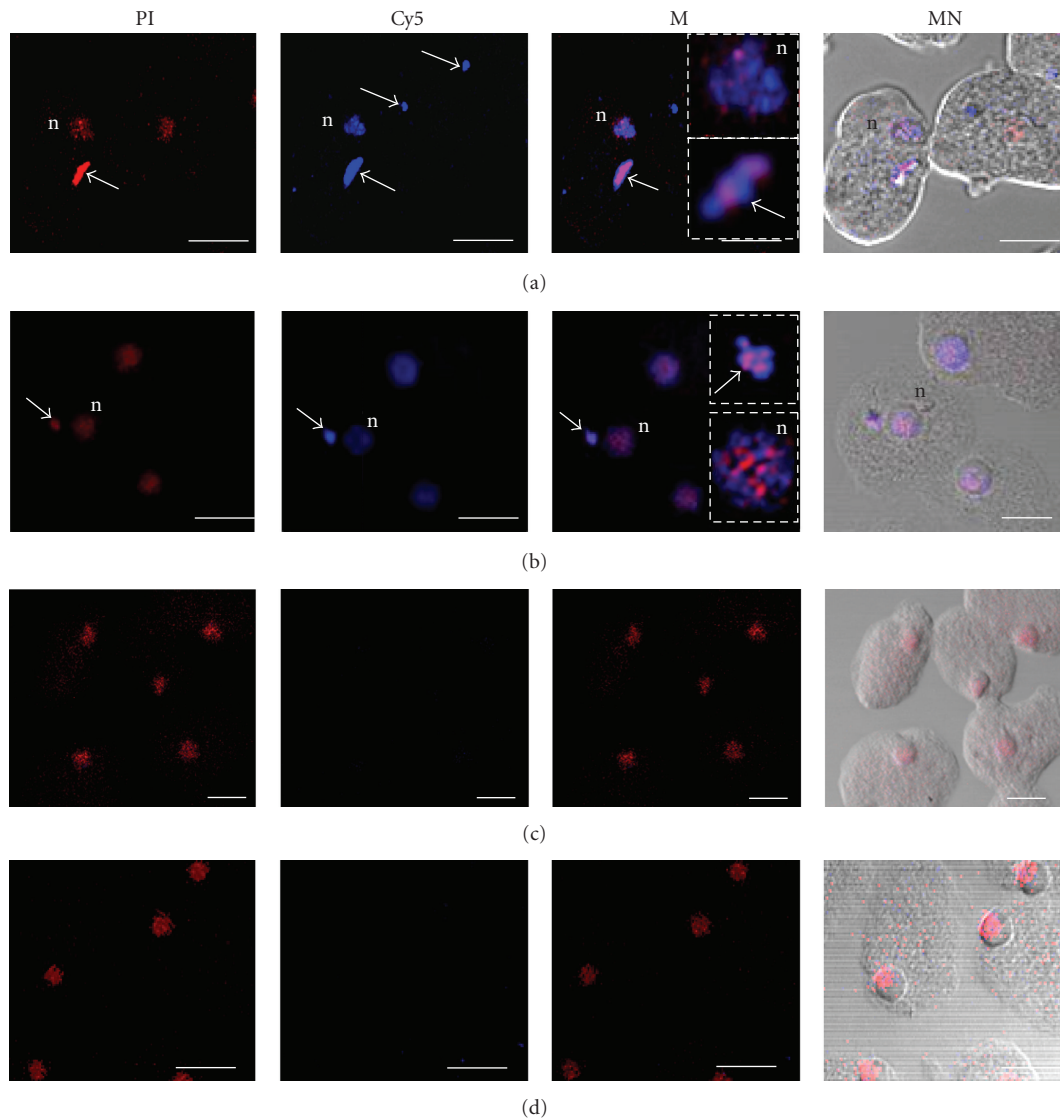


FIGURE 5: *Ehodp1* gene localization in nuclei and cytoplasmic DNA-containing structures by in situ PCR. Trophozoites of *E. histolytica* clone A were fixed, permeabilized and used to amplify a specific DNA fragment of the *Ehodp1* gene by IS-PCR using Cy5-dCTP. Then, cells were RNase-treated and stained with PI and observed through a laser confocal microscope. (a)–(b) Amplification of *Ehodp1* by IS-PCR. (c) Negative control of IS-PCR carried out without *Taq* DNA polymerase. (d) Negative control of IS-PCR performed without *Ehodp1* specific oligonucleotides. (PI) Cells stained with propidium iodide (red channel). (Cy5) *Ehodp1* amplification products labeled with Cy5-dCTP (blue channel). (M) Merging of red and blue fluorescent signals. Squares show an image amplification of a nucleus and a cytoplasmic DNA-containing structure. (MN) Merging of fluorescent signals superimposed on the corresponding cellular images obtained by Nomarsky microscopy. Nucleus (n). Arrows indicate cytoplasmic DNA-containing structures. Bar scale corresponds to 8 μ m

in frozen trophozoite extracts, had not been detected in the EhkO-enriched fraction as a result of an increase in the proteolytic degradation due to the preparations conditions and storage of the EhkO-enriched fraction.

3.7. Cellular Location of EhODP1 in Cytoplasmic DNA-Containing Structures of Fixed Trophozoites. We carried out the immunodetection of EhODP1 in fixed and permeabilized trophozoites, using the anti-rEhODP1-168 antibodies. Fixed trophozoites were contrasted with PI to stain

DNA-containing structures. Through confocal microscope, nuclei and cytoplasmic DNA-containing structures appeared stained by PI (Figure 8). Interestingly, the anti-rEhODP1-168 antibodies reacted with structures of 4 μ m, but they did not stain nuclei (Figure 8(a)), giving support to the assumption that EhODP1 protein is located in DNA-containing structures that probably correspond to EhkOs. Merging images confirmed the colocalization of both red and green fluorescent signals in these structures but not in nuclei. As negative controls, we used preimmune serum (Figure 8(b)) or we omitted the first antibody (data not

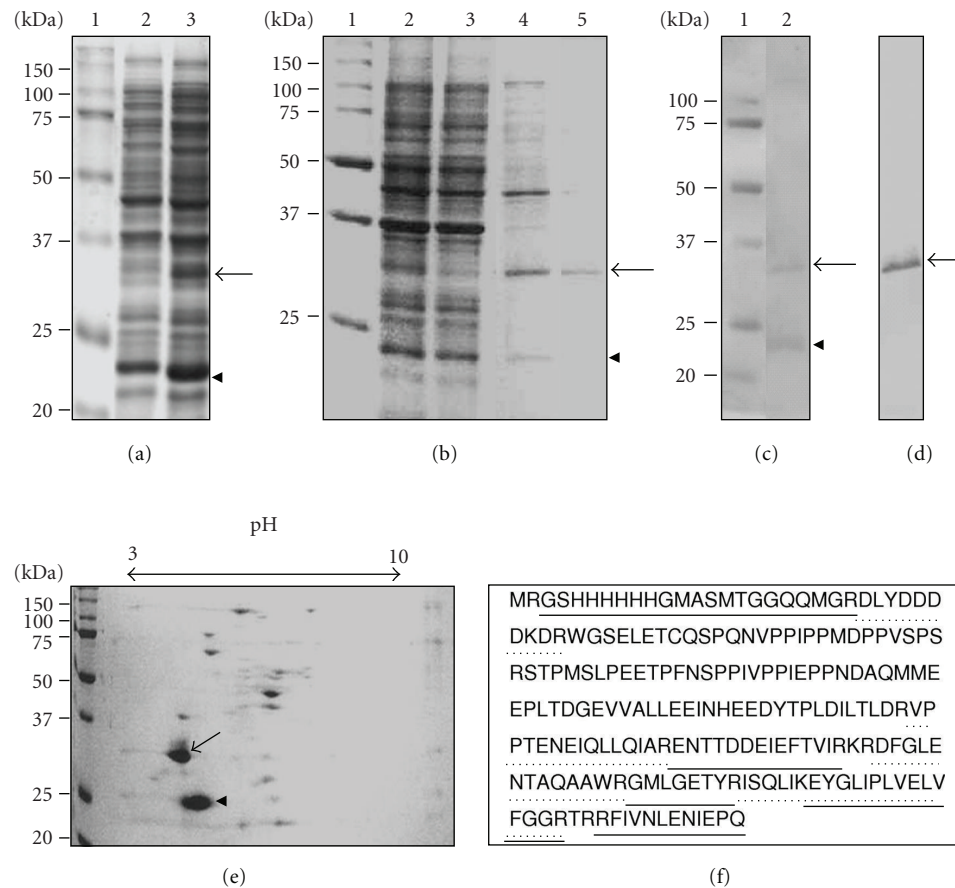


FIGURE 6: Expression and identification of rEhODP1-168 polypeptide. (a) rEhODP1-168 polypeptide production was 1 mM IPTG induced in bacteria, and proteins were separated by 15% SDS-PAGE. Gel was Coomassie Brilliant Blue stained. Lane 1, protein molecular weight markers. Lane 2, uninduced bacteria. Lane 3, induced bacteria. (b) The induced recombinant protein was purified by IMAC using denaturing conditions. Fractions were analyzed by 15% SDS-PAGE and the gel was Coomassie Blue stained. Lane 1, protein molecular weight standards. Lane 2, total extract from IPTG-induced bacteria before the affinity chromatography. Lane 3, unbound proteins to the Ni^{2+} -NTA-agarose column. Lane 4, proteins eluted with buffer D. Lane 5, proteins eluted with buffer E (see Materials and Methods). (c) Purified proteins were separated by 15% SDS-PAGE, transferred to a nitrocellulose membrane and stained with Ponceau Red. Lane 1, prestained protein molecular weight markers. Lane 2, proteins in fraction D. (d) Western blot of proteins shown in lane 2 in (c), immunodetected with monoclonal anti-6His tag antibodies. (e) 2D gel electrophoresis of proteins eluted in fraction D from the Ni^{2+} -NTA-agarose column. Proteins were stained with Coomassie Brilliant Blue. (f) Amino acid sequence of the expected rEhODP1-168 that corresponds to the spot shown in (e) (arrow). Underlined are the peptides identified by MALDI-TOF mass spectrometry. Arrows indicate the expected rEhODP1-168 polypeptide. Arrowheads show an induced polypeptide that was copurified with rEhODP1-168.

shown). In both cases, red fluorescence was evident but no green fluorescent signals were obtained. Cellular integrity was verified through Nomarsky microscopy.

4. Discussion

In this work we report the existence of four genes (*Ehodp1*, *Ehodp2*, *Ehodp3*, and *Ehodp4*) encoding DNA polymerases in *E. histolytica*. Proteins encoded by these genes have the pol_B.2 domain characteristic of organellar and viral DNA polymerases, which includes the 3'-5' exonuclease II domain and the conserved boxes I, II and III, that characterize them as members of family B (Figures 1–3). In addition, these polymerases have two non previously

described novel boxes, named here A and B that are shared by DNA polymerases of *T. vaginalis* and by those encoded by fungi mitochondrial plasmids (Figures 1–3). It is known that some DNA polymerase encoding plasmids can integrate into mitochondrial DNA as a consequence of DNA rearrangements produced in the mitochondrial genome. Interestingly, different phenotypes have been observed in some fungi such as senescence in *Neurospora* [33, 34] or an increase in longevity in *P. anserina* [35, 36] that contain this type of plasmids. Additionally, it is known that the DNA polymerase encoded in *K. lactis* pGKL-2 plasmid is involved in the integrity and maintenance of this plasmid [37].

The presence of several genes encoding organellar DNA polymerases of the family B has also been reported in the

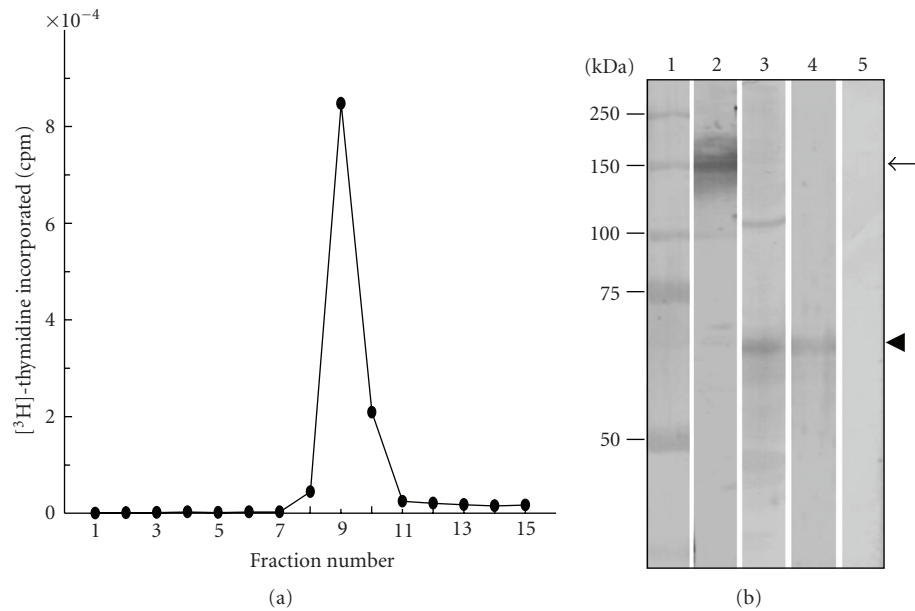


FIGURE 7: EhODP1 was localized in an EhkO-enriched fraction. (a) EhkOs were purified by differential centrifugation and through a Nycodenz discontinuous gradient from exponentially growing trophozoites labeled with $[^3\text{H}]$ -Thymidine. Then, fractions were collected and their radioactivity content was measured. Data in graph represents total radioactivity incorporated in DNA within each fraction. (b) Western blot of proteins separated by 10% SDS-PAGE using rat anti-rEhODP1 antibodies. Lane 1, prestained molecular weight standards; lane 2, fresh total trophozoite extracts; lane 3, frozen total trophozoite extracts; lane 4, EhkOs-enriched fraction corresponding to fraction 9 in (a); lane 5, preimmune serum used with fresh total trophozoite extracts. Arrow indicates the 150 kDa polypeptide. Arrowhead shows the 70 kDa band.

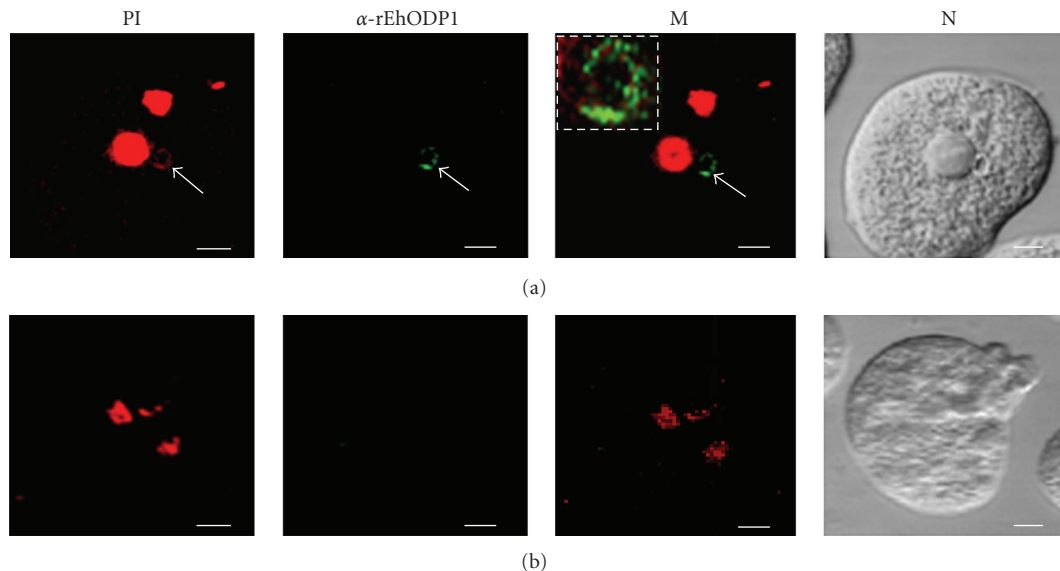


FIGURE 8: Subcellular localization of EhODP1 in EhkOs using anti-rEhODP1-168 antibodies and laser confocal microscopy. Fixed and permeabilized *E. histolytica* trophozoites were incubated with anti-rEhODP1-168 antibodies and fluorescein-labeled goat anti-rat antibodies, stained with PI and observed through a laser confocal microscope. (a) Immunolocalization of EhODP1 in EhkOs. (b) Negative control performed with preimmune serum. (PI) Cells stained with propidium iodide (red channel). (α -rEhODP1) EhODP1 protein immunolocalized in EhkOs with anti-rEhODP1-168 antibodies (green channel). (M) Merging of red and green fluorescent signals. Arrows indicate EhkOs. Squares show an image amplification of a cytoplasmic DNA-containing structure. The bar scale corresponds to 8 μm .

genomes of other organisms. *Agrocybe aegerita* has two pol B sequences, the *Aa-polB* gene that is potentially functional and a disrupted *Aa-polB P1* gene. *A. chaxingu* has two pol B sequences that contain disrupted ORFs, which could encode nonfunctional enzymes [38]. ORFs encoded by *Ehodp* genes in *E. histolytica* conserve the catalytic domains, suggesting that they are functional. By RT-PCR we found that all four *Ehodp* genes were transcriptionally active and showed different expression levels in asynchronous cultures (Figure 4).

In situ PCR experiments showed that *Ehodp1* gene was located both in the nuclei and cytoplasmic structures that could be either EhkOs or cryptons. The finding of *Ehodp1* gene both in the nucleus and these cytoplasmic structures (Figure 5) suggests a possible interaction between them as suggested by Solis et al. [20]. Furthermore, EhkOs have the nuclear transcription factors EhTBP [39], EhP53 [40], and EhCBP [41], and the *Ehtbp* gene was also found in the nucleus and EhkOs [39] as we determined for *Ehodp1* gene in the present work.

The genes encoding organellar or viral DNA polymerases have also been found in transposable elements named Mavericks [42]. Mavericks have an average size of 15–20 kb and are present in eukaryotic genomes including the *T. vaginalis* genome [42]. When we aligned the protein sequence of EhODP1 with the amino acid sequence of the DNA polymerase encoded in the *T. vaginalis* *Mav-Tv1.1* Maverick element, we found that they have 29% identity and 36% similarity (data not shown). However, there are no reports about the presence of Maverick-like elements in *E. histolytica*, although its genome is rich in transposable elements (nonLong Terminal Repeats) of LINES and SINES classes [43]. Further studies will define whether *E. histolytica* has or has not Mavericks.

Additionally, our immunolocalization experiments detected EhODP1 polypeptide in fixed trophozoites. EhODP1 protein was located in cytoplasmic DNA-containing structures but not in nuclei, and in an EhkO-enriched fraction, that was not tested for the presence of crypton organelles. For this reason we cannot discard cross-contamination between both DNA-containing organelles. Its presence in these organelles and the conservation of the DNA polymerase catalytic domain in the protein, suggest that EhODP1 could be involved in their DNA replication. We want to note here that due to the similarity in amino acid sequences between EhODP1 and EhODP4 (Figure 3), the anti-rEhODP1-168 antibodies could also recognize the *Ehodp4* gene product, which was annotated in the *E. histolytica* genome database while performing the present work. However, we decided to include EhODP4 here to have a broad panorama of the *E. histolytica* family B DNA polymerases related to mitochondrial plasmids.

5. Conclusions

We reported here the presence of a family of four active *Ehodp* genes in the *E. histolytica* genome, encoding putative organellar DNA polymerases of family B. EhODP1,

EhODP2, EhODP3, and EhODP4 conserve the 3'-5' exonuclease II and 5'-3' polymerization domains and show high similarity to DNA polymerases present in fungi mitochondrial plasmids. EhODP1 protein was detected in EhkOs suggesting that it could be involved in EhkO DNA replication. Interestingly, the *Ehodp1* gene was located in nuclei and cytoplasmic DNA-containing structures, indicating a close relationship between these organelles.

Acknowledgments

We thank CONACyT from Mexico for the financial support to this project. We also thank Blanca Estela Reyes Marquez for technical support in the confocal microscopy analysis.

References

- [1] C. J. Kucik, G. L. Martin, and B. V. Sortor, "Common intestinal parasites," *American Family Physician*, vol. 69, no. 5, pp. 1161–1168, 2004.
- [2] A. Makioka, S. Kobayashi, and T. Takeuchi, "Detection and characterization of DNA polymerase activity in *Entamoeba histolytica*," *Parasitology Research*, vol. 82, no. 1, pp. 87–89, 1996.
- [3] A. Makioka, H. Ohtomo, S. Kobayashi, and T. Takeuchi, "Effects of aphidicolin on *Entamoeba histolytica* growth and DNA synthesis," *Tokai Journal of Experimental and Clinical Medicine*, vol. 23, no. 6, pp. 417–422, 1998.
- [4] S. Das and A. Lohia, "MCM proteins of *Entamoeba histolytica*," *Archives of Medical Research*, vol. 31, no. 4, supplement 1, pp. S269–S270, 2000.
- [5] S. Das, C. Mukherjee, P. Sinha, and A. Lohia, "Constitutive association of Mcm2-3-5 proteins with chromatin in *Entamoeba histolytica*," *Cellular Microbiology*, vol. 7, no. 2, pp. 259–267, 2005.
- [6] B. Loftus, I. Anderson, R. Davies, et al., "The genome of the protist parasite *Entamoeba histolytica*," *Nature*, vol. 433, no. 7028, pp. 865–868, 2005.
- [7] B. Grabowski and Z. Kelman, "Archaeal DNA replication: eukaryal proteins in a bacterial context," *Annual Review of Microbiology*, vol. 57, pp. 487–516, 2003.
- [8] P. V. Schervakova and T. A. Kunkel, "DNA polymerases and the fidelity of DNA replication," in *DNA Replication and Human Disease*, M. L. DePamphilis, Ed., pp. 391–409, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, USA, 2006.
- [9] Y. Ono, A. Sakai, K. Takechi, S. Takio, M. Takusagawa, and H. Takano, "NtPolI-like1 and NtPolI-like2, bacterial DNA polymerase I homologs isolated from BY-2 cultured tobacco cells, encode DNA polymerases engaged in DNA replication in both plastids and mitochondria," *Plant and Cell Physiology*, vol. 48, no. 12, pp. 1679–1692, 2007.
- [10] M. M. Albà, "Replicative DNA polymerases," *Genome Biology*, vol. 2, no. 1, pp. 3002.1–3002.4, 2001.
- [11] A. J. F. Griffiths, "Natural plasmids of filamentous fungi," *Microbiological Reviews*, vol. 59, no. 4, pp. 673–685, 1995.
- [12] F. Meinhardt, F. Kempken, J. Kamper, and K. Esser, "Linear plasmids among eukaryotes: fundamentals and application," *Current Genetics*, vol. 17, no. 2, pp. 89–95, 1990.
- [13] M. Salas, "Protein-priming of DNA replication," *Annual Review of Biochemistry*, vol. 60, pp. 39–71, 1991.

- [14] C. G. Clark and A. J. Roger, "Direct evidence for secondary loss of mitochondria in *Entamoeba histolytica*," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 92, no. 14, pp. 6518–6521, 1995.
- [15] J. Tovar, A. Fischer, and C. G. Clark, "The mitosome, a novel organelle related to mitochondria in the amitochondrial parasite *Entamoeba histolytica*," *Molecular Microbiology*, vol. 32, no. 5, pp. 1013–1021, 1999.
- [16] G. Leon-Avila and J. Tovar, "Mitosomes of *Entamoeba histolytica* are abundant mitochondrion-related remnant organelles that lack a detectable organellar genome," *Microbiology*, vol. 150, part 5, pp. 1245–1250, 2004.
- [17] Z. Mai, S. Ghosh, M. Frisardi, B. Rosenthal, R. Rogers, and J. Samuelson, "Hsp60 is targeted to a cryptic mitochondrion-derived organelle ("crypton") in the microaerophilic protozoan parasite *Entamoeba histolytica*," *Molecular and Cellular Biology*, vol. 19, no. 3, pp. 2198–2205, 1999.
- [18] S. Ghosh, J. Field, R. Rogers, M. Hickman, and J. Samuelson, "The *Entamoeba histolytica* mitochondrion-derived organelle (crypton) contains double-stranded DNA and appears to be bound by a double membrane," *Infection and Immunity*, vol. 68, no. 7, pp. 4319–4322, 2000.
- [19] E. Orozco, R. Gharaibeh, A. M. Riveron, et al., "A novel cytoplasmic structure containing DNA networks in *Entamoeba histolytica* trophozoites," *Molecular and General Genetics*, vol. 254, no. 3, pp. 250–257, 1997.
- [20] F. Solis, E. Orozco, L. Cordova, et al., "*Entamoeba histolytica*: DNA carrier vesicles in nuclei and kinetoplast-like organelles (EhkOs)," *Molecular Genetics and Genomics*, vol. 267, no. 5, pp. 622–628, 2002.
- [21] M. A. Rodriguez, R. M. Garcia-Perez, L. Mendoza, T. Sanchez, N. Guillen, and E. Orozco, "The pyruvate:ferredoxin oxidoreductase enzyme is located in the plasma membrane and in a cytoplasmic structure in *Entamoeba*," *Microbial Pathogenesis*, vol. 25, no. 1, pp. 1–10, 1998.
- [22] L. S. Diamond, D. R. Harlow, and C. C. Cunnick, "A new medium for the axenic cultivation of *Entamoeba histolytica* and other *Entamoeba*," *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, vol. 72, no. 4, pp. 431–432, 1978.
- [23] J. P. Luna-Arias, T. Sanchez, M. E. Herrera-Aguirre, P. Chavez, E. Garrido, and E. Orozco, "Purification of *Entamoeba histolytica* DNA containing organelles (EhkOs): a further characterization," *Journal of Eukaryotic Microbiology*, vol. 50, supplement, pp. 706–708, 2003.
- [24] F. M. Ausubel, R. Brent, R. E. Kingston, et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, New York, NY, USA, 1994.
- [25] E. Harlow and D. Lane, *Antibodies. A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, USA, 1988.
- [26] W. Yuewang, X. Yang, and A. J. F. Griffiths, "Structure of a *Gelasinospora* linear plasmid closely related to the kalilo plasmid of *Neurospora intermedia*," *Current Genetics*, vol. 29, no. 2, pp. 150–158, 1996.
- [27] T. S.-F. Wang, S. W. Wong, and D. Korn, "Human DNA polymerase α : predicted functional domains and relationships with viral DNA polymerases," *FASEB Journal*, vol. 3, no. 1, pp. 14–21, 1989.
- [28] T. A. Steitz, "A mechanism for all polymerases," *Nature*, vol. 391, no. 6664, pp. 231–232, 1998.
- [29] R. Eisenbrandt, J. M. Lázaro, M. Salas, and M. de Vega, " ϕ 29 DNA polymerase residues Tyr59, His61 and Phe69 of the highly conserved Exoll motif are essential for interaction with the terminal protein," *Nucleic Acids Research*, vol. 30, no. 6, pp. 1379–1386, 2002.
- [30] P. Graceffa, A. Jancso, and K. Mabuchi, "Modification of acidic residues normalizes sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis of caldesmon and other proteins that migrate anomalously," *Archives of Biochemistry and Biophysics*, vol. 297, no. 1, pp. 46–51, 1992.
- [31] U. Hübscher, A. Spanos, W. Albert, F. Grumm, and G. R. Banks, "Evidence that a high molecular weight replicative DNA polymerase is conserved during evolution," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 78, no. 11, pp. 6771–6775, 1981.
- [32] A. Spanos, S. G. Sedgwick, G. T. Yarranton, U. Hübscher, and G. R. Banks, "Detection of the catalytic activities of DNA polymerases and their associated exonucleases following SDS-polyacrylamide gel electrophoresis," *Nucleic Acids Research*, vol. 9, no. 8, pp. 1825–1839, 1981.
- [33] H. Bertrand, A. J. F. Griffiths, D. A. Court, and C. K. Cheng, "An extrachromosomal plasmid is the etiological precursor of kalDNA insertion sequences in the mitochondrial chromosome of senescent *Neurospora*," *Cell*, vol. 47, no. 5, pp. 829–837, 1986.
- [34] A. J. F. Griffiths, "Fungal senescence," *Annual Review of Genetics*, vol. 26, pp. 351–372, 1992.
- [35] J. Hermanns, A. Asseburg, and H. D. Osiewacz, "Evidence for a life span-prolonging effect of a linear plasmid in a longevity mutant of *Podospora anserina*," *Molecular and General Genetics*, vol. 243, no. 3, pp. 297–307, 1994.
- [36] J. Hermanns and H. D. Osiewacz, "Induction of longevity by cytoplasmic transfer of a linear plasmid in *Podospora anserina*," *Current Genetics*, vol. 29, no. 3, pp. 250–256, 1996.
- [37] R. Schaffrath, S. M. Soond, and P. A. Meacock, "The DNA and RNA polymerase genes of yeast plasmid pGKL2 are essential loci for plasmid integrity and maintenance," *Microbiology*, vol. 141, part 10, pp. 2591–2599, 1995.
- [38] B. Mouhamadou, G. Barroso, and J. Labarere, "Molecular evolution of a mitochondrial polB gene, encoding a family B DNA polymerase, towards the elimination from *Agrocybe* mitochondrial genomes," *Molecular Genetics and Genomics*, vol. 272, no. 3, pp. 257–263, 2004.
- [39] J. P. Luna-Arias, R. Hernandez-Rivas, G. de Dios-Bravo, J. Garcia, L. Mendoza, and E. Orozco, "The TATA-box binding protein of *Entamoeba histolytica*: cloning of the gene and location of the protein by immunofluorescence and confocal microscopy," *Microbiology*, vol. 145, part 1, pp. 33–40, 1999.
- [40] L. Mendoza, E. Orozco, M. A. Rodriguez, et al., "Ehp53, an *Entamoeba histolytica* protein, ancestor of the mammalian tumour suppressor p53," *Microbiology*, vol. 149, part 4, pp. 885–893, 2003.
- [41] L. A. Marchat, C. Gómez, D. G. Perez, F. Paz, L. Mendoza, and E. Orozco, "Two CCAAT/enhancer binding protein sites are cis-activator elements of the *Entamoeba histolytica* EhPgp1 (mdr-like) gene expression," *Cellular Microbiology*, vol. 4, no. 11, pp. 725–737, 2002.
- [42] E. J. Pritham, T. Putliwala, and C. Feschotte, "Mavericks, a novel class of giant transposable elements widespread in eukaryotes and related to DNA viruses," *Gene*, vol. 390, no. 1–2, pp. 3–17, 2007.
- [43] A. A. Bakre, K. Rawal, R. Ramaswamy, A. Bhattacharya, and S. Bhattacharya, "The LINEs and SINEs of *Entamoeba histolytica*: comparative analysis and genomic distribution," *Experimental Parasitology*, vol. 110, no. 3, pp. 207–213, 2005.