

UACM

Universidad Autónoma
de la Ciudad de México

Nada humano me es ajeno

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE LA CIUDAD DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS GENÓMICAS

**ANÁLISIS FUNCIONAL DE LA SECUENCIA TATCCA
COMO ELEMENTO DE REGULACION
TRANSCRIPCIONAL EN EL PROMOTOR DEL GEN
*HSP100 DE Entamoeba histolytica.***

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRA EN CIENCIAS GENÓMICAS

P R E S E N T A

Q.B.P. AZUCENA OCAMPO BARCENAS

DIRECTORA DE TESIS

DRA. ELISA IRENE AZUARA LICEAGA

MÉXICO, D.F.

ENERO 2011

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 TUTORAL

DIRECTORA

Dra. Elisa Irene Azuara Liceaga

Profesora Investigadora. Posgrado en Ciencias Genómicas.

Universidad Autónoma de la Ciudad de México

ASESORES y LECTORES

Dra. Miriam Huerta Pérez.

Investigadora. Departamento de Genética y Biología Molecular.
Cinvestav-IPN

Dr. Mario Cesar López Camarillo

Profesor Investigador. Posgrado en Ciencias Genómicas
Universidad Autónoma de la Ciudad de México

Dra. Mavil López Casamichana

Profesora Investigadora. Posgrado en Ciencias Genómicas
Universidad Autónoma de la Ciudad de México

Dr. Israel López Reyes

Subdirector de Virología del Centro
de Diagnóstico y Vigilancia Epidemiológica

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

El presente trabajo se realizó en el laboratorio 2 del Posgrado en Ciencias Genómicas de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México bajo la dirección de la Dra. Elisa Irene Azuara Liceaga así como en el laboratorio de la Dra. Esther Orozco del Departamento de Infectómica y Patogénesis del Cinvestav IPN.

Esta tesis se llevó a cabo gracias al financiamiento por parte de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México (UACM), el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT, CB-2007-79293) y al programa "Creación Joven" a través del instituto de Ciencia y Tecnología del Distrito Federal (ICyTDF).

Agradecimientos

A Dios por haberme permitido cumplir una promesa y por darme la fuerza para continuar con mis metas a pesar de los contratiempos.

A mi madre por todo el apoyo incondicional, nunca terminare de agradecerte todo lo que has hecho por mí. Gracias por estar conmigo cuando más te necesito.

A mi Padre promesa cumplida, me tarde un poco pero lo logre.

A mis hermanos: Dalia, Ángel, Tomas y Sergio quienes son parte importante en mi familia.

A Memo, gracias por todo.

Gracias a mis amigos uacemitas: Itzel, Olguita, Fer, Payan, Crishtian, Miguel, Marco y Helios realmente me hicieron amena mi estancia a en el posgrado.

Gracias a mis Amigas Yevel y Bere.

A Miriam, gracias por tu valiosa ayuda.

Índice

Lista de Abreviaturas	i
Lista de Figuras	iv
Lista de Tablas	vi
Resumen	vii
1. Introducción	1
1.1. Antecedentes generales del tema	1
1.1.1. Ciclo de vida	4
1.1.2 Regulación de la expresión genica en <i>Entamoeba histolytica</i>	5
1.1.3. Transcripción en <i>Entamoeba histolytica</i>	9
1.1.4. Factores de transcripción en <i>Entamoeba histolytica</i>	11
1.1.5. Factores de transcripción con dominio de unión a DNA MYB.. ...	15
1.2. Estado del arte	22
1.3. Antecedentes particulares del tema	26
2. Justificación	29
3. Hipotesis	30
4. Objetivos	31
5. Diagrama de trabajo	32
6. Estrategia experimental	33
6.1. Cultivos de trofozoítos de <i>E. histolytica</i>	33
6.2. Ensayo de interacción ADN-proteína	33
6.2.1. Marcaje de los oligonucleótidos	34
6.2.2. Extractos nucleares	35

6.2.3. Ensayo de EMSA.....	35
6.3. Implementación de un sistema de genes reporteros para evaluar funcionalmente la secuencia TATCCA en <i>E. histolytica</i>	36
6.3.1. Obtención de los plásmidos pGL3-basic y pRL-null.....	36
6.3.2. Clonación del 3´UTR del gen de <i>actina</i> de <i>E. histolytica</i> en los plasmidos pGL3-basic y pRL-null	36
6.3.3. Reacción de PCR para amplificar la región 3´del gen de <i>actina</i> ..	37
6.3.4. Obtención de los fragmentos del promotor del gen <i>Ehadh112</i> ...	38
6.3.5. Clonación de los fragmentos del promotor del gen <i>Ehadh112</i> de <i>E. histolytica</i>	38
6.3.6. Preparación de células competentes de <i>E.coli</i> DH5α	38
6.3.7. Transformación de células competentes de <i>E.coli</i> DH5α.....	39
6.3.8. Obtención del DNA plasmídico para análisis de las clonas positivas.....	39
6.3.9. Reacción de secuenciación de las construcciones plasmídicas ..	40
6.4. Evaluación de la funcionalidad de la secuencia TATCCA en <i>E. histolytica</i>	41
6.4.1. Obtención de ADN genómico para amplificar el promotor del gen <i>HSP100</i>	41
6.4.2. Obtención de las construcciones que contienen al promotor del gen <i>HSP100</i>	41
6.4.3. Obtención de los plasmidos para transfección	42
6.5. Realización de ensayos funcionales para evaluar la actividad de los promotores.....	42
6.5.1. Transfección por electroporación.....	42
6.5.2. Transfección por lipofección	43
6.6. Ensayo de luciferasa.....	43
6.6.1. Preparación de lisado celular.....	43
6.6.2. Medición de luciferasa	44
6.7. Detección del transcrito del gen de <i>luciferasa</i>	44

6.7.1. Reacción de retrotranscripción	44
6.7.2. Extracción y cuantificación de RNA total	44
6.7.3. Síntesis de la cadena complementaria de DNA (cDNA)	45
6.8. Inmunodetección	46
7. Resultados	47
7.1. Analizar si la secuencia TATCCA es reconocida por proteínas nucleares obtenidas de trofozoítos de <i>Entamoeba histolytica</i>	47
7.2. Evaluación de la funcionalidad de la secuencia TATCCA en la actividad del promotor del gen <i>HSP100</i> de <i>E. histolytica</i>	54
8. Discusión	79
9. Conclusiones	85
10. Referencias	86

Lista de Abreviaturas

α Amy	Gen de la alfa amilasa
ARN	Ácido ribonucleico
ATP	Adenosina trifosfato
cDNA	DNA complementario
CAT	Gen de la Cloranfenicol acetil transferasa
c-Myb	Contraparte celular del gen del virus de la mieloblastosis
dATP	Desoxiadenosina trifosfato
DNA	Ácido Desoxiribonucleico
dNTPs	Desoxinucleótidos trifosfatados
DEPC	Diethyl-pyrocarbonate
DTT	Ditiotreitol
<i>Ehadh112</i>	Gen de la adhesina de <i>E.histolytica</i>
EhADH/CP112	Complejo Adhesina Cistein proteasa de 112 kDa
EDTA	Ácido etilen-diamino-tetra-acético
EGTA	Ácido etilen-glicol-bis-(beta-aminoetil-eter)N,N,N,N-tetra-acético
EMSA	Ensayo del cambio de la movilidad electroforética
EhMyb	Proteína de <i>Entamoeba histolytica</i> con dominio de unión a DNA Myb
EhMybS3r	Proteína recombinante Myb SHAQKYF3 de <i>Entamoeba histolytica</i>
EhMyb10	Proteína de <i>E. histolytica</i> con dominio de unión a DNA Myb 10
EhMyb10r	Proteína recombinante EhMyb10
ERM	Elemento de reconocimiento a Myb
Gal/GalNac	N-acetilgalactosamina
GFP	Proteína verde fluoerescente
GST	Proteína recombinante Glutación S-transferasa

HEPES	Ácido N-2-hidroxietil-piperazina-N-etanosulfónico
hrs	Horas
HSP100	Proteína de choque térmico 100
Inr	Elemento iniciador
kDa	Kilodaltones
µg	Microgramos
µl	Microlitros
Mim-1	Elemento de reconocimiento a Myb del promotor del gen que codifica para la proteína mieloide 1 inducida por Myb
Mim-M	Elemento de reconocimiento a Myb del promotor del gen que codifica para la proteína mieloide 1 inducida por Myb mutado.
min	Minutos
ml	Mililitro
µg	Microgramo
mg	Miligramo
mM	Milimolar
MRE	Elemento de reconocimiento a Myb
mRNA	Ácido Ribonucleico mensajero
ng	Nanogramos
NP-40	Nonidet-40
nt	nucleótido
Osmyb	Proteína Myb de <i>Oriza sativa</i>
pb	pares de bases
PBS	Amortiguador de fosfatos salino
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PEG-NaCl	Polietilenglicol-Cloruro de sodio
pH	Potencial de Hidrógeno
polydI-dC	Poli-desoxinosina-desocitidina
PM	Peso molecular

RNA	Ácido Ribonucleico
rpm	Revoluciones por minuto
R1, R2 y R3	Repetidos 1,2 y 3
RT-PCR	Retrotranscripción acoplada a la reacción en cadena de la polimerasa
RT	Control negativo de retrotranscripción
SDS PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida desnaturizante
SREHP	Proteínas ricas en serinas y prolina
SRS	Secuencias de respuesta a glucosa
TBP	Proteína de unión a la caja TATA
TBS	Solución amortiguadora Tris salina
TFIID	Factor general de transcripción de la RNA polimerasa II
TS	Solución Tris HCl-Sacarosa
URE	Elemento río arriba
URL	Unidades Relativas de Luciferasa
UTR	Región no traducida
V	Volts

Índice de Figuras

Figura 1. Proteínas que participan en el proceso de patogenicidad de <i>Entamoeba histolytica</i>	3
Figura 2. Ciclo de Vida.....	4
Figura 3. Esquema de la región 5'UTR río arriba del ATG de diferentes promotores de genes <i>E. histolytica</i>	10
Figura 4. Representación esquemática del dominio de unión a DNA de las proteínas MYB.....	16
Figura 5. Proteínas EhMyb de <i>E. histolytica</i>	20
Figura 6. Proteínas EhMybR2R3 y EhMybSHAQKYF de <i>E. histolytica</i>	21
Figura 7. Reacción de biolumiscencia catalizada por luciferasa	28
Figura 8. Vectores pGL3-3'A y pRL-null-3'A.	37
Figura 9. Ensayo de unión a DNA-proteína utilizando extractos nucleares de <i>E. histolytica</i> y como sonda a la secuencia Mim-1.	49
Figura 10. Ensayo de unión a DNA-proteína utilizando extractos nucleares de <i>E. histolytica</i> y como sonda a la secuencia TATCCA.....	51
Figura 11. Ensayo de unión a DNA utilizando extractos bacterianos que expresan a la proteína recombinante EhMyb10r (Familia EhMybR2R3) y a la proteína EhMybS3r (Familia EhMybSHAQKYF) con el oligonucleótido TATCCA.....	53
Figura 12. Clonación del fragmento de 600 pb del 3'UTR del gen de actina de <i>E. histolytica</i> en el vector pGL3-Basic	55
Figura 13. Clonación del fragmento de 600 pb del 3'UTR del gen de actina de <i>E. histolytica</i> en el vector pRL-null	56
Figura 14. Clonación del fragmento de 469 pb del promotor del gen <i>Ehadh112</i> de <i>E. histolytica</i> en el vector pGL3-3'A.	58
Figura 15. Clonación del fragmento de 150 pb del promotor del gen <i>Ehadh112</i> de <i>E. histolytica</i> en el vector pGL3-3'A	59
Figura 16. Clonación del fragmento de 150 pb del promotor del gen <i>Ehadh112</i> de <i>E. histolytica</i> en el vector pRL-null.....	60

Figura 17. Secuencia nucleotídica del promotor del gen HSP100 de <i>E. histolytica</i>	61
Figura 18. Clonación del fragmento de 285 pb del promotor del gen HSP100 de <i>E. histolytica</i> en el vector pGL3-3'A.	62
Figura 19. Clonación del fragmento de 260 pb del promotor del gen HSP100 de <i>E. histolytica</i> en el vector pGL3-3'A.	63
Figura 20. Representación esquemática de las construcciones realizadas para la implementación del sistema de vectores reporteros.	64
Figura 21. Eficiencia de transfección de <i>E. histolytica</i> utilizando al plásmido pKT-GFP5.	65
Figura 22. Eficiencia de transfección de trofozoítos de <i>E. histolytica</i> utilizando al plásmido pKT-GFP5.	66
Figura 23. Curva estándar de luciferasa recombinante.....	68
Figura 24. Cinética de expresión de la proteína luciferasa en amibas transfectadas con la construcción pTP4i.....	69
Figura 25. Detección del transcrito del gen de luciferasa en amibas transfectadas mediante electroporación con la construcciones pGL3-469-3'A y pGL3-3'A.....	71
Figura 26. Cinética de expresión de la proteína luciferasa en amibas transfectadas por lipofección con las construcciones pGL3-469-3'A y pGL3-3'A.....	73
Figura 27. Detección del transcrito del gen de <i>luciferasa</i> e inmunodetección en fase sólida de la proteína luciferasa en trofozoítos transfectadas con la construcción pGL3-469-3'A.....	75
Figura 28. Detección del transcrito del gen de luciferasa en amibas transfectadas por lipofección con las construcciones pGL3-469-3'A y pGL3-3'A.	76
Figura 29. Análisis funcional del efecto de la delección de la secuencia TATCCA en la actividad del promotor HSP100.	78

Índice de Tablas

Tabla 1. Cambios en la expresión de factores de transcripción de <i>E. histolytica</i> analizados mediante microarreglos.....	14
Tabla 2. Función de proteínas con el dominio de unión a DNA MYB en plantas	17
Tabla 3. Proteínas con dominio de unión a DNA MYB en protozoarios	18
Tabla 4. Analisis <i>in silico</i> de la secuencia de reconocimiento a Myb (MRE) canónico (TAACgG) en promotores de <i>E. histolytica</i>	23
Tabla 5. Análisis <i>in silico</i> de la secuencia TATCCA en promotores de <i>E. histolytica</i>	24
Tabla 6. Oligonucleótidos utilizados en los ensayos de EMSA	34
Tabla 7. Oligonucleótidos empleados en la RT-PCR	45

Resumen

Entamoeba histolytica es el parásito protozoario el cual cuenta con una red de regulación de su expresión génica compleja. Durante su ciclo de vida ocurren diversos procesos celulares que se encuentran regulados a diferentes niveles, uno de ellos es el control transcripcional. En el control transcripcional intervienen diferentes elementos en *cis* como promotores, aumentadores, silenciadores y activadores sitio específicos y elementos de regulación en *trans*, que involucran a factores de transcripción que pueden tener funciones de activadores, represores, coactivadores, correpresores y proteínas modificadoras de la cromatina. En este trabajo se llevo a cabo el estudio del elemento de reconocimiento a factores de transcripción tipo Myb (TATCCA). Este elemento se encuentra presente en 117 promotores de genes de *E. histolytica* por lo que para su estudio primeramente analizamos si proteínas provenientes de extractos nucleares de *E. histolytica* reconocían a esta secuencia de DNA. De manera interesante encontramos la formación de un complejo DNA-proteína específico. Posteriormente, encontramos que esta secuencia es reconocida por proteínas de la familia EhMybSHAQKYF y no así por proteínas de la familia EhMybR2R3. Finalmente, realizamos su análisis funcional utilizando el sistema de genes reporteros de Luciferasa en el contexto del promotor del gen *HSP100*. Para ello se generaron las construcciones pGL3-HSP100-285 A3' que contiene la secuencia TATTCCA y pGL3-HSP100-260 A3' en donde se evaluó el efecto de su delección. Encontramos que la secuencia en cuestión es relevante en el control transcripcional del gen *HSP100* ya que cuando se deletó la actividad transcripcional del promotor se redujo en un 50%. En conclusión la estrategia planteada para el estudio de la secuencia TATCCA es una herramienta adecuada para validar los datos generados por búsquedas de secuencias de unión a factores de transcripción *in silico*.

1. Introducción

1.1. Antecedentes generales del tema

Entamoeba histolytica es el agente etiológico de la amibiasis en humanos; este parásito es un protozooario entérico que se caracteriza por tener una alta capacidad invasiva (Espinosa-Cantellano *et al.*, 2000 y Ximénez *et al.*, 2007). Primeramente, invade la mucosa intestinal provocando colitis ulcerativa y cuando la enfermedad es más severa, la diseminación del parásito puede hacerse a través del torrente sanguíneo, permitiéndole invadir otros tejidos, en particular el hígado, causando abscesos hepáticos (Ximénez *et al.*, 2007).

La amibiasis representa un grave problema de salud pública principalmente en países subdesarrollados. Se calcula que cerca del 10% de la población mundial es portadora del parásito y al menos el 1% desarrolla la enfermedad. En 1997, la Organización Mundial de la Salud ubicó a la amibiasis como la segunda causa de mortalidad por protozoarios, precedida únicamente por la malaria (WHO, 1997 y Ximénez *et al.*, 2007). En México se estimó que durante 1995 al 2006, la tasa de morbilidad de la amibiasis intestinal osciló entre 1,000 y 5,000 casos por cada 100,000 habitantes, con pocas variaciones anuales en la distribución por edad y género, siendo la población menor de 15 años de edad la más afectada y principalmente los niños menores de cinco años (Ximénez *et al.*, 2007).

El mecanismo de invasión de *E. histolytica* se ha investigado desde hace tiempo. Diversos estudios *in vitro* han permitido documentar los eventos que ocurren durante el proceso de patogenicidad, los cuales son definidos como adhesión, citólisis y fagocitosis (Espinosa *et al.*, 2000 y Baxt *et al.*, 2008). Algunos de los mediadores moleculares que participan en estos eventos son:

1. Lectinas inhibibles por galactosa y N-acetilgalactosamina (Gal/GalNac), lectina de 150 kDa y lectina de 229 kDa, además de diferentes adhesinas como el complejo EhADH/CP112 y proteínas ricas en serinas y prolinas (SREHP). Todos ellos participan en la adhesión de los trofozoítos a su célula blanco (Figura 1) (Mccoy *et al.*, 1994; Gilchrist *et*

al., 1998; García-Rivera *et al.*, 2000; Clark *et al.*, 2007 y Espinosa *et al.*, 2008).

2. Endopeptidasas que consisten de cisteín proteasas, metaloproteínas, autofaginas y colagenasas secretadas por la amiba; las cuales, una vez que se establece el contacto con la célula blanco desencadenan el evento citolítico que inicia el rompimiento de las uniones estrechas intercelulares (Maccoy *et al.*, 1994; Que *et al.*, 2000 y Tillack *et al.*, 2007).

3. Amebaporos, son proteínas que facilitan la invasión de los tejidos, permeabilizan la membrana y se insertan en la bicapa lipídica de la membrana de la célula blanco por la unión con fosfolípidos aniónicos a pH bajo, ocasionando la degradación del colágeno y los oligosacáridos de la matriz celular. En consecuencia el medio celular interno cambia y se produce la lisis celular por choque osmótico (Leippe, 1997 y Trejos *et al.*, 2009)

4. La fagocitosis en *E. histolytica* es un proceso multifactorial en el que intervienen varios eventos entre ellos la adhesión, la polimerización de proteínas del citoesqueleto, la endocitosis y la acción de enzimas proteolíticas. Se ha sugerido que la fagocitosis se lleva a cabo en varios pasos caracterizados de acuerdo a los siguientes criterios bioquímicos y morfológicos: i) la unión de partículas o células a los receptores de superficie del parásito, lo cual inicia con la reorganización del citoesqueleto y la formación de pseudópodos; ii) el cierre de los pseudópodos los cuales rodean al ligando de tal manera que se forma un fagosoma por invaginación de la membrana; iii) el tráfico de fagosomas a través de la vía endocítica; iv) la fusión de los fagosomas con los lisosomas y la subsiguiente digestión de las partículas internalizadas y v) el reciclaje de moléculas a la superficie de la célula (Véase figura 1) (Espinosa-Cantellano *et al.*, 2000).

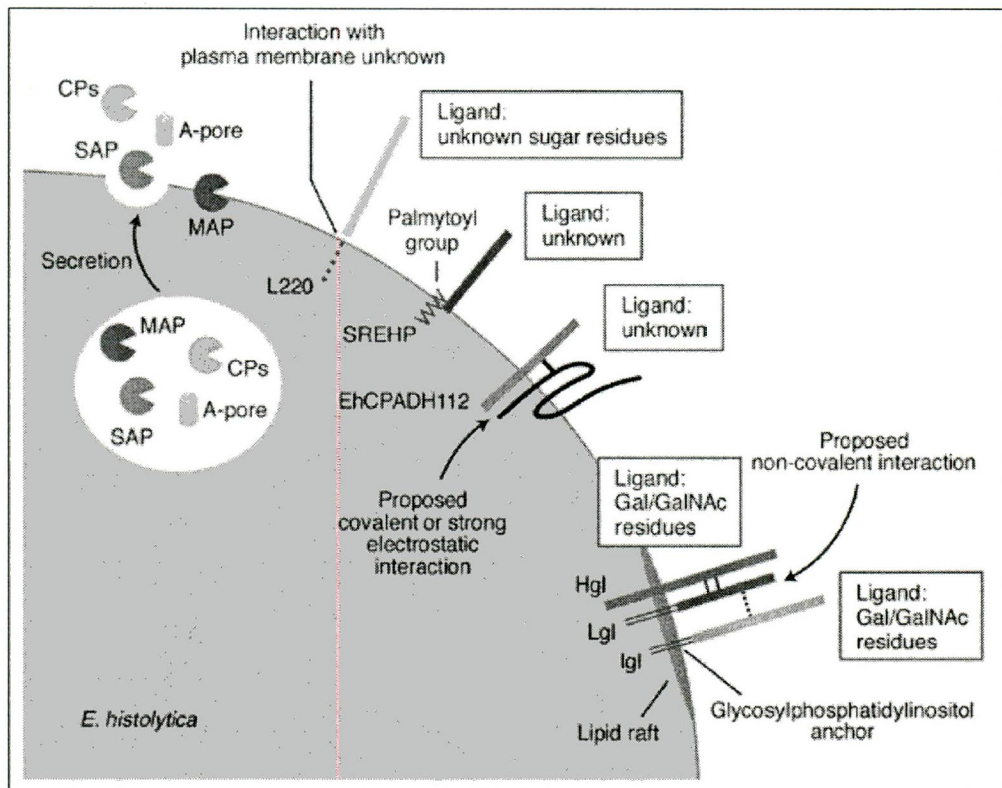


Figura 1. Proteínas que participan en el proceso de patogenicidad de *Entamoeba histolytica*. La figura muestra a las proteínas de superficie celular de *E. histolytica* que participan en la adhesión o degradación de los componentes celulares de la célula blanco (Tomado de Laughlin *et al.*, 2005.)

1.1.1. Ciclo de vida

El ciclo de vida de *E. histolytica* consta de dos estadios consecutivos: el trofozoíto y el quiste. El ciclo de vida se inicia con la ingesta de quistes maduros presentes en el agua o la comida contaminada con materia fecal. El quiste maduro desciende desde el tubo digestivo hasta llegar a la mucosa intestinal donde, previo al contacto con los jugos digestivos, se inicia el proceso de desenquistamiento. La pared que protege al quiste se elimina, los núcleos se duplican a ocho y, finalmente, se liberan las formas trofozoíticas llamadas amébulas metaquísticas, que se diferencian posteriormente a trofozoítos maduros (Ximénez *et al.*, 2007) (Figura 2).

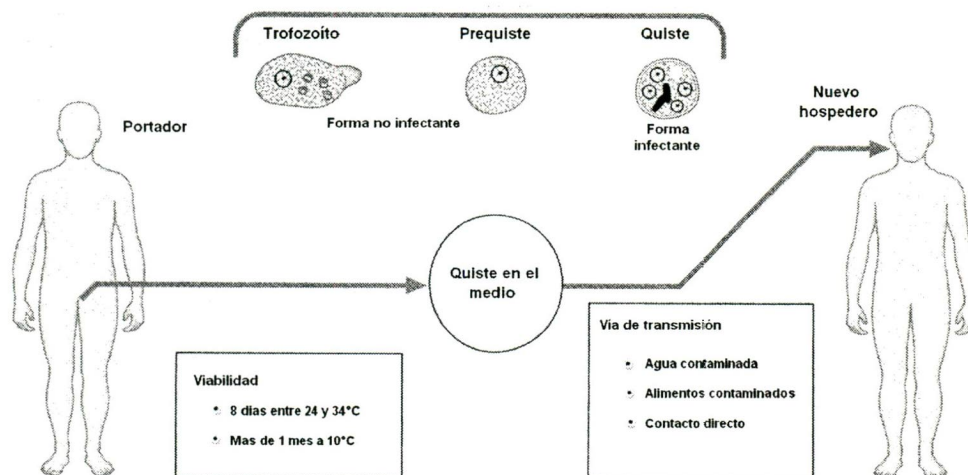


Figura 2. Ciclo de vida de *Entamoeba histolytica*. Se muestran los estadios de trofozoíto y quiste, así como las vías de transmisión.

1.1.2. Regulación de la expresión génica en *E. histolytica*

Con la secuenciación del genoma de *E. histolytica* el conocimiento acerca de la estructura y función de las proteínas involucradas en la patogénesis se ha incrementado substancialmente (Loftus *et al.*, 2005 y Clark *et al.*, 2007). Esto ha permitido analizar de manera global diversos eventos que sufre este parásito. Para investigar estos cambios diversos grupos de investigación hacen uso de herramientas genómicas como son los microarreglos, con ellos se ha podido obtener la caracterización del perfil transcripcional de *E. histolytica* así como, los cambios en la expresión génica durante diferentes eventos, tales como:

1. Colonización e invasión intestinal: El análisis transcripcional del genoma de *E. histolytica* durante el proceso de colonización e invasión intestinal fue estudiado en una población de 6 ratones infectados y se comparó con trofozoítos obtenidos de cultivos *in vitro*. Este estudio reveló que durante los eventos de colonización e invasión intestinal se sobreexpresan 523 transcritos, lo que equivale al 5.2% del total de los genes contenidos en el genoma de *E. histolytica*. De manera interesante se encontró que entre los genes que modificaron su expresión estaban aquellos que codifican para proteínas involucradas en el metabolismo, señalización celular, entre las que se incluyen cinasas transmembranales de la familia de las GTPasas (ras y rho) y genes que codifican para proteínas que unen calcio, que participan en virulencia y actividad antibacterial. El control de los cambios observados en el transcriptoma puede ser atribuido a cuatro proteínas relacionadas con dominios de unión a DNA que fueron desreguladas en el ambiente intestinal, entre las que se encontraron proteínas con dominio de unión a DNA MYB, proteínas HMG (del inglés, high mobility group proteins), proteínas con dominio de unión a DNA con dedos de zinc y el factor de transcripción basal TFIID. Otro resultado interesante de este microarreglo es la disminución de la expresión de genes que codifican para proteínas que participan en la glicólisis. El análisis del transcriptoma de *E. histolytica* también demostró que la mayoría de los

genes son transcritos en la etapa de trofozoíto y que la expresión de sus genes se ve alterada en el ambiente intestinal (Gilchrist *et al.*, 2006).

2. En la interconversión de trofozoíto a quiste: La transición de la etapa de trofozoíto a quiste es muy importante en el proceso de patogénesis de *E. histolytica*. La etapa de quiste es esencial en la transmisión de la enfermedad mientras que la etapa de trofozoíto es responsable de la invasión de los tejidos. La identificación de los genes involucrados en el desarrollo de trofozoíto a quiste ha sido obstaculizada por la falta de cultivos *in vitro* de quistes de este parásito. Por lo que, utilizando muestras derivadas de aislados humanos donde se encontraban prequistes de este parásito se realizó un microarreglo para evaluar cambios en transcriptoma del parásito durante la transición de trofozoíto-quiste. En este ensayo se encontró que 767 genes se expresan sólo durante la etapa de trofozoíto, entre los cuales están aquellos que codifican para proteínas que participan en la invasión de tejidos, como el gen que codifica para la subunidad menor de la *lectina Gal/GalNac* y el gen de la *cistein proteasa-1*. Así mismo, se encontró un total de 1439 genes que son regulados en ambas etapas, de ellos 672 se sobreexpresan en la etapa de quiste, entre los que destacan genes que codifican para cisteín proteínasas y proteín cinasas transmembranales, que podrían estar participando en la transducción de señales. También se identificaron genes que codifican para glicoproteínas específicas de la pared del quiste como las quitinasas y quitina sintetasa. Además, se identificaron otros posibles reguladores de diferenciación entre los que sobresalen los genes que codifican para receptores acoplados a proteínas G y proteínas de transducción de señales. La regulación de la expresión de los genes que participan en la diferenciación podría estar mediada por proteínas con dominio de unión a DNA MYB y proteínas Dopey, las cuales tienen un dominio de unión a DNA de cremallera de leucinas. Además de genes que codifican para proteínas con dominio hélice vuelta hélice las cuales incrementaron su expresión bajo ésta misma condición, pudiendo ser también importantes en la regulación de la expresión génica. Por otro lado, se encontró que tanto *E. histolytica*

como *E. invadens* comparten genes que participan en el proceso de enquistamiento lo que pudiera indicar que la función de estos genes se ha conservado durante la evolución del género *Entamoeba* (Ehrenkauffer *et al.*, 2007a y Ehrenkauffer *et al.*, 2009)

3. Durante la formación del absceso hepático: Los trofozoítos de *E. histolytica* penetran la mucosa intestinal y se pueden diseminar a otros órganos, como el hígado en donde pueden provocar la formación de abscesos. Se propone que los trofozoítos destruyen el tejido del hospedero y sobreviven en el hígado por una fuerte respuesta adaptativa. Para que ésta respuesta se efectuó se requiere la regulación específica de un gran número de proteínas. La comparación del transcriptoma de *E. histolytica* en aislados de trofozoítos de absceso hepáticos de hámster y de trofozoítos obtenidos de cultivo reveló que al menos siete genes de *E. histolytica* fueron regulados de manera específica. Entre ellos se encontraron que aquellos codifican para proteínas de estrés calórico, los cuales podrían estar participando en la formación del absceso hepático. También, se encontraron cambios en la expresión de genes que codifican para las proteínas ribosomales S30, L37A, ciclofilina, ferredoxina 2, GTPasa y RAB7D. Esto sugiere que la formación del absceso hepático está sujeto a la regulación y al reclutamiento de un gran grupo de proteínas que están asociadas con la respuesta al estrés, transducción de señales, control de la transcripción y tráfico vesicular. Además se identificaron cinco genes que mostraron un perfil similar al encontrado en amibas en cultivo que fueron expuestas a elevadas temperaturas. Dos de estos genes son desregulados durante el absceso hepático, y codifican para proteínas de función no conocida que contienen secuencias repetidas ricas en lisinas y residuos de ácido glutámico. A pesar de estos hallazgos todavía no se determina la identidad de todas las proteínas que participan en la formación del absceso hepático (Bruchhaus *et al.*, 2002).

4. En condiciones de estrés químico o choque térmico: Para que el proceso de infección por *E. histolytica* se lleve a cabo se debe presentar la invasión de los trofozoítos a la mucosa intestinal, así como, su adaptación a la respuesta inmunológica del hospedero, que le asegura su supervivencia. Durante estos eventos el parásito debe activar genes que codifican para diferentes proteínas que son moduladas por el estrés ambiental al cual este parásito es sometido. Como ya se ha descrito, distintos patógenos poseen diferentes estrategias de protección en contra de su hospedero. Una de ellas es la respuesta a estrés calórico, ésta se genera cuando existen incrementos en la temperatura ambiente y con ello se induce la síntesis de las proteínas de choque térmico (HSP, del inglés Heat Shock Protein) o chaperonas moleculares. El análisis del transcriptoma de *E. histolytica* durante estrés calórico reveló, la inhibición de la expresión de 471 (42%) genes entre los que destacan los genes que codifican para peroxiredoxina, cistein proteasas, ameboporos, galactocinasa y la subunidad menor de la lectina Gal/GalNac. Entre los genes que aumentaron su expresión están aquellos que codifican para proteínas de estrés calórico como las proteínas HSP90, HSP70, proteínas hipotéticas, factores de regulación transcripcional como BRF y proteínas con dominio de unión a DNA MYB y transcriptasa reversa. Un importante hallazgo fue encontrar que la expresión del gen *EhCP6* se encuentra incrementado lo que podría sugerir su papel potencial en la degradación de las proteínas dañadas durante el estrés por choque térmico (Macfarlane *et al.*, 2005 y Weber *et al.*, 2006)

Las aportaciones que se han obtenido utilizando los microarreglos son de gran importancia para comprender y elucidar los mecanismos de regulación de la expresión génica en *E. histolytica*. Uno de los principales mecanismos que participan en el control de la expresión génica es el control a nivel transcripcional por lo que la identificación de secuencias y proteínas que participan en el control transcripcional es importante para elucidar los mecanismos de activación o represión de genes que participan en la regulación de estos eventos durante el ciclo de vida de este parásito.

1.1.3. Transcripción en *Entamoeba histolytica*

La transcripción de los genes que codifican para proteínas es llevada a cabo por la RNA polimerasa II (RNAPol II) que, a diferencia de las polimerasa II de otros organismos eucarióticos, ésta es resistente a la α -amanitina, lo cual puede ser debido a divergencias existentes en la secuencia de aminoácidos de la subunidad RPB de la enzima. También, existen divergencias en la secuencia del extremo Carboxilo-terminal (CTD) que no presenta el heptapéptido repetido (TSPTSPS) común de otras RNAPol II. En cambio la RNAPol II de *E. histolytica* posee un dominio rico en residuos de prolinas y serinas que constituyen cerca del 40% de su secuencia del CTD los cuales son residuos potenciales de fosforilación y sugiere que éstas fosforilaciones modularían las interacciones proteína-proteína durante el proceso de transcripción de los genes de este parásito (Singh *et al.*, 1995; Clark *et al.*, 2007)

En *E. histolytica* el tamaño promedio de los genes es de 1167 pb con regiones intergénicas pequeñas de aproximadamente 0.8 pb. El análisis de estas regiones, por medio de ensayos de *run-on* y transfecciones transitorias, sugiere que la transcripción en este parásito es monocistrónica (Hamman *et al.*, 1995 y Clark *et al.*, 2007)

La transcripción en *E. histolytica* se ha estudiado a partir del análisis de un pequeño número de promotores, entre los cuales se encuentran los promotores de los genes *Hgl*, *ferredoxina*, *pgp1*, *pgp5*, *Rab*, *Ehadh112* y *Ehcp112* (Singh *et*

al., 1995, Gómez *et al.*, 1997, Azuara-Liceaga *et al.*, 2005; Flores-Soto *et al.*, 2005; Romero *et al.*, 2007). En estos análisis se encontró que la organización de este parásito posee ciertas peculiaridades en la organización de sus promotores, tales como:

- a) Regiones no traducibles UTR 5' y 3' cortas, constituidas por alrededor de 21 pb (Clark *et al.*, 2007).
- b) Elementos importantes para la actividad de las regiones reguladoras (promotores, aumentadores o silenciadores) alrededor de 400 pb río arriba del sitio de inicio de la traducción (ATG) (Clark *et al.*, 2007).
- c) El core del promotor de los genes tiene una estructura tripartita inusual constituida por los siguientes elementos: i) la secuencia GATTTAAA (G/C), que corresponde a la caja TATA; ii) la secuencia AAAGAACT que constituye un elemento adicional denominado GAAC; y iii) la secuencia del iniciador AAAATTCA correspondiente a Inr (Singh *et al.*, 1995; Purdy *et al.*, 1996; de Dios *et al.*, 2005 y Clark *et al.*, 2007), como se muestra en la figura 3.

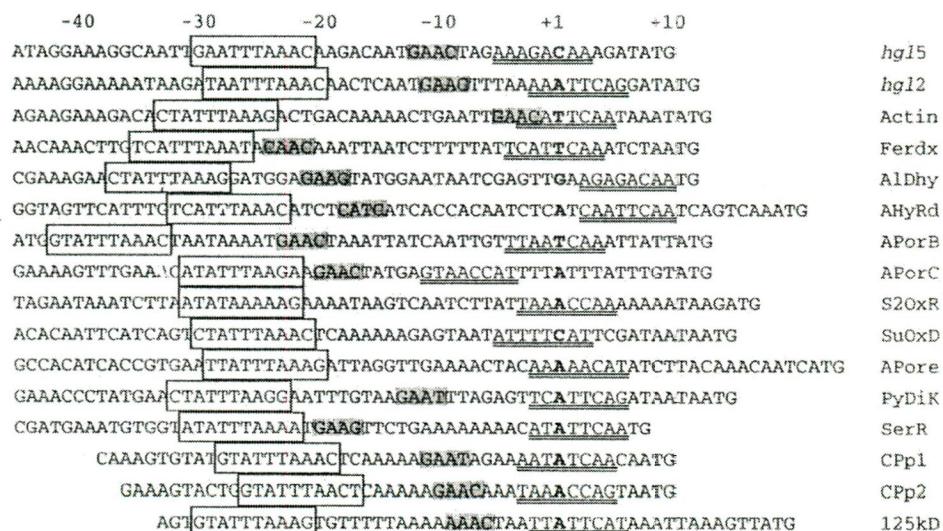


Figura 3. Esquema de la región 5' UTR río arriba del ATG de diferentes promotores de genes de *E. histolytica*. Se muestra la región 5' de diferentes genes en el recuadro se indica la localización de la secuencia de la caja TATA, en sombreado la secuencia GAAC y subrayado la secuencia Inr. (Tomado Purdy *et al.*, 1996)

1.1.4. Factores de transcripción en *Entamoeba histolytica*

Durante el ciclo de vida de *E. histolytica* se llevan a cabo múltiples procesos celulares. Como se mostró anteriormente, los cambios en la expresión de sus genes, y su control transcripcional pudieran ser relevantes para la biología de este parásito. Las variaciones a este nivel son causados, en parte, por factores de transcripción que pueden estar actuando como activadores o represores de la transcripción. A pesar de que ya se conoce la secuencia del genoma de este parásito, pocos factores de transcripción han sido estudiados, es por ello que se conoce poco de las secuencias en el DNA que estos factores reconocen en los promotores, así como, de su estructura y de su función particular.

El factor de transcripción TBP forma parte de la maquinaria basal de la transcripción. El dominio funcional de EhTBP posee un 55% de identidad con respecto a la proteína TBP de *Homo sapiens*. Así mismo, se han identificado por, análisis *in silico*, 3 *loci* que codifican para polipéptidos con alta similitud al gen *EhTBP*. Interesantemente, el tercer *locus* codifica para un polipéptido que posee un 42.6% de identidad y un 73.7% de similitud con EhTBP. A ésta proteína se le denominó EhTRF1, la cual por ensayos de EMSA mostró que tiene la capacidad de unirse también a la caja TATTTAAA. Por otro lado el modelaje de EhTRF1 y EhTBP revela que ambas proteínas son similares, aunque poseen algunas diferencias en su superficie. De ésta forma se propone que *E. histolytica* es un organismo que tiene dos de genes que codifican para proteínas similares a TBP (Luna *et al.*, 1999, Castañón *et al.*, 2010 y Pearson *et al.*, 2010).

Por otro lado, se han descrito otros factores de transcripción en este protozooario tales como, el factor transcripcional URE3-BP, el cual es una proteína de 22.6 kDa que se une específicamente a la secuencia URE3 (TATTCTATT) (Purdy *et al.*, 1996) y fue identificada por ensayos de doble híbrido en levadura. Esta proteína contiene 2 motivos EF-hand, el cual es común en proteínas reguladas por calcio. Altas concentraciones de calcio (100-500 mM) inhiben la unión de URE3-BP a su secuencia en el DNA. Así

mismo, mediante ensayos de CHIP se corroboró la interacción dependiente de calcio de URE-3BP con los promotores *hgl5* y *fdx1*. También se ha reportado que la secuencia URE3 se encuentra en promotores de genes modulados por URE3-BP, estos genes codifican para proteínas involucradas en el metabolismo de ácidos grasos y proteínas de membrana, sugiriendo que URE3-BP participa en la remodelación de la superficie de los trofozoítos de *E. histolytica* en respuesta a los niveles de calcio (Gilchrist *et al.*, 2001 y Gilchrist *et al.*, 2008).

Otro factor de transcripción identificado en *E. histolytica* es la proteína similar a la proteína supresora de tumor p53. Ehp53 tiene una homología del 50 y 57% con las proteínas de *H. sapiens* y *Drosophila melanogaster*. Su homología incluye el dominio de tetramerización, la señal de exporte nuclear y la señal de localización nuclear. Ehp53 contiene 7 u 8 residuos de unión a DNA y de 2 a 4 sitios de unión a Zn^{2+} , que también, han sido descritos para p53 de *H. sapiens* (Mendoza *et al.*, 2003).

Un miembro más del grupo de factores de transcripción descrito en *E. histolytica* es la proteína EhHMGB. Esta proteína tiene un alto grado de homología a proteínas HMG de protozoarios como *Trypanosoma cruzi*, *Schistosoma mansoni* y *Plasmodium falciparum*, así mismo con la proteína HMGB1 de mamíferos. La sobreexpresión de EhHMGB1 en trofozoítos conlleva a la modulación de 33 transcritos involucrados en una variedad de funciones celulares como virulencia, metabolismo, secreción y tráfico intracelular, señalización, estrés y genes que codifican para proteínas de membrana. De éstos, 20 algunos fueron modulados en el modelo de amibiasis intestinal en ratón, cuatro de estos genes están involucrados en virulencia y fueron modulados por la sobreexpresión de EhHMGB1, incluyendo al gen que codifica para 2 de las 5 subunidades menores de la lectina *Gal/GalNac*, y el gen de la cisteín proteínasa *EhCP-A7*, y también un péptido con potencial enterotóxico. Estos hallazgos sugieren que EhHMGB1 participa en la regulación de procesos relacionados con la adaptación del parásito y la destrucción del epitelio intestinal de su hospedero (Abhyankar *et al.*, 2008).

Aunado a esto el *E. histolytica* se han identificado factores de transcripción relacionados a procesos de transducción de señales como las proteínas STAT (Yyer *et al.*, 2008). Estas son proteínas de citoplasma que antes de su fosforilación en residuos tirosina forman homodímeros o heterodímeros que son translocados al núcleo para de ésta forma unirse al DNA. En *E. histolytica* se han descrito factores de transcripción de la familia STAT, los cuales podrían intervenir en procesos relacionados con la patogénesis. La interacción de trofozoítos con la colagena tipo I y calcio induce la expresión y activación de proteínas homólogas a STAT1 y STAT3 así como el incremento de la fosforilación en sus residuos de tirosina de estas proteínas (Cruz-Vera *et al.*, 2003).

El genoma de *E. histolytica* también tiene un abundante grupo de proteínas que contienen un dominio de unión a DNA similar al factor de transcripción c-Myb; siendo este motivo el más abundante relacionado con la regulación transcripcional (Clark *et al.*, 2007 y Iyer *et al.*, 2008). En la Tabla 1 se muestran algunos de los factores de transcripción que se han identificado en el genoma de *E. histolytica* y de los cuales se ha determinado cambios en su expresión mediante los ensayos de microarreglos de cDNA en las diferentes condiciones antes mencionadas. De manera interesante, las proteínas que contienen un dominio de unión a DNA MYB modificaron su expresión en la mayoría de las condiciones probadas, haciéndolas candidatos interesantes para ser caracterizados como factores de transcripción en *E. histolytica*, ya que podrían estar involucrados en la regulación de procesos importantes para el parásito, tales como virulencia, choque térmico y enquistamiento.

Tabla I. Cambios en la expresión de factores de transcripción de *E. histolytica* analizados mediante microarreglos

Factor de transcripción Iyer et al., 2007	Condiciones Analizadas					
	Comparación entre cepas HM-1:IMSS y Rahman Macfarlane et al., 2006	Colonización e invasión intestinal Gilchrist et al., 2006	Conversión trofozoito-Quiste Ehrenkauffer et al., 2007a y 2009	Choque térmico Macfarlane et al., 2005 Weber et al., 2006	Fagocitosis Variación entre cepas Okada et al., 2006	Tratamiento con TSA Ehrenkauffer et al., 2007b
Myb	EHI_168310	EHI_008130 EHI_129790 EHI_197980 EHI_030450 EHI_013330	EHI_038640 EHI_012420 EHI_135150	EHI_012420	EHI_168310	EHI_092700 EHI_153360
Bzip	NM	NM	EHI_0733420 EHI_0735800	NM	NM	NM
TFIID	NM	EHI_020610	NM	EHI_020610 EHI_013330	NM	NM
TBP	NM	NM	NM	NM	EHI_077240	NM
C2H2 Zn Finger	XM_652084	EHI_008770	NM	NM	NM	EHI_091050 EHI_105080
HMG1	NM	EH_093800	NM	NM	NM	66.m00150
MADS	NM	NM	NM	NM	NM	NM
GATA	NM	NM	NM	NM	NM	NM
HSF	NM	NM	NM	NM	NM	NM
Homeodominio	NM	NM	NM	NM	NM	NM
STAT	NM	NM	NM	NM	NM	NM
c/EBP	NM	NM	NM	NM	NM	NM

EHI: número de acceso de acuerdo a la base de datos del Pathema Entamoeba; 66.m: número de acceso correspondiente a la anotación anterior del genoma de *E. histolytica*; XM: número de acceso de acuerdo al GenBank; NM: No Modificado.

1.1.5. Factores de transcripción con dominio de unión a DNA MYB

Los genes *myb* fueron primeramente identificados como la contraparte celular normal (*c-myb*) del oncogen *v-myb*, que es el gen transformador del virus de la mieloblastosis en aves. Los proto-oncogenes de la familia Myb han sido ampliamente estudiados debido a su importancia en la regulación de genes que participan en procesos celulares como la proliferación y la diferenciación celular. Ya que la diferenciación es un proceso esencial para el desarrollo y el mantenimiento de los tejidos en metazoarios, es concebible que la aparición de los proto-oncogénos se llevó a cabo en etapas tempranas de la evolución de los organismos multicelulares (Lipsick *et al.*, 1996 y Ogata *et al.*, 2004)

Las proteínas Myb se encuentran conformadas por un dominio de unión a DNA MYB constituido por 3 repetidos imperfectos de 51-52 aminoácidos los cuales se denominan R1, R2 y R3 (Figura 4). Cada repetido forma tres alfa-hélices, que adoptan una estructura hélice-vuelta-hélice que es responsable del reconocimiento y unión a la secuencia de DNA (Anderson *et al.*, 2005). Cada repetido tiene como característica relevante, la presencia conservada de 3 triptófanos espaciados cada 18 ó 19 aminoácidos. Estos triptófanos están flanqueados, además, por aminoácidos básicos y polares los cuales, también se han conservado evolutivamente (Lipsick 1996). Los factores de transcripción Myb reconocen en el DNA la una secuencia específica $^C/TAAAC^G/TG$ denominada *Elemento de Reconocimiento a Myb (MRE, por sus siglas en inglés Myb recognition element)* (Ness *et al.*, 1989).

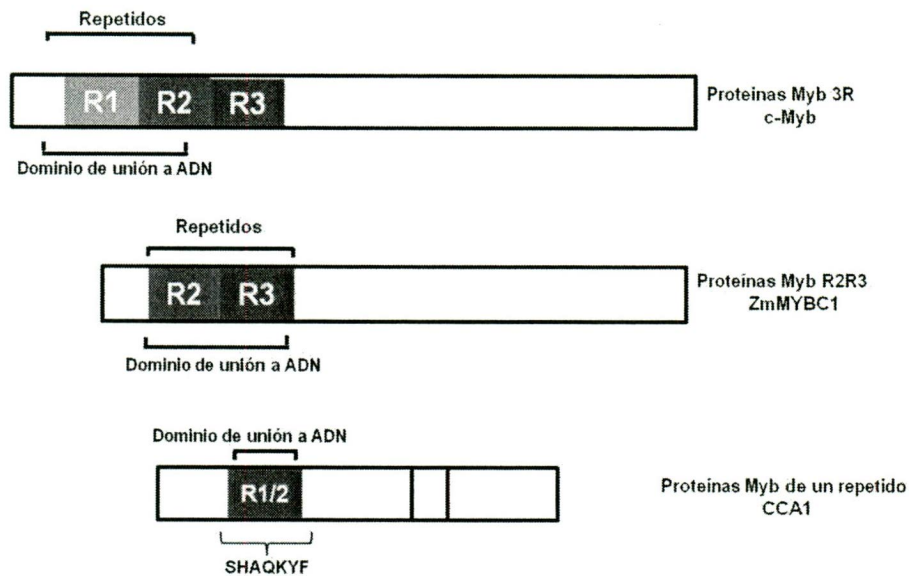


Figura 4. Representación esquemática del dominio de unión a DNA de las proteínas MYB. El esquema muestra la estructura del dominio de unión a DNA de proteínas MYB de tres repeticiones (c-MYB), proteínas MYB de dos repeticiones (ZmMYBC1) y proteínas MYB de un repetido (CCA1). (Tomado de Jin *et al.*, 1999).

Como se ha mencionado el dominio de unión a DNA MYB de éstas proteínas está constituido por 3 repeticiones, ésta característica, generalmente, la comparten las proteínas Myb de Vertebrados. Por su parte, en plantas se han identificado proteínas Myb que conservan solamente los repeticiones R2 y R3 (Figura 4) aunque recientemente se identificaron proteínas Myb con los repeticiones R1, R2 y R3 (Jin *et al.*, 1999). Otro hallazgo importante fue la identificación de proteínas Myb de un solo repetido R2/R3 las cuales han sido encontradas en plantas (Figura 4) (Jin *et al.*, 1999). En plantas las funciones de las proteínas Myb incluyen la regulación del metabolismo secundario, el control de la morfogénesis celular y la regulación de la formación de meristemos; así como el control del ciclo celular. Una característica importante de las proteínas que conservan un solo repetido es que éstas presentan una variación en la tercer α -hélice del repetido 3, en la que el motivo SHAQKYF reemplaza al triptófano, por lo cual a éstas proteínas se les denominan Myb SHAQKYF. Las secuencias que éstas proteínas reconocen en el DNA pueden tener variaciones

de la secuencia canónica (${}^C/TAACG/TG$) como es el caso de la secuencia TATCCA presente en los promotores del gen α -amilasa de *Oryza sativa* (Lu *et al.*, 1998). En cuanto a los factores de transcripción con motivo SHAQKYF en otras especies de plantas se sabe que el factor LHY involucrado en regulación circadiana de *Arabidopsis* se une a la secuencia AAATATC (Spensley *et al.*, 2009) (Véase tabla 2). Por otro lado, se han identificado algunas proteínas de la familia MYB SHAQKYF en otros organismos como, es el caso de la proteína OsMYB1 de *Oriza sativa* que reconoce a la secuencia TATCCA (Lu *et al.*, 1998), en algas como la proteína LCR1 de *Chlamydomonas reinhardtii* (Yoshioka *et al.*, 2004) y la proteína MybE en el organismo ameboide *Dictyostelium discoideum*, la cual reconoce a la secuencia GGGGCGGG (Fukuzawa *et al.*, 2006 y Tsujioka *et al.*, 2007). A pesar de estos hallazgos no se cuenta con más información acerca de otras secuencias que podrían estar regulando la expresión de genes de factores de transcripción de un solo repetido.

Tabla 2. Función de proteínas con el dominio de unión a DNA Myb en plantas

Proteína	Función biológica	Especie	Secuencia de reconocimiento a Myb
Un solo repetido			
SHAQKYF			
LHY	Regulación circadiana	<i>Arabidopsis thalina</i>	AAATATC
CCA1	Regulación circadiana	<i>Arabidopsis thalina</i>	
OsMyb	Regulación por estrés nutricional	<i>Oriza sativa</i>	TATCCA
LeMYBI			
LCR1	Regulación por estrés	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	ND
R2R3			
AtCD5	Regulación de ciclo celular	<i>Arabidopsis thalina</i>	ND
ZmMYBC1	Control del metabolismo secundario	<i>Zea mays</i>	ND
PhMYBAN2		<i>Petunia hybrida</i>	ND
AtMYBGL	Desarrollo.	<i>Arabidopsis thalina.</i>	AAAGTTGTTA
ZmMYBRS2		<i>Zea mays</i>	CAGTTG
CotMYBA		<i>Gossypium hirsutum</i>	TAACAAA
GAMYB	Transducción de señales	<i>Hordeum vulgare</i>	TAACGTG
AtMYB2		<i>Arabidopsis thalina.</i>	CTCAGCG
AtCDC5	Regulación de ciclo celular	<i>Arabidopsis</i>	
R1R2R3			
MSA-binding proteins	Regulación de genes de ciclinas	<i>Tobacco</i>	ND
AtF4D11.7	Función desconocida	<i>Arabidopsis thalina</i>	ND

Modificado de Jin *et al.*, 1999

En protozoarios se han identificado genes homólogos a cMyb en: *Giardia lamblia* (Sun *et al.*, 2002), *Trichomonas vaginalis* (Hsu *et al.*, 2004), *Plasmodium falciparum* (Boschet *et al.*, 2004), *Trypanosoma cruzi* (Freitas *et al.*, 1999) y *Leishmania amazonensis* (da Silva *et al.*, 2010). En ciliados como *Sterkiella histriomuscorum* y *Euplotes aediculatus* y en *Dictyostelium discoideum* (Fukuzawa *et al.*, 2007) Los productos proteicos de estos genes intervienen en el control transcripcional de múltiples procesos celulares como la proliferación, la diferenciación, el enquistamiento y la adhesión. Por otro lado diferentes grupos de estudio ya han reportado las secuencias a las que se unen éstas proteínas Myb (Véase Tabla 3).

Tabla 3. Proteínas con dominio de unión a DNA MYB en protozoarios

Organismo	Función de Myb	Nombre de la proteína	Tipo de proteína	Secuencia de reconocimiento a Myb
<i>G. lamblia</i> Sun <i>et al.</i> , 2002	Enquistamiento	gMyb1 gMyb2	R1R2	C(T/A)ACAG
<i>T. vaginalis</i> Hsu <i>et al.</i> , 2004	Adhesión	TvMyb1 TvMyb2 TvMyb3 TvMyb4	R2R3 R2R3 R1R2R3	A-AACGAT CGATA TAACGA TAACGA
<i>T. Cruzi</i> Freitas <i>et al.</i> , 1999	Proteínas de unión a telómeros	R2/R3	R2/R3	TTAGGG
<i>L. amazonensis</i> da Silva <i>et al.</i> , 2010	Proteínas de unión a telómeros	R2/R3	R2/R3	TTAGGG
<i>P. Falciparum</i> Boschet <i>et al.</i> , 2004	Conversión de trofozoíto a esquizonte	PfMyb1	R1R2R3	TAACGG
<i>E. histolytica</i> Ehrenkauffer <i>et al.</i> , 2009	Conversión de trofozoíto a quiste ?	EhMybdr rEhMyb10	R3SHAQKYF R2R3	CCCCC TAACGG
<i>D. discodium</i> Fukuzawa <i>et al.</i> , 2006	Diferenciación	MybE	R3SHAQKYF	GGGTGGG

En *E. histolytica*, hasta el momento, se ha descrito a un miembro de la familia de proteínas con dominio de unión a DNA tipo MYB, el cual participa en la interconversión de trofozoíto a quiste (Ehrenkaufner *et al.*, 2009). El factor de transcripción se denominó EhMybdr. Éste se sobreexpresó en trofozoítos de *E. histolytica* y posteriormente, se analizaron los genes que modificaron su expresión, los cuales, de manera interesante, fueron genes que codifican para quitinasas. El grupo de Ehrenkaufner utilizando microarreglos determinó que 117 genes son regulados al sobreexpresar EhMybdr, de estos, 40 genes se sobreexpresaron durante el enquistamiento (genes quiste específicos) como genes que codifican para quitinas y quitinasas. Así mismo 88 genes disminuyeron su expresión como aquellos que codifican para la thio redoxina. Por otro lado, también se pudieron identificar genes que se comparten entre ambos estadios. La identificación de las secuencias que ésta proteína reconoce en sus promotores blanco se realizó mediante el uso de herramientas bioinformáticas. De tal forma que se identificaron 30 motivos, 15 de ellos se encuentran presentes en promotores de genes regulados positivamente y los restantes están presentes en promotores de genes que son reprimidos. Con ello se encontró de manera interesante que la secuencia CCCCC se encuentra presente en 304 promotores y que sólo 12 genes que se encuentran sobreexpresados contienen tal motivo. Por medio de ensayos de inmunoprecipitación de la cromatina se encontró que la proteína EhMybdr se une directamente a promotores de genes que poseen la secuencia CCCCC siendo así, el primer factor transcripcional involucrado en la regulación de la expresión de la etapa de trofozoítos a quiste (Ehrenkaufner *et al.*, 2009). La proteína EhMybdr es un miembro de la familia de las proteínas EhMybSHAQKYF. Estas proteínas, generalmente sólo conservan un repetido (R2/R3) y presentan, como se había explicado anteriormente, el motivo S^I_T HAQK Y /F en la tercer α -hélice del dominio de unión a DNA. Esta familia es comúnmente abundante en plantas y regulan diversas funciones, como el mantenimiento el ritmo circadiano, la maduración de semillas y el estrés inducido por ausencia de glucosa. En *Dictyostelium* las proteínas Myb SHAQKYF regulan el desarrollo y la diferenciación (Fukuzawa *et al.*, 2006 y Tsujioka *et al.*, 2007)

Para entender el papel del factor transcripcional Myb en *E. histolytica* el grupo de la Dra. Azuara llevó a cabo una búsqueda de proteínas con dominio de unión a DNA tipo MYB utilizando como referencia a la secuencia aminoacídica del dominio de unión a DNA MYB de c-Myb de *H. sapiens*. Esta búsqueda arrojó como resultado 34 proteínas que contenían el dominio de unión a DNA MYB, las cuales se agruparon en 3 grupos monofiléticos. La familia I conserva en su dominio de unión a DNA los repetidos R2 y R3 y esta fue denominada EhMybR2R3; la familia II agrupa proteínas de un sólo repetido, este tipo de proteínas se encuentra relacionado con proteínas teloméricas de humanos. Mientras que la familia III agrupa a proteínas de un sólo repetido donde la región de la tercer α -hélice, el tercer triptófano es sustituido por el motivo S^I_T HAQK Y /F, es por ello que a ésta familia se le nombró EhMybSHAQKYF.

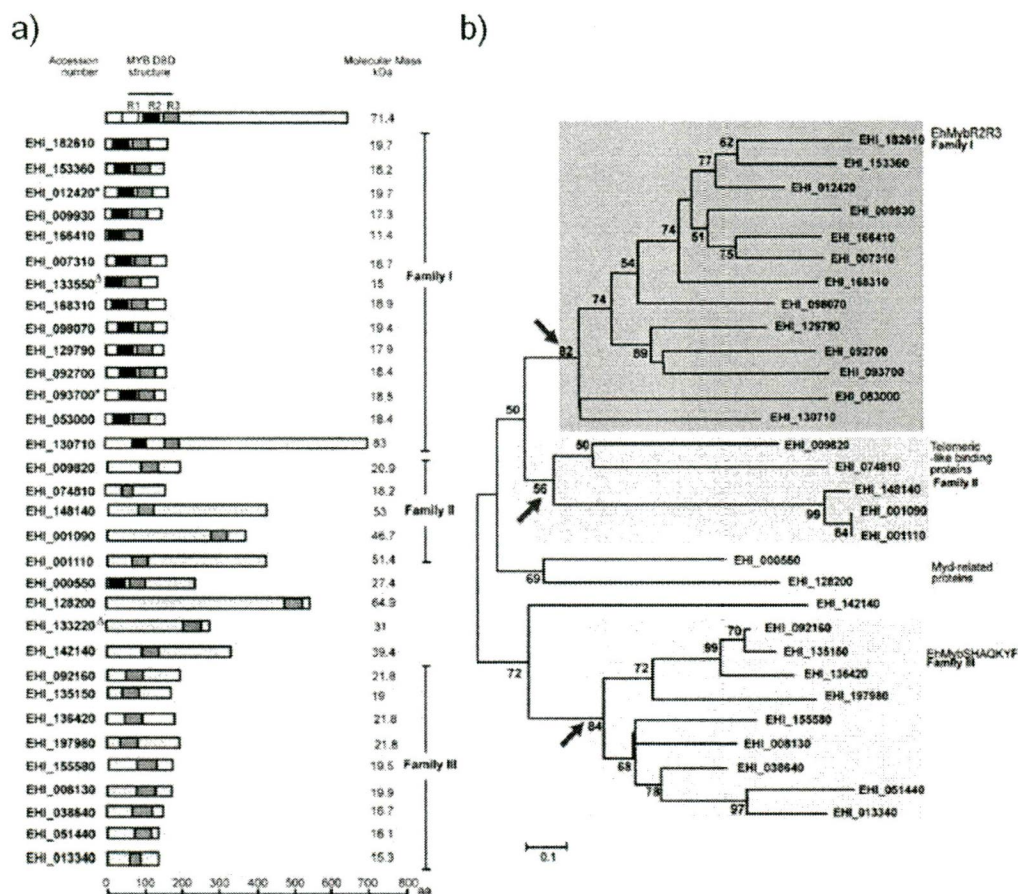


Figura 5. Proteínas EhMyb de *E. histolytica*. a). El diagrama muestra a la familia de proteínas EhMyb de amiba. b). Árbol filogenético que muestra los diferentes grupos de las proteínas EhMyb así como la clasificación de éstas dependiendo del número de repetidos presentes en su dominio de unión a DNA (Tomado de Meneses *et al.*, 2010).

Hasta el momento nuestro grupo se encuentra caracterizando a la proteína EhMyb10 de la familia I (EhMybR2R3); ya que se observó que por ensayos de microarreglos que el gen que codifica para la proteína EhMyb10 modificó su expresión durante el establecimiento de la infección intestinal. También, es importante señalar que mediante ensayos de EMSA se determinó la interacción de la proteína EhMyb10 con la secuencia de reconocimiento canónica ERM (TAACgG) contenida en el oligonucleótido *mim-1* (Meneses *et al.*, 2010).

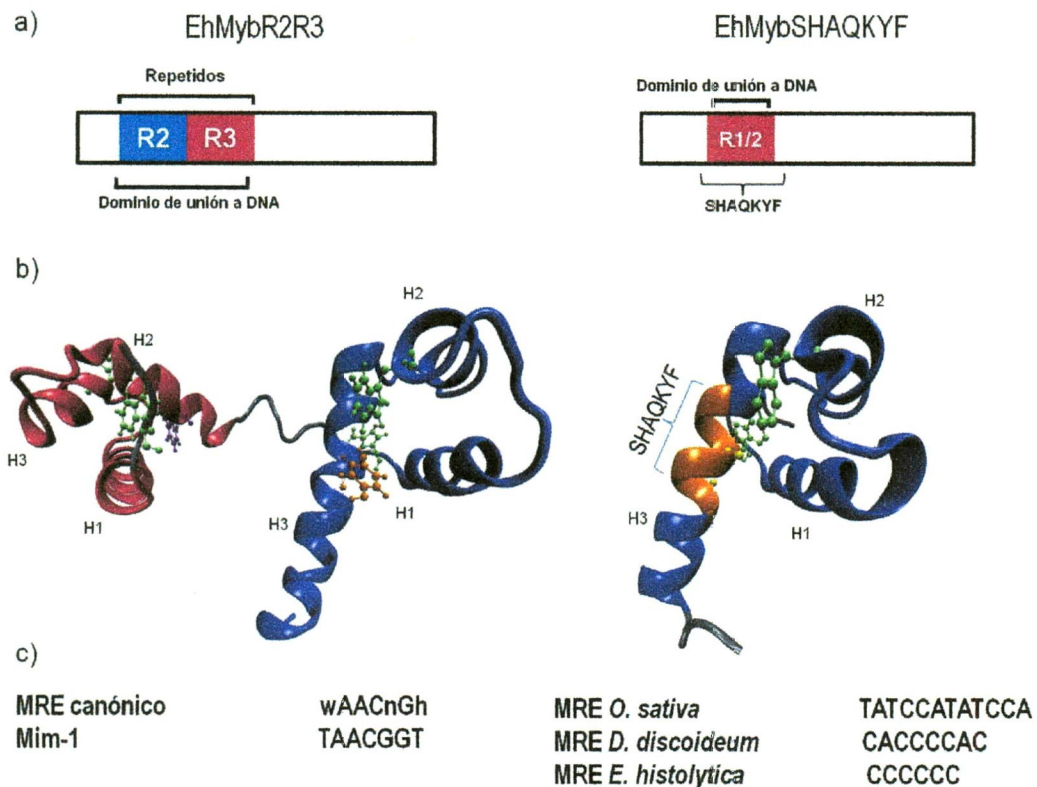


Figura 6. Proteínas EhMybR2R3 y EhMybSHAQKYF de *E. histolytica*. a). Esquema de las proteínas EhMyb10 del tipo EhMybR2R3 y EhMybdr del tipo EhMybSHAQKYF. b). Modelo de la estructura terciaria del dominio de unión a DNA de las proteínas EhMyb10 y EhMybdr. c). Secuencias de reconocimiento a DNA de las proteínas EhMyb10 y EhMybdr.

La búsqueda de proteínas tipo Myb homólogas en protozoarios y la determinación de su papel funcional en contextos unicelulares ayudará a elucidar las funciones regulatorias ancestrales de éstas proteínas. La ausencia de genes *myb* en eubacterias indica que el dominio MYB evolucionó a partir de la divergencia de los organismos eucarióticos (Jin *et al.*, 1999 y Davidson *et al.*, 2004). Los genes *myb* codifican para proteínas que se caracterizan por la

presencia del dominio de unión a DNA MYB, el cual tiene una función importante en el reconocimiento de las secuencias de ADN de las regiones promotoras. Al igual que en los vertebrados, *E. histolytica* posee en su genoma una abundante familia de genes que codifican para factores de transcripción tipo Myb como anteriormente se mencionó, estos genes modifican su expresión durante varios eventos celulares (Tabla 1) por lo que el estudiar su papel funcional en el mecanismo de control transcripcional permitirá ampliar el conocimiento de los elementos que participan en las redes de expresión génica de este parásito.

1.2. Estado del arte

Actualmente, se sabe que las secuencias en el ADN que reconocen las proteínas Myb se encuentran conservadas evolutivamente en diferentes organismos. Ya que la proteína EhMyb10, es un miembro de la familia EhMybR2R3, que reconoce la secuencia canónica TACCgG, se planteo la búsqueda de esta secuencia en el genoma de *E. histolytica*. Es por ello que en colaboración con la Dra. Selene Zárate Guerra, se buscaron Elementos de Reconocimiento a Myb (ERM) en regiones no codificantes de genes de *E. histolytica*. Primeramente, se examinó el ERM canónico $C/T AAC G/T$ el cual es reconocido por el factor de transcripción c-Myb. En este análisis *in silico* se incluyeron 5385 promotores de genes de *E. histolytica* (Cárdenas 2008). La secuencia $C/T AAC G/T$ se identificó en 226 promotores (Véase tabla 4), entre los que destacan genes que codifican para factores de virulencia, transducción de señales y estrés por choque térmico. Por lo que los factores de transcripción EhMyb de *E. histolytica* podrían estar involucrados en la regulación transcripcional de genes que participan en diferentes procesos celulares (Meneses *et al.*, 2010).

Tabla 4. Análisis *in silico* de la secuencias de reconocimiento a Myb (MRE) en promotores de *E. histolytica*.

Promotores analizados	5385
MRE	C ⁻ /T AAC ^G /T
Promotores que contienen la secuencia	226
Transducción de señales	33
Transporte vesicular	8
Regulación DNA y RNA	27
Traducción	11
Estrés/Choque Térmico	7
Virulencia	15
Enquistamiento	1
Otros	124

(Tomado de Cárdenas, 2008)

Otra secuencia analizada fue la secuencia TATCCA, la cual se encuentra presente en las regiones promotoras de genes de *Oriza sativa*. El análisis realizado determinó que se encuentra presente en 117 promotores (Véase tabla 5). La secuencia se encuentra involucrada en la regulación de la expresión de genes de la α -amilasa en ausencia de glucosa. Este hallazgo se obtuvo mediante la mutación de las secuencias de respuesta a glucosa (SRS). Este elemento se encuentra constituido por tres motivos esenciales: la caja GC, la caja G y la secuencia TATCCA en donde al mutar o deletar cualquiera de estos elementos se observó una inhibición de la transcripción del gen de la α -amilasa. Por otro lado, por ensayos de cambio de la movilidad electroforética (EMSA) se evidenció que a la secuencia TATCCA se le unen, de forma específica, proteínas de extractos nucleares, por lo que se sugirió que las proteínas que interaccionan en ella pueden estar actuando como represores o activadores de la transcripción. Un hallazgo sumamente importante fue encontrar que la secuencia TATCCA participa como un aumentador de la transcripción en genes de la α -amilasa por lo que se considera un elemento esencial en el control de la regulación de estos genes (Lu *et al.*, 1998 y Toyofuku *et al.*, 1998)

Tabla 5. Análisis *in silico* de la secuencia TATCCA en promotores de *E. histolytica*.

Promotores analizados	5385
MRE (<i>Oryza sativa</i>)	TATCCA
Promotores que contienen la secuencia	117
Transducción de señales	24
Regulación DNA y RNA	14
Traducción	8
Estrés/Choque Térmico	9
Virulencia	6
Otros	56

(Tomado de Cárdenas, 2008)

Por otro lado, el grupo de Lu (1998) aisló y caracterizó 3 genes OsMYBS que codifican para proteínas MYB de un sólo repetido y que son del tipo Myb SHAQKYF. Estos hallazgos revelaron que las tres proteínas OsMYB interactúan con la secuencia TATCCA tanto *in vitro* como *in vivo*, sin embargo, poseen una afinidad diferencial en la unión a DNA cuando sólo se encuentra una copia del elemento TATCCA y ello se ve reflejado en la actividad del promotor de células de levaduras y plantas. Además, se encontró que las diferentes proteínas OsMYB son activadores de la transcripción, sin embargo sólo OsMYB1 es un activador fuerte, mientras OsMYB2 es un activador débil. Por último, la proteína OsMYB3 no tiene función de activador. Las proteínas MYBs de un sólo repetido pueden reconocer a una secuencia de DNA diferente a la que reconocen otras proteínas MYB, cabe mencionar que la secuencia consenso que reconocen MYB R1 no ha sido estudiada extensamente, hasta el momento se sabe que OsMYB contiene el dominio SHAQK(Y/F)F y se ha visto que sólo en las proteína OsMYB y StMB1 que reconocen el *core* de la secuencia TATCCA (Lu *et al.*, 2006).

El análisis *in silico* de la secuencia TATCCA llevado a cabo en promotores de genes de *E. histolytica* reveló que ésta se encuentra en promotores de genes de respuesta a choque térmico, genes involucrados en virulencia y genes relacionados con señalización celular. Un gen candidato para estudiar la secuencia TATCCA es el gen *HSP100* que codifica para la proteína HSP100,

ya que se ha visto que se encuentra altamente expresado durante el evento de choque térmico. La proteína que codifica este gen es de localización nuclear y pertenece a la familia de chaperonas moleculares, involucradas en la disgregación de agregados de proteínas. Cabe mencionar que la proteína HSP100 en otros organismos ha sido relacionada con virulencia, tal es el caso de proteína Clp-HSP100 de *Listeria monocytogenes*, implicada en termotolerancia, además de participar en varias de las etapas del proceso infeccioso (Chastanet *et al.*, 2004). Así mismo, HSP100 en *Leishmania donovani* juega un papel importante en la sobrevivencia e integridad intracelular de los amastigotes (Clos *et al.*, 2001).

En el proceso de regulación de la transcripción se involucran elementos *cis-acting* como los promotores, aumentadores, silenciadores, activadores sitio específicos, etc; y los elementos de regulación en *trans* que involucran a factores de transcripción que pueden tener funciones de activadores, represores, co-activadores, co-represores y/o proteínas modificadoras de la cromatina. (Tymms *et al.*, 2000). Una herramienta fundamental en el estudio de los promotores es el uso de vectores que tienen genes reporteros los cuales permiten analizar la actividad de los promotores, así como definir la funcionalidad de secuencias importantes para su actividad. Estos ensayos miden de forma indirecta la tasa de transcripción, para lo cual se clonan las regiones de los promotores río arriba de las secuencias codificantes para un gen reportero, de tal forma que el producto de este gen varía de acuerdo a la regulación potencial del promotor a estudiar (Tymms *et al.*, 2000 y Malo *et al.*, 2003).

1.3. Antecedentes particulares del tema

Para llevar a cabo el estudio de secuencias involucradas en la regulación transcripcional es necesario hacer uso de ensayos funcionales. Este tipo de análisis es importante ya que permite evaluar de manera indirecta la actividad de un promotor así como las proteínas que pueden contribuir en la regulación del gen.

Los genes reporteros son secuencias que codifican para proteínas de simple detección y se usan para reemplazar productos génicos difíciles de medir y determinar su actividad promotora. Para evaluar mecanismos de control transcripcional en *E. histolytica* se han empleado los genes reporteros de luciferasa y cloranfenicol acetil transferasa (CAT). Sin embargo la expresión de los genes reporteros está condicionada a la utilización de las regiones de poliadenilación de genes propios de este parásito. El extremo 3'UTR del gen de *actina* es el más utilizado, sin embargo, también se han utilizado los extremos 3'UTR de la subunidad pesada de la lectina (Purdy *et al.*, 1995) o del gen del cistein sintasa (Saito *et al.*, 2005).

En este trabajo proponemos la utilización del gen de la luciferasa ya que no requiere la utilización de sustratos radiactivos, es por ello que parte importante de este trabajo consistió en la implementación de un ensayo funcional para evaluar la actividad de secuencias promotoras.

El plásmido reportero por excelencia en *E. histolytica* para el análisis de promotores es pA5A3'CAT, el cual fue diseñado por Tannich (Hamann *et al.*, 1995). Este plásmido tiene al gen reportero CAT y el extremo 3' UTR de actina para estabilizar al RNA mensajero. Río arriba de CAT se clona la secuencia de los promotores a estudiar y se mide la actividad de CAT por medio de un ensayo en el cual el cloranfenicol ¹⁴C es acetilado en presencia de la enzima CAT. Una de las desventajas de este ensayo es que para normalizar la actividad CAT se hace uso de una curva estándar de proteínas, la cual depende de la eficiencia transfección, del estado de las células, de la calidad del DNA y de la sobrevivencia posterior a la electroporación. Otra desventaja

es que se requieren de 80 a 100 µg de DNA para la transfección y, por último, el tiempo de detección se realiza hasta las 48 horas postranfección.

Muchos de los inconvenientes, anteriormente señalados, han sido eliminados utilizando plásmidos que con tienen el gen reportero de la *luciferasa*, sin embargo, el problema de la normalización por proteínas inherente a la técnica sigue siendo el mismo. Para solucionarlo se cuenta con dos diferentes vectores los cuales contienen genes para dos enzimas, uno para luciferasa y otro para *Renilla*.

El uso de estos vectores tiene la ventaja de que el gen de la *Renilla* se puede poner bajo un promotor débil y puede ser utilizado como control interno. El promotor a evaluar se subclona en la región río arriba del gen de la luciferasa y su actividad se normaliza contra la actividad de renilla. En el ensayo de luciferasa, la luminiscencia es producida por la conversión de la luciferina en energía química; este proceso está dado por la oxidación de la luciferina a través de la transición de electrones, como productos principales se genera oxiluciferina y luz, la cual es captada y cuantificada por un luminómetro (Véase Figura 7).

Los ensayos de luciferasa proveen las siguientes ventajas: (Tymms *et al.*, 2000 y Malo *et al.*, 2003).

- Estos ensayos ofrecen alta sensibilidad debido a que la producción de quimioluminiscencia es cuantificable y tienen un bajo fondo, indicando que el producto del gen reportero es proporcional al nivel transcripcional.
- La actividad del reportero se encuentra inmediatamente disponible después de la traducción, ya que la proteína no requiere modificaciones post-traduccionales.
- El ensayo es rápido y sólo requiere de pocos segundos por muestra.
- El uso de un sistema de reporteros permite mapear el control de la transcripción, es decir, permite dilucidar la función de elementos tales como: promotores, aumentadores y silenciadores.

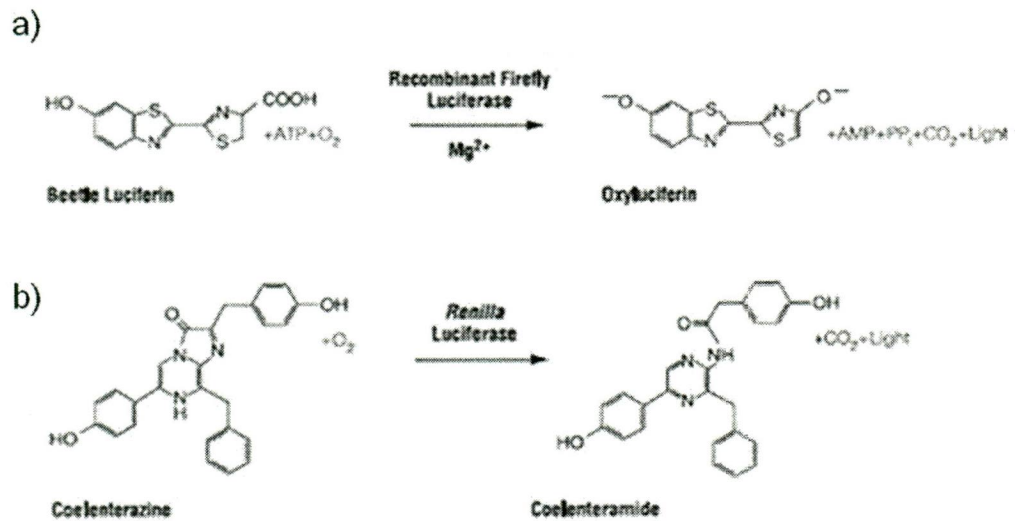


Figura. 7 Reacción de bioluminiscencia catalizada por la luciferasa. a) Firefly luciferasa, es una proteína monomérica de 61 kDa, que cataliza la oxidación de luciferina para ello utiliza ATP más magnesio como co-substrato. b) Renilla luciferasa, es una proteína monomérica de 30 kDa que cataliza la oxidación de coelenterazina. (Tomado de www.promega.com)

2. Justificación

E. histolytica es el parásito protozoario entérico causal de la amibiasis; en cuya regulación transcripcional participan diferentes factores de transcripción que modulan la expresión de sus genes. Sin embargo, aún se tiene un limitado conocimiento acerca del papel funcional de las secuencias a las que estos factores de transcripción se unen. Por lo que el definir el posible papel funcional de la secuencia TATCCA mediante el uso de genes reporteros permitirá analizar las regiones promotoras en este parásito.

3. Hipótesis

La secuencia de reconocimiento a Myb TATCCA es relevante en la regulación del promotor del gen *HSP100* de *E. histolytica*

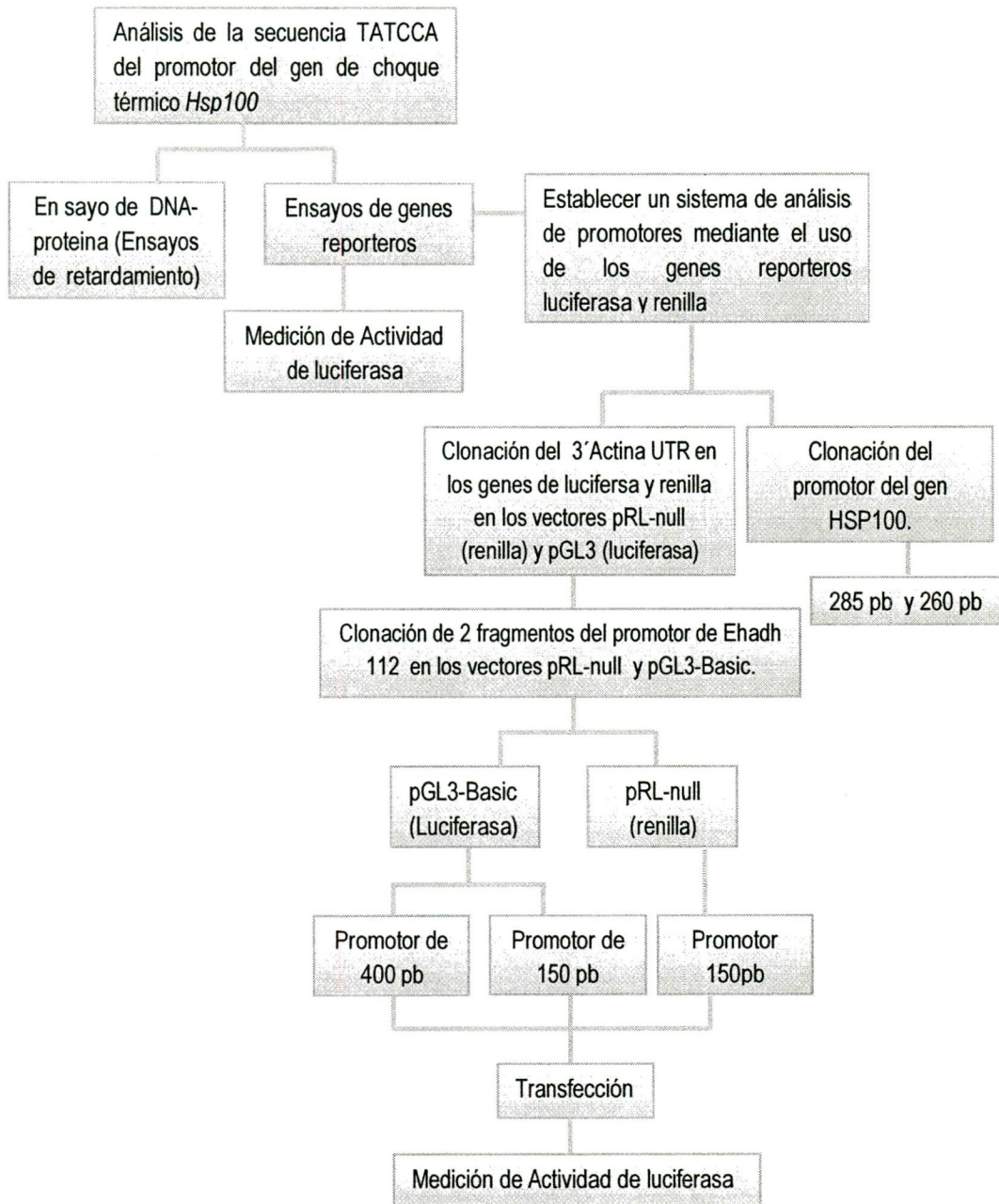
4. Objetivo general

Analizar la relevancia funcional de la secuencia TATCCA en *E. histolytica*

4.1 Objetivos particulares

1. Analizar si la secuencia TATCCA es reconocida por proteínas nucleares obtenidas de trofozoítos de *E. histolytica*.
2. Evaluar la funcionalidad de la secuencia TATCCA en la actividad del promotor del gen *HSP100* de *E. histolytica*.

5. Diagrama de trabajo



6. Estrategia experimental

6.1. Cultivos de trofozoítos de *E. histolytica*. Los trofozoítos de la clona A cepa HMI:IMSS de *E. histolytica* se cultivaron axenicamente a 37°C en medio TYI-S-33 (biosate, glucosa anhidra, NaCl, KH₂PO₄, K₂HPO₄, L(+) ácido ascórbico, L-cisteína, citrato férrico, agua desionizada, pH 6.8), complementado con 15% de suero bovino (Gibco, Invitrogen), 3% de mezcla de vitaminas de Diamond (Diamond *et al.*, 1978) y antibióticos 0.25 U/ml de bencilpenicilina (Laboratorios Pisa) y 35 mg/ml de estreptomina (Lakeside). Para realizar los experimentos los trofozoítos en fase logarítmica de crecimiento se cosecharon mediante incubación en hielo durante 15 min. Las células se empastillaron mediante centrifugación a 1,500 rpm durante 7 min, para posteriormente contarse en una cámara de Neubauer.

6.2. Ensayos de interacción DNA-proteína. Para determinar la interacción de proteínas con las secuencias *Mim-1* y TATCCA se realizaron ensayos de retardamiento (EMSA, del inglés: electrophoretic mobility shift assay). Para realizar los ensayos EMSA se utilizaron oligonucleótidos que contienen secuencias específicas para la unión de factores de transcripción, los cuales se hicieron interaccionar con las proteínas presentes en extractos nucleares y posteriormente se evaluó la alteración de su migración mediante electroforesis en condiciones no desnaturizantes. Los ensayos EMSA se realizaron utilizando diferentes oligonucleótidos que contenían las posibles secuencias de reconocimiento para los factores de transcripción EhMyb de *E. histolytica*. Las secuencias utilizadas fueron la secuencia canónica para el factor de transcripción c-Myb (C/TAAGnG) contenida en el oligonucleótido *Mim-1* (Ness *et al.*, 1989) y la secuencia TATCCA a la cual se unen proteínas Myb de plantas (Lu *et al.*, 1998) (Véase Tabla 6).

6.2.1. Marcaje de los oligonucleótidos. Los oligonucleótidos se sintetizaron como cadena sencilla y posteriormente fueron utilizados en forma de doble cadena, para lo cual se hibridaron bajo las siguientes condiciones: 3 µg de cada uno de los oligonucleótidos de cadena sencilla se diluyeron en amortiguador Tm (TrisHCl 100mM pH 8.5 y MgCl₂ 50 mM) en un volumen de 20 µl. Estos se calentaron a 90°C durante 5 min y posteriormente fueron enfriados muy lentamente hasta alcanzar la temperatura ambiente. Los oligonucleótidos hibridados se almacenaron a -20 °C hasta su uso.

Los oligonucleótidos empleados fueron diseñados para que contuvieran en sus extremos 5' el sitio de corte para la enzima *Xba*I (5'-CTAG-3'), de ésta manera se rellenaron empleando a la enzima ADN polimerasa I, fragmento largo (Klenow) de *E. coli* (New England Biolabs, Inc). Los oligonucleótidos TATCCA y *Mim-1* ambos a una concentración de 150 ng/µl, se marcaron de la siguiente manera, se adicionó 1 µl de la mezcla de dNTPs (10 mM de cada uno de los dNTPs: dGTP, dCTP y dTTP), así mismo se adicionó 1 µl del amortiguador de la enzima Klenow 10X y 1 µl de dATP α[P³²] (Perking Elmer). Por último, se adicionó 1 µl de la enzima Klenow en un volumen final de 10 µl. Esta mezcla se incubó durante 1 hr a temperatura ambiente. Para eliminar los nucleótidos no incorporados se utilizó el kit QIAquick Nucleotide Renoval (QIAGEN) según las indicaciones del fabricante. La reacción se diluyó en 100 µl de solución PN, ésta se transfirió a una columna la cual fué centrifugada a 14,000 rpm por 1 min. Posteriormente, se hicieron dos lavados con 500 µl de solución PE centrifugándose cada vez a 14,000 rpm por 1 min. Finalmente, las sondas marcadas se eluyeron utilizando 150 µl de solución EB de manera que contuvieran cada uno de los oligonucleótidos a una concentración final de 1 ng/µl.

Tabla 6. Oligonucleótidos utilizados en los ensayos de EMSA.

Oligonucleótido	Secuencia
<i>Mim-1</i>	5'-TCTAGAACACATTATAACGGGTTTTTTAGC-3'
<i>Mim-1M</i>	5'-TCTAGAACACATTAG GCCAGG TTTTTTGC-3'
TATCCA	5'-CTAGTCTCTATCCAAAA-3'
TATCCA-M	5'-CTAGTCTC GCGCC AAAA-3'
<i>Sp-1</i>	5'-CTAGATTCGATCGGGGCGGGGCGAGC-3'

El ERM está subrayado y en letras bold se indican las bases mutadas.

6.2.2. Extractos nucleares. Cultivos de *E. histolytica* confluentes se enfriaron y se cosecharon. La pastilla de amibas se lavó una vez con PBS (NaCl 140 mM, KCl 2.7 mM, Na₂PO₄ 8 mM, KH₂PO₄ 8 mM, pH 6.8) frío. Seguido, se centrifugó a 1500 rpm a 4°C. El sobrenadante se retiró y la pastilla se resuspendió en solución A (HEPES 10 mM pH 7.9, KCl 10 mM, EDTA 0.1 mM, EGTA 0.1mM, DTT 1 mM, PMSF 200 mM, Coctel de inhibidores y H₂O) y se incubó por 15 min. Posteriormente, se verificó que las amibas se redondearan y se adicionó NP-40 al 10%. La suspensión de células se pasó a un homogenizador de tejidos en donde se aplicaron 50 golpes de teflón. Posteriormente, se centrifugó 10,000 rpm por 10 min y se recuperó el sobrenadante que es la fracción citoplásmica. Una vez obtenidos los núcleos, éstos se re-suspendieron en solución C (HEPES 20 mM pH 7.9, NaCl 0.4 mM, EDTA 0.1 mM, EGTA 1 mM, DTT 1 mM, PMSF 200 mM, Coctel de inhibidores y H₂O) y se sometieron a agitación vigorosa por 20 min a 4°C. Posteriormente, los núcleos se centrifugaron a 14,000 rpm por 5 min, el sobrenadante así recuperado constituye la fracción nuclear. Los extractos nucleares se cuantificaron mediante la técnica de Bradford, se hicieron alícuotas y se guardaron a -70° C hasta su utilización en ensayos EMSA.

6.2.3. Ensayo de EMSA. Los extractos nucleares de *E. histolytica* se preincubaron por 10 min en hielo con amortiguador de unión BDG 1X (HEPES 12 mM pH 7.9, EDTA 0.5 mM pH 8, MgCl₂, 4 mM, KCl 60 mM DTT 2 mM e inhibidores de proteasas), con una solución de Espermidina-Magnesio (MgCl 4 mM y de Espermidina 4 mM) y con 1 µg de poly [dI/dC] (Sigma-Aldrich). Al término de los 10 min se agregó 1 µl de la sonda marcada radiactivamente y se incubó en hielo durante 20 min. Las muestras se depositaron en un gel nativo no desnaturalizante de poliacrilamida al 6% y de baja fuerza iónica (Tris base 50 mM, Ácido bórico 50 mM y EDTA 0.2 mM pH 8.0 (TBE 0.5 X). La electroforesis se llevó a cabo a 150 V. El gel fue secado al vacío y la imagen fue revelada utilizando placas autoradiográficas (Kodak Eastman).

Por otro lado, para determinar la especificidad de los complejos DNA-proteína se hicieron ensayos de competencias, para ello se utilizaron excesos molares de oligonucleótidos específicos e inespecíficos. El ensayo se llevo a cabo como se describió anteriormente, sin embargo, a la mezcla se le agregaron excesos

molares de 100 veces de los competidores específicos e inespecíficos. Al término de los 10 min se agregó 1 μ l (1 ng) de la sonda marcada radiactivamente y se incubó en hielo durante 20 min. Las muestras se depositaron en un gel nativo no desnaturalizante de poliacrilamida al 6% y de baja fuerza iónica (TBE 0.5 X). La electroforesis se llevo a cabo a 150 V. El gel fue secado como se describió anteriormente.

6.3. Implementación de un sistema de genes reporteros para evaluar funcionalmente la secuencia TATCCA en *E. histolytica*

1.- Obtención de construcciones que contienen diferentes fragmentos del promotor del gen de la adhesina *Ehadh112* de *E. histolytica*.

6.3.1. Obtención de los plásmidos pGL3-basic y pRL-null. Bacterias de *E. coli* DH5 α fueron transformadas con los plásmidos pRL-null y pGL3-Basic en medio agar Luria-Broth (Tryptona 10 gr, Extracto de levadura 5 gr, NaCl 0.25 M y Agar) suplementado con ampicilina a una concentración de 100 μ g/ml. Se seleccionó una colonia y se creció en 50 ml de medio Luria-Broth suplementado con ampicilina (100 μ g/ml) por 16 horas. El cultivo bacteriano se empastilló y se centrifugó a 14,000 rpm por 5 minutos para la extracción de DNA plasmídico utilizando el Kit Midiprep (Qiagen) de acuerdo a las instrucciones del proveedor. La integridad del DNA se verificó mediante electroforesis en geles de agarosa al 1%.

6.3.2. Clonación del 3'UTR del gen de actina de *E. histolytica* en los plásmidos pGL3-basic y pRL-null. Los genes reporteros utilizados para el estudio de promotores no presentan actividad en el parásito *E. histolytica*. Para el análisis de los promotores de este parásito se han utilizado como reporteros a los genes de CAT y Luciferasa, para lo cual se les ha clonado en su extremo 3' la región 3'UTR del gen de actina. Para clonar el 3'UTR de *actina* de *E. histolytica* se digirieron los plásmidos con las enzimas de restricción *Bam*HI y *Xba*I (New England Biolabs). La reacción de digestión se incubó a 37°C durante 3 horas. El producto de corte se visualizó en un gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio. Una vez que se verificó que las dos enzimas cortaron al vector, las muestras se corrieron en un gel preparativo de agarosa, sometiéndolas a electroforesis. Se cortó una banda de aproximadamente 4.8

kb que corresponde al vector pGL3-Basic y otra banda que corresponde a 3.3 kb del vector pRL-null. Ambas bandas se cortaron para ser purificadas con el kit Wizard SV Gel Extraction (Promega) de acuerdo con las instrucciones del proveedor, esto con la finalidad de eliminar a las enzimas de restricción.

6.3.3. Reacción de PCR para amplificar la región 3' del gen de *actina*. El extremo 3' de la región UTR del gen de *actina* se amplificó utilizando como molde al plásmido pA5A3CAT y los oligonucleótidos 5'Xba-Actina (5-' GAGGACTCTAGTAATTTATTTCTCATTTGAT-3') y el oligonucleótido 3' BamHActina (5'-GAGGACGGATCCTCTCTTCATCTCCATATCTAC-3') que contienen los sitios de clonación *XbaI* y *BamHI* respectivamente. El producto amplificado se purificó a partir de un gel de agarosa, se restringió con las enzimas *XbaI* y *BamHI* y posteriormente se volvió a purificar para finalmente proceder a la reacción de ligación. Para ello los plásmidos pGL3-basic y pRL-null linearizados se incubaron con el fragmento de 600 pb de extremo 3' UTR de actina utilizando el kit Rapid DNA Ligation (Fermentas). De ésta forma el 3' UTR de actina quedó río abajo de la secuencia de los genes reporteros *Luciferasa* y *Renilla*, a estos plásmidos se denominaron pGL3-3'A y pRL-null-3'A (Figura 8).

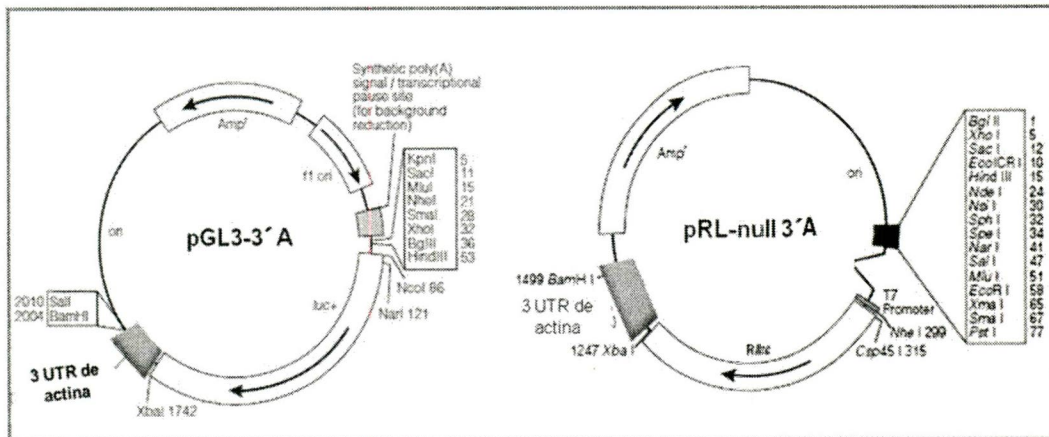


Figura 8. Vectores pGL3-3'A y pRL-null 3'A. La figura muestra los plásmidos empleados para el análisis funcional de la secuencia TATTCCA (Adaptado de www.promega.com).

6.3.4. Obtención de los fragmentos del promotor del gen *Ehadh112* de *E. histolytica*. Para poder desarrollar un ensayo funcional utilizando los genes reporteros *Luciferasa* y *Renilla* en *E. histolytica* fue necesario contar con controles positivos, de los cuales previamente ya se ha caracterizado su actividad. Es por ello que seleccionamos el promotor del gen *Ehadh112*, el cual se encuentra clonado en la construcción p469CAT (Azura *et al.*, 2005). Esta construcción se utilizó como molde para amplificar el fragmento de 469 pb del promotor del gen *Ehadh112* utilizando los oligonucleótidos Adh400Lucs (5'-GAGTCGCTCGAGGGGGTGAAGGAGACAATT-3') y el oligonucleótido Adhas30HindIII (5'-CCCAAGCTTAGGAATGAATTGTCTATTCAT-3'), los cuales tienen sitios de corte para las enzimas *HindIII* y *XhoI* respectivamente esto con la finalidad de facilitar la clonación de este promotor en el vector pGL3-3'A. Así mismo, en el vector pGL3-3'A se clonó un fragmento de 151 pb del promotor del gen *Ehadh112*, utilizando los oligonucleótidos Adh151Lucs (5'-GAGTCGCTCGAGTTTATTTTATGATTTGATT-3') el cual también tiene el sitio de corte *HindIII* y el oligonucleótido Adhas30HindIII.

6.3.5. Clonación de los fragmentos del promotor del gen *Ehadh112*. Los productos de amplificación de 460 y 151 pb se clonaron en el vector pGL3-3'-Actina y sólo el fragmento de 151 pb se clonó en pRL-null-3'-Actina. El vector y los insertos purificados se ligaron utilizando la enzima T4 ligasa (Fermentas). Como control negativo de la ligación se preparó una reacción con el vector sin colocar el inserto y con la T4 ligasa (Fermentas). Si la reacción fue eficiente, ésta no debió ligarse dado que los sitios de restricción *HindIII* y *XhoI* no son compatibles. La reacción de ligación se incubó a temperatura ambiente por 5 min.

6.3.6. Preparación de células competentes de *E.coli* DH5 α .

Las bacterias *Escherichia coli* DH5 α se crecieron en 5 ml de medio LB sin ampicilina durante toda la noche a 37° C. Al día siguiente las células se inocularon en 100 ml de medio SOB. Las bacterias se incubaron a 37°C con agitación constante hasta que alcanzaron una densidad óptica de 0.5. El cultivo se enfrió en hielo durante 10 min. Posteriormente, el cultivo se empastilló a 2500 rpm por 12 min a 4°C, el sobrenadante se decantó y la pastilla se dejó

secar. Posteriormente la pastilla se resuspendió en 16 ml de solución RF1 (RbCl 100 mM, $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ 50 mM, Acetato de potasio 35 mM, $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 10mM, Glicerol 15%, el pH 5.8 con CH_3COOH 0.2 M) y se incubó en hielo por 15 min. Después de la incubación se centrifugó a 2500 rpm por 12 min a 4° C, el sobrenadante se decantó y se adicionaron 4 ml de solución RF2 (MOPS 10 mM, RbCl 10 mM, $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 75 mM, Glicerol 15%, pH se 6.8 con NaOH) se incubó por 15 min. Una vez transcurrido el tiempo de incubación se hicieron alícuotas de 100 μ l de las células y congelaron a -70° C hasta su uso.

6.3.7. Transformación de células competentes de *E.coli* DH5 α . 100 μ l de bacterias DH5 α se mezclaron con cada una de las mezclas de ligación, posteriormente, se incubaron en hielo por 2 min, se dio un choque térmico a 42 °C por un minuto y se incubaron nuevamente en hielo durante 15 min. Las células se recuperaron en medio SOC (Bactrotiptona 2%, Extracto de levadura 0.5%, NaCl 10 mM, KCl 2.5 mM, $MgCl_2$ 10 mM) 37°C por 1 hora. Posteriormente, éstas se centrifugaron a 200 rpm. Finalmente, 50 μ l de las células se espatularon en cajas Petri con medio Luria con 100 μ g/ml de ampicilina y posteriormente se incubaron a 37°C toda la noche. Las colonias obtenidas se picaron y crecieron en 5 ml de medio Luria-Ampicilina (100 μ g/ml) líquido a 37 °C toda la noche.

6.3.8. Obtención del DNA plasmídico para análisis de las clonas positivas. Para seleccionar las clonas positivas a las ligaciones se obtuvieron los cultivos correspondientes a las colonias obtenidas en la ligación, tras lo cual se procesaron para la obtención de los plásmidos, cosechando a 14000 rpm durante 2 min y resuspendiendo las pastillas en solución TS (TrisHCl 50 mM Sacarosa 25%). A las pastillas resuspendidas se les agregó solución ELT (100 mM EDTA, Lisozima 2 mg/ml y Tritón X-100 0.1%) y se incubaron a 70 °C por 10 min. Finalizada la incubación se realizó una centrifugación a 14,000 rpm por 15 min, el sobrenadante se recuperó y se adicionó un volumen igual de PEG (PEG 6000 20%, NaCl 1M, TrisHCl pH 8 10mM y EDTA 1mM) para su precipitación agitandose suavemente. Posteriormente se incubó por 20 min a temperatura ambiente y se centrifugó a 14,000 rpm por 3 min. La pastilla de DNA se dejo secar a temperatura ambiente y finalmente se resuspendió en agua Milli Q estéril.

Los plásmidos extraídos se digirieron con las enzimas *HindIII* y *XhoI*. Posteriormente, se cargaron 10 µl del producto de restricción en un gel de agarosa al 1% para verificar la liberación del inserto correspondiente al tamaño del fragmento del promotor. Una vez verificada la liberación del inserto, se seleccionaron las colonias y se procesaron para la obtención de DNA de alta calidad y pureza para su secuenciación. En breve, las colonias seleccionadas se picaron y crecieron en medio Luria-Ampicilina 100 µg/ml. Las células se procesaron para la obtención del plásmido con el kit Wizard plus SV minipreps DNA purification System (Promega) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Se cosecharon las bacterias por centrifugación y se les adicionó solución de resuspensión celular. Posteriormente, se lisaron con solución de lisis y se incubaron con solución de proteasa alcalina por 5 min a temperatura ambiente. Terminada la incubación se agregó solución de neutralización y se centrifugaron a 14,000 rpm por 10 min. El sobrenadante se recuperó y se pasó por una columna de purificación centrifugando a 16,000 rpm por 1 min, se adicionó solución de lavado y se centrifugó a 16,000 rpm durante 2 min. Finalmente se eluyó el DNA plasmídico de la columna con agua libre de nucleasas centrifugando a 16,000 rpm durante 1 min.

6.3.9. Reacción de secuenciación de las construcciones plasmídicas. Los plásmidos obtenidos se cuantificaron por espectrofotometría a 260/280 nm y se corrieron en un gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio. Para estimar la concentración de los plásmidos obtenidos se utilizó el marcador de talla molecular de 1 Kb (Invitrogen). Se cargaron 500 ng de cada plásmido por pozo. Una vez cuantificados los plásmidos se realizó la reacción de secuenciación de acuerdo utilizando el kit ABI Prism BigDye v3.1 (Applied Biosystem) Las reacciones de PCR se purificaron utilizando el kit DyeEx 2.0 Spin Kit (QIAGEN) y se leyeron en un secuenciador automático 31300 Genetic Analyzer (Applied Biosystem).

6.4. Evaluación de la funcionalidad de la secuencia TATCCA en *Entamoeba histolytica*. Para evaluar la funcionalidad de la secuencia TATTCA del promotor del gen *HSP100* se utilizaron plásmidos que contienen los genes reporteros de de la *Luciferasa* y *Renilla*. Estos plásmidos fueron modificados como se explico anteriormente ya que a ambos se les clonó el 3'UTR de gen de *actina* lo que permite la expresión de los genes reporteros en *E. histolytica*.

6.4.1. Obtención de DNA genómico para amplificar el promotor del gen *HSP100* de *E. histolytica*. El DNA genómico se obtuvo de trofozoítos de *E. histolytica* de la cepa HMI: IMSS utilizando el Kit Wizard Genomic ADN Purification (Promega) según las condiciones del fabricante. Este kit está basado en una extracción de cuatro pasos. Primeramente, las células y los núcleos se rompen utilizando una solución de lisis de núcleos, en seguida se realizo una digestión con RNasa para luego realizar una precipitación de proteínas con la solución precipitante. Finalmente el DNA fue precipitado con isopropanol y se resuspendió en solución de rehidratación de DNA. El DNA genómico se cuantificó por espectrofotometría a 260/280 nm. El cual se utilizó como templado para la amplificación del gen *HSP100*.

6.4.2. Obtención de las construcciones que contienen al promotor del gen *HSP100*. Se diseñaron oligonucleótidos de acuerdo a la secuencia río arriba del sitio de inicio de la traducción (ATG) del gen *HSP100* con número de acceso EHI_072140 de Pathema Entamoeba (<http://pathema.jcvi.org/cgi-bin/Entamoeba/PathemaHomePage.cgi>). La construcción p285 se obtuvo al clonar el fragmento amplificado por PCR de la región -285 a 18 pb de la región del promotor del gen *HSP100* utilizando los oligonucleótidos HSP100Xho-285s (5' CCCGCTCGATA AACATTTATCAATAG 3') el cual tiene un sitio de corte para la enzima *XhoI* y el oligonucleótido HSP100HindIIIas (5'-CCCAAGCTTCCATTTGTTTGGATCCAT-3') que contiene el sitio de corte *HindIII* en su extremo 3' a partir de 100 ng de DNA genómico. A ambos oligonucleótidos se les adicionaron 6 bases adicionales para permitir el corte de las enzimas de restricción en el producto de DNA amplificado.

6.4.3. Obtención de los plásmidos para transfección. Una vez que se verificó que las construcciones obtenidas contuvieran los fragmentos del promotor del gen *Ehadh112* clonados y que no contuvieran mutaciones, los plásmidos se purificaron utilizando el kit MEGA (QIAGEN). Brevemente, se incubó un volumen de 5 ml de medio Luria Ampicilina con *E.coli* DH5- α a 37°C por 16 hrs a 200 rpm, posteriormente se inoculó un volumen de 500 ml de medio Luria Ampicilina con 1 ml del precultivo. La muestra nuevamente se incubó a 37°C a 200 rpm por 16 hrs, una vez concluido este paso el cultivo se empastilló a 6,000 rpm por 15 min a 4°C. Las células se procesaron para la obtención del plásmido usando el kit Mega de (Qiagen) de acuerdo a las instrucciones del proveedor.

6.5. Realización de ensayos funcionales para evaluar la actividad de los promotores.

6.5.1. Transfección por electroporación. Trofozoítos de *E. histolytica* fueron incubados por 15 minutos en hielo. Posteriormente el cultivo se empastilló a 1500 rpm por 5 min a 4° C, el sobrenadante se decantó. Posteriormente la pastilla fue resuspendida en CITOMIX incompleto (buffer [KCl 120 mM, CaCl₂ 0.15 mM, K₂HPO₄/KH₂PO₄ 10 mM pH 7.5, Hepes 25 mM, EGTA 2 mM, MgCl₂ 5 mM, final pH 7.8-7.9], para después centrifugar a 1500 rpm por 5 min a 4° C, el sobrenadante se decantó y por último se adiciono 0.8 ml de CITOMIX completo el cual contiene 0.030g ATP (2 mM) y 0.036g de glutatión (5 mM) de tal forma que se resuspendió una concentración de 4 x10⁶ trofozoítos por ml. Por otro lado se agregaron 40 μ g del plásmido en cuestión a cada celda de electroporación. Antes de la electroporación se adicionaron 3.0 μ l de DEAE-dextran (1mg/ml) a la suspensión de células y estas fueron mezcladas por inmersión, 800 μ l de las células resuspendidas en CITOMIX completo, DEAE-dextran se agregaron a cada celda de electroporación que contiene el plásmido. Por último la suspensión se mezclo para obtener una suspensión de amibas y ADN. Las condiciones de electroporación fueron 25 μ F, 1200V/cm y un pulso constante de 9.7 – 10.6 msec. Las células se recuperaron en 11 ml de medio TYI-S-33 que contenía E-64c (8 μ M).

6.5.2. Transfección por lipofección. 200,000 trofozoítos de *E. histolytica* de la clona HMI:IMSS se sembraron en placas de 6 pozos el día previo a la transfección. Las construcciones plasmídicas (10 µg) obtenidas se transfectaron, utilizando el reactivo Superfect (Qiagen) en una relación 1:1. Para ello el DNA y el Superfect se incubaron 10 min en 100 µl de medio M199 (Invitrogen, CA) suplementado con cisteína 5.7 mM, ácido ascórbico 1 mM, HEPES 25 mM pH 6.8. Posteriormente, los trofozoítos adheridos a la placa se lavaron con 4 ml de medio M199 y se les agregaron 800 µl de medio M199 suplementado con Suero Bovino al 15%. A cada uno de los pozos se les agregó la mezcla DNA-Superfect y se incubaron durante 3 hrs a 37°C. Al cabo de ese tiempo las células se enfriaron y se recuperaron en tubos que contenían 10 ml medio de cultivo TYI-S-33 y el inhibidor de proteasa E-64c (8 µM) se incubaron por 18, 24 ó 48 hrs. A continuación éstas fueron cosechadas para determinar su actividad.

6.6. Ensayo de luciferasa

6.6.1. Preparación de lisado celular: Las células transfectadas se cosecharon por centrifugación, se eliminó el medio de cultivo cuidadosamente. Las células se lavaron una vez con PBS (NaCl 140mM, KCl 2.7 mM, Na₂PO₄ 8 mM, KH₂PO₄ 8 mM, pH6.8). Se centrifugaron a 5000 rpm por 5 min para eliminar el PBS y posteriormente se adicionaron 100 µl de buffer de lisis (NaEDTA 2mM, fosfato de potasio 0.1 M pH 7.8, Tritón X-100 1% y DTT 1mM) que contenía E-64 (75 µM) y Leupeptina (0.75 µM) para cubrir toda la pastilla y se resuspendió con vortex. La suspensión se incubó durante 30 min en hielo. Una vez concluido el tiempo de incubación se centrifugaron a 14,000 rpm por 5 min y se obtuvieron los sobrenadantes. Para por último se depositar 20 µl de cada uno de los lisados en una placa 96 pozos para luminómetro.

6.6.2. Medición de luciferasa. El lisado de células transfectadas se adicionó a la placa de 96 pozos posteriormente se agregó 100 µl del reactivo de luciferasa KTME (100 mM Tricina pH 7.8, 10 mM MgSO₄, 2 mM EDTA, 1 mM DTT, 50 mM D-luciferina y 200 mM ATP). Antes de iniciar el ensayo se programó el luminómetro con una medición de dos segundos de demora seguida de una medición de 10 segundos para cuantificar la actividad de luciferasa. El tiempo de lectura se modificó en caso de no encontrar suficiente quimioluminiscencia.

6.7. Detección del transcrito del gen de *luciferasa*. Para determinar la presencia de los transcritos del gen de *luciferasa* se realizaron ensayos de RT-PCR, esto con la finalidad de conocer si el gen de *luciferasa* se encontraba en *E. histolytica*.

6.7.1. Reacción de retrotranscripción

6.7.2. Extracción y cuantificación de RNA total. La extracción del RNA total de las células transfectadas con las distintas construcciones se realizó utilizando el reactivo comercial TRizol (Invitrogen). La extracción se realizó según el protocolo sugerido por el proveedor, para ello las células se cosecharon y se lavaron con PBS como anteriormente se describió. A la pastilla obtenida se le agregaron 200 µl de TRizol y se incubó durante 5 min. Posteriormente se le agregaron 300 µl de cloroformo. Después de mezclar por inmersión suave para homogenizar, se incubó durante 3 min a temperatura ambiente. Se centrifugó a 8,000 rpm durante 5 min para obtener la fase acuosa, que es donde se encuentra el RNA. La fase acuosa se precipitó con 400 µl isopropanol y se incubó durante 10 min a temperatura ambiente. Posteriormente, se centrifugó a 8,000 rpm durante 15 min a 4° C para precipitar el RNA. Finalmente, la pastilla se secó durante 10 min a temperatura ambiente y se resuspendió en 100 µl de agua libre de ribonucleasas tratada con DEPC al 0.1%. El RNA se cuantificó en un espectrofotometro (Nanodrop, Thermo Scientific) y se visualizó en un gel de agarosa al 1.5% en TBE 1X.

6.7.3. Síntesis de la cadena complementaria de DNA (cDNA). Para amplificar fragmentos de los genes reporteros de luciferasa y renilla se diseñaron oligonucleótidos específicos para cada gen, como control de carga se incluyó al gen 25sRNA, la secuencia de los oligonucleótidos empleados se muestran en la Tabla 7. Se utilizaron de 250 a 500 ng de RNA total, los cuales se trataron con 2.5 µl DNasa (Invitrogen) a 37°C por 30 min. Finalizado el tratamiento se adicionó la solución de paro y se incubó a 65°C por 10 min para desactivar a la enzima. La reacción de RT-PCR se realizó utilizando el kit one step RT-PCR con platinum Taq (Invitrogen) para ello se colocaron por cada tubo de reacción: 25 µl de buffer de reacción 2X, 20 pmoles de cada uno de los oligonucleótidos, 1 µl RT/ PlatinumR Taq Mix todo en un volumen de 50 µl. La mezcla se incubó a 45°C durante 30 minutos para posteriormente realizar la reacción de amplificación utilizando las siguientes condiciones: desnaturalización inicial de 94°C por 5 minutos y 35 ciclos que consistieron en 94°C por 30 s, 56°C por 45 s y 68°C por 45 s y una extensión final a 68°C por 10 min. Los productos de PCR se corrieron en un gel de agarosa 1.5% en TBE 1X y se visualizaron en un fotodocumentador (Bio-Rad).

Tabla 7. Oligonucleótidos empleados en la RT-PCR

Gen	Oligonucleótido	Fragmento amplificado
Luciferasa Luciferase forward Luciferase reverse	5'-CGCCCTGGTTCCTGGAAC-3' 5'-GAGAATCTCACGCAGGCAGTT-3'	550 pb
Renilla Renilla forward Renillare reverse	5'-TGGTGGGCCAGATGTAAACA-3' 5'-AGAGGCCGCGTTACCATGTA-3'	100 pb
25sRNA RIBOSOMALfor RIBOSOMALrev	5'-GCGGACGGCTCATTATAACA-3' 5'-ATTGTCGTGGCATCCTAACTC-3'	200 pb

6.8. Inmunodetección

Para analizar la presencia de la proteína luciferasa en los extractos proteicos de las células transfectadas se hicieron ensayos de inmunodetección en fase sólida. Para ello cantidades normalizadas de los lisados celulares fueron sometidos a electroforesis en una unidad para geles verticales (BioRad) utilizando un gel de poliacrilamida-SDS al 10% en condiciones desnaturizantes. Las muestras se diluyeron 1:2 en solución de carga de Laemmli (Tris-HCl 62.5 mM pH 6.6, glicerol 25%, SDS 2%, β -mercaptoetanol 2%, azul de bromofenol 0.01 %). Las muestras se hirvieron durante 5 min y se cargaron en los geles. Los geles se transfirieron a membranas de PVDF ImMobilion (Millipore Corporation, Bedford MA) de acuerdo al protocolo descrito por Towbin (1979). Posteriormente, se incubaron con los anticuerpos anti-luciferasa (PROMEGA) diluido 1:5000 como anticuerpo primario y como anticuerpo secundario 1:20,000 (anti-chivo marca Millipore). Se incluyó como control un anticuerpo anti-actina diluido 1:25,000 como anticuerpo primario y anti-ratón diluido 1:9,000. La detección se realizó utilizando el sistema luminiscente ECL (Amersham Life Science)

7. Resultados

7.1. Analizar si la secuencia TATCCA es reconocida por proteínas nucleares obtenidas de trofozoítos de *Entamoeba histolytica*.

La secuencia de reconocimiento al factor de transcripción c-Myb canónica ${}^T/C AAC^G/TG$ ha sido utilizada para caracterizar a proteínas que contienen el dominio de unión a DNA MYB de diferentes organismos desde mamíferos hasta plantas y protozoarios (Ness *et al.*, 1999; Jin *et al.*, 1999; Boschet *et al.*, 2004). Como ya se ha mencionado, el análisis *in silico* realizado por Helios Cárdenas (2008), en su tesis de maestría, demostró que ésta secuencia se encuentra presente en las regiones río arriba del sitio de inicio de la traducción (ATG) de 226 promotores de genes de *E. histolytica*. Así mismo, la secuencia TAACGG fue reconocida específicamente por la proteína recombinante EhMyb10r (Meneses, 2010) por lo que en este trabajo fue utilizada como control.

Otra secuencia de nuestro interés, es la secuencia TATCCA que se encuentra en el promotor α -Amilasa de *O. sativa* la cual también se buscó en las regiones 5' río arriba del ATG de genes de *E. histolytica* (Cárdenas, 2008). El análisis identificó a ésta secuencia en 117 genes de este parásito entre los que se encuentran 9 genes de respuesta a estrés. Ésta secuencia ha sido descrita hasta ahora sólo en promotores de plantas y se ha encontrado que participa en la regulación de genes de respuesta a estrés por inanición como el gen de la α -Amilasa de *Oryza sativa* (Lu *et al.*, 1998). La presencia de ésta secuencia en los promotores de *E. histolytica* podría tener relevancia en la regulación de la expresión de genes involucrados en algún evento de estrés. Para analizar si proteínas nucleares de *E. histolytica* reconocen las secuencias analizadas en las búsquedas *in silico*, realizamos ensayos de unión DNA-proteínas (EMSA) utilizando el oligonucleótido *Mim-1* que contiene el ERM canónico TAACGG y el oligonucleótido que contiene el ERM TATCCA. Este ensayo se llevó a cabo utilizando extractos nucleares de *E. histolytica* y las sondas antes descritas. De manera interesante al utilizar el oligonucleótido *Mim-1*, el cual contiene la secuencia ERM canónica, obtuvimos un complejo DNA-proteína el cual se muestra en figura la 9 (carril 2). Para verificar si este complejo era específico se

realizaron ensayos de competencia utilizando un exceso molar de 100 veces de los oligonucleótidos *Mim-1*, *Mim-1M* (oligonucleótido que contiene la secuencia consenso mutada, GCCAGGT) y *Sp1* (oligonucleótido no relacionado). El complejo DNA-proteína se compitió eficientemente con el exceso molar del oligonucleótido *Mim-1* (Véase figura 9, carril 3) y no se compitió con la sonda que contenía el ERM mutado (*Mim-1M*) (Véase figura 9, carril 4); esto se debe a que las bases mutadas (TAA --->GCC) son relevantes en la interacción DNA-proteína. Por otro lado no se observó competencia cuando se utilizó el competidor no relacionado *Sp1* (Véase figura 9, carril 5). El resultado de este ensayo nos permite concluir que existen proteínas en los extractos nucleares de *E. histolytica* que reconocen la secuencia canónica TAACGG de manera específica. Dado que ésta secuencia también es reconocida por la proteína recombinante EhMyb10r; podemos inferir que las proteínas EhMybR2R3 presentes en los extractos nucleares probablemente estén reconociendo ésta secuencia, sin embargo se requieren anticuerpos específicos contra éstas proteínas para afirmar ésta observación.

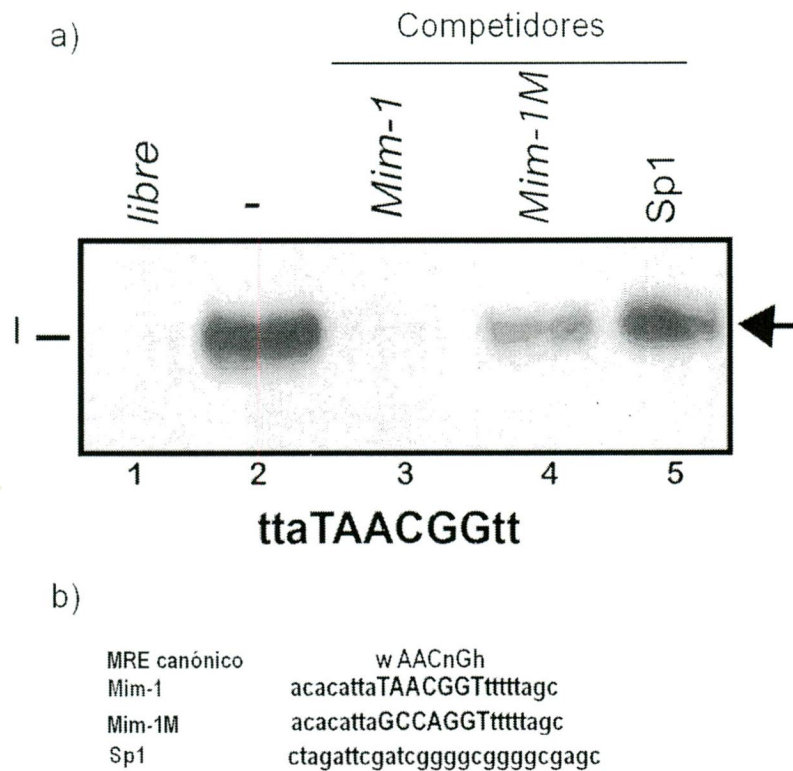
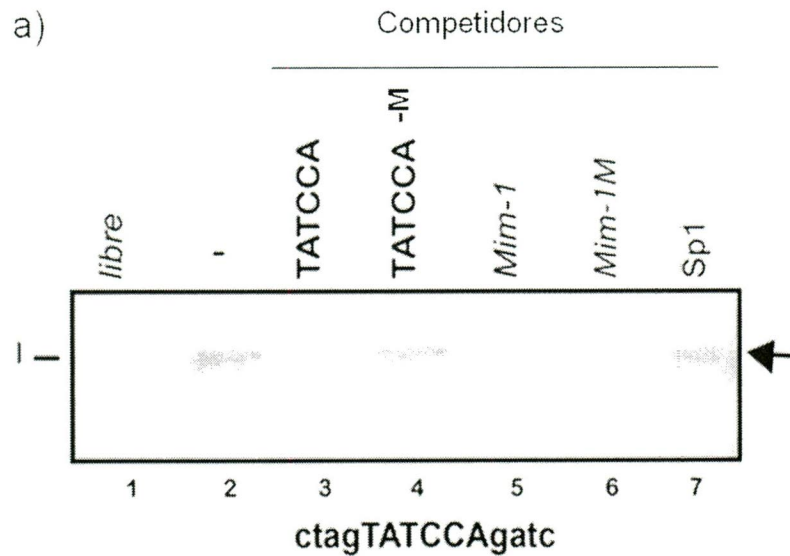


Figura 9. Ensayo de unión a DNA-proteína utilizando extractos nucleares de *E. histolytica* y como sonda a la secuencia *Mim-1*. a) Ensayo EMSA. 1) Sonda libre, 2) Formación de complejo DNA-proteína, 3) Competencia con exceso molar de 100 veces del oligonucleótido de *Mim-1*, 4) Competencia con exceso molar de 100 veces del oligonucleótido de *Mim-1M*, 5) Competencia con exceso molar de 100 veces del oligonucleótido inespecifico *Sp1*. b) Oligonucleótidos utilizados donde se muestra la secuencia MRE consenso y las secuencias de los oligonucleótidos *Mim-1*, *Mim-1M* y *Sp1*. La flecha señala el complejo DNA-proteína.

De igual forma se realizó el análisis de la secuencia TATCCA del promotor α -amilasa por medio de ensayos de unión a DNA-proteína (EMSA) utilizando también extractos nucleares de *E. histolytica* y el oligonucleótido TATCCA. De manera interesante se identificó un sólo complejo (Véase figura 10, carril 2) al igual que en el ensayo con la sonda *Mim-1* (Véase figura 10, carril 5). El complejo observado fue competido con un exceso molar de 100 veces del oligonucleótido específico TATCCA (Véase figura 10, carril 3). De manera relevante el complejo obtenido con ésta secuencia también se compitió con un exceso molar de 100 veces del oligonucleótido *Mim-1*. Este resultado nos indica que la secuencia TATCCA está relacionada a la secuencia *Mim-1* y que probables proteínas con dominio de unión a DNA MYB podrían reconocerla. Estas proteínas podrían ser las que pertenecen a la familia EhMybSHAQKYF ya que proteínas que pertenecen a ésta familia reconocen dicha secuencia en plantas, como es el caso de la proteína OsMyb1 de *O. sativa* (Lu *et al.*, 1998). Por otro lado no se observó competencia cuando se utilizaron los oligonucleótidos *Mim-1M*, TATCCA-M (GCGCCA) lo que nos habla de que las bases mutadas de estos oligonucleótidos intervienen en la interacción DNA-proteína (Véase figura 10, carril 4). También, se realizaron competencias con el mismo exceso molar del oligonucleótido de Sp1 como competidor no relacionado (Véase figura 10, carril 7). Con estos ensayos corroboramos que las secuencias TAACGG y TATCCA, identificadas *in silico* en los diferentes promotores de genes de *E. histolytica*, son reconocidas por proteínas nucleares del parásito y que podrían estar relacionadas con las proteínas EhMyb.



b)

MRE canónico	w AACnGh
Mim-1	acacattaTAACGGTtttttagc
Mim-1M	acacattaGCCAGGTtttttagc
TATCCA	ctagtctTATCCAaaa
TATCCA-M	ctagtctTCGCCAaaa
Sp1	ctagattcgatcggggcggggcgagc

Figura 10. Ensayo de unión a DNA-proteína utilizando extractos nucleares de *E. histolytica* y como sonda a la secuencia TATCCA. a) Ensayo EMSA. **1)** Sonda libre, **2)** Formación de complejo DNA proteína, **3)** Competencia con exceso molar de 100 del oligonucleótido de TATCCA, **4)** Competencia con exceso molar de 100 del oligonucleótido de TATCCA-M, **5)** Competencia con exceso molar de 100 veces del oligonucleótido de *Mim-1*, **6)** Competencia con exceso molar de 100 veces del oligonucleótido de *Mim-1M*, **7)** Competencia con exceso molar de 100 veces del oligonucleótido inespecífico *Sp1*. b) Oligonucleótidos utilizados donde se muestra la secuencia MRE consenso y las secuencias de los oligonucleótidos *Mim-1*, *Mim-1M*, TATCCA, TATCCA-M y *Sp1*. La flecha señala el complejo DNA-proteína.

Como se había mencionado anteriormente, dado a que no se tienen anticuerpos contra las proteínas EhMyb de *E. histolytica*, se llevó a cabo un experimento con extractos proteicos de bacterias en la que se indujo la producción de las proteínas EhMyb10r, que pertenece a la familia EhMybR2R3 y la proteína EhMybS3r miembro de la familia EhMybSHAQKYF. La finalidad de este ensayo fue conocer si a la secuencia TATCCA se pueden unir las proteínas de la familia EhMybR2R3 o de la familia EhMybSHAQKYF. Para el ensayo de retardamiento se utilizó a la sonda TATCCA y proteínas de extractos crudos provenientes de bacterias transformadas con el plásmido pGEX-EhMyb10r y bacterias transformadas con el plásmido pGEX-EhMybS3r. Como control negativo se utilizaron extractos bacterianos que sólo expresan a la proteína GST. Cabe mencionar que se utilizaron extractos bacterianos ya que hasta el momento no se tiene una proteína recombinante totalmente purificada. En la figura 11 podemos observar el resultado de este ensayo. Como se puede apreciar en el carril 1, que corresponde al control de GST, no hay formación de complejos; en el carril 2 donde se utilizó la proteína EhMyb10r tampoco hubo formación de complejos DNA-proteína. Sin embargo, al agregar el extracto proteico de la proteína inducida EhMybS3r se puede apreciar la formación de un complejo DNA-proteína (Véase figura 11, carril 3). Con este experimento podemos sugerir que la secuencia TATCCA podría estar siendo reconocida por proteínas EhMybSHAQKYF; sin embargo, es necesario contar con proteínas purificadas así como anticuerpos que nos permitan aseverar ésta observación.

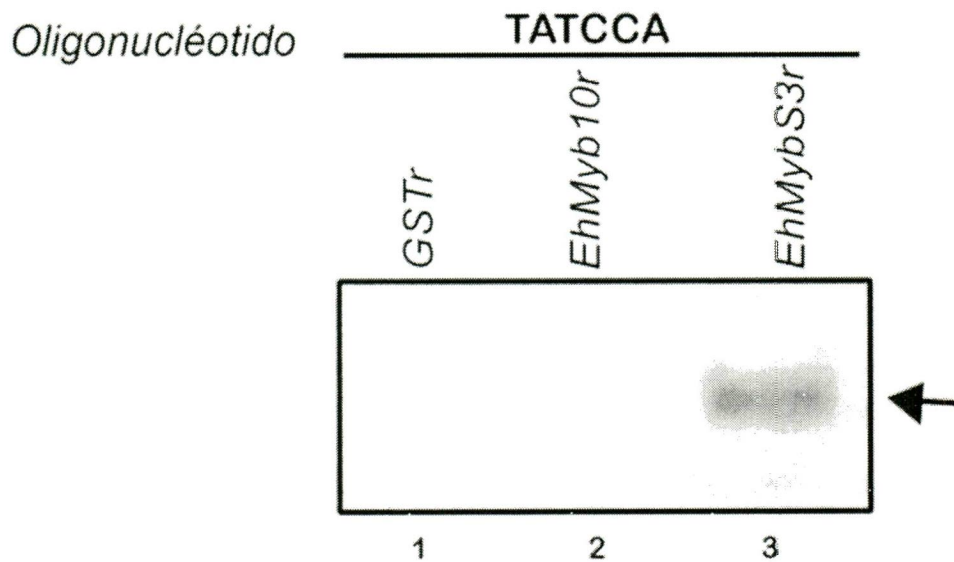


Figura 11. Ensayo de unión a DNA utilizando extractos bacterianos que expresan a la proteína recombinante EhMyb10r (Familia EhMybR2R3) y a la proteína EhMybS3r (Familia EhMybSHAQKYF) con el oligonucleótido TATCCA. Extractos de bacterias que sobreexpresan a las proteínas 1) GST, 2) EhMyb10r y 3) EhMybS3r. La flecha señala el complejo DNA-proteína.

7.2. Evaluación de la funcionalidad de la secuencia TATCCA en la actividad del promotor del gen *HSP100* de *E. histolytica*

Para evaluar la funcionalidad de la secuencia TATCCA en la actividad del promotor del gen *HSP100* de *E. histolytica* fue necesario implementar un sistema de genes reporteros que nos permitiera medir la actividad de algunos promotores de genes de *E. histolytica*. Para ello se utilizaron los vectores: pGL3-Basic y pRL-null que contienen la secuencia que codifica para Luciferasa y Renilla, respectivamente (véase figura 8). Ya que para que se expresen los genes reporteros Luciferasa, CAT o GFP en este parásito es necesario clonarles señales de poliadenilación propias de genes amebianos, primeramente se sustituyó la señal de poliadenilación del virus SV40 de los vectores pGL3-Basic y pRL-null con la región 3' UTR del gen de *actina* de *E. histolytica*. Para ello se amplificó un fragmento de 600 pb que corresponde al 3' UTR del gen de *actina* utilizando como molde al plásmido pA5'A3'CAT (Nickel *et al.*, 1994). El amplicón de 600 pb que corresponde al 3' UTR de *actina* fue analizado en un gel de agarosa al 1%, en el cual se observa al producto de 600 pb que corresponde al tamaño esperado (Véase figuras 12 y 13). Una vez obtenido el amplicón se procedió a la digestión de éste, junto a los plásmidos pGL3-Basic y pRL-null. El producto de la digestión enzimática se visualizó en un gel de agarosa al 1% (Véase figuras 12b y 13b). Estos productos digeridos fueron purificados y cuantificados para llevar a cabo la ligación y la transformación de células DH-5 α . Los candidatos obtenidos fueron sometidos a restricción con las enzimas *Bam*HI y *Xba*I y analizados mediante un gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio. En este análisis se observó la liberación del inserto de 600 pb correspondiente al 3'UTR del gen de *actina* (Figuras 12c y 13c). De ésta forma se obtuvo un candidato para la construcción realizada en el vector pRL-null y 3 candidatos en el vector pGL3-Basic. Todos los candidatos fueron secuenciados para verificar la secuencia del 3'UTR de *actina* en las clonaciones (Véase figuras 12 y 13). A los vectores así obtenidos se les nombró *pGL3-3'A* y *pRL-null-3'A*.

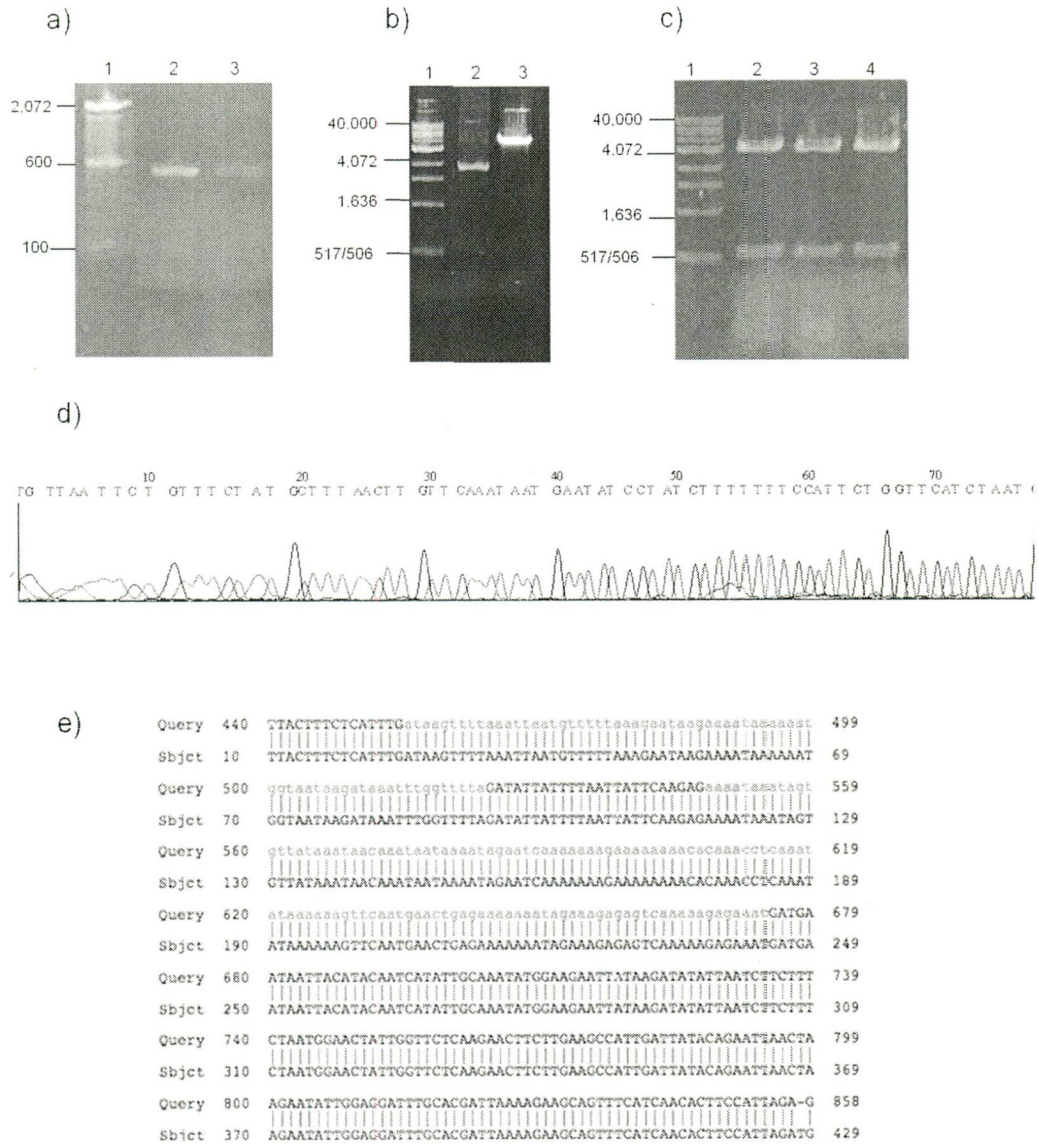


Figura 12. Clonación del fragmento de 600 pb del 3'UTR del gen de *actina* de *E. histolytica* en el vector pGL3-Basic. a) Amplificación del fragmento de 600 pb del 3'UTR del gen de *actina*. 1) Marcador de talla molecular de 1kb. 2) y 3) Amplicón del fragmento de 600 pb del 3'UTR de *actina*. b) Restricción del vector pGL3-Basic e inserto del 3'UTR de *actina*. 1) Marcador de talla molecular. 2) Fragmento del 3'UTR de *actina*. 3) Vector pGL3-Basic restringido. c) Análisis de restricción del DNA plasmídico de colonias candidatas de clonación. 1) Marcador de talla molecular de 1Kb, 2, 3 y 4) DNA plasmídico que libera el inserto de 600 pb del 3'UTR del gen de *actina*. d) Electroferograma de secuenciación de una clona candidata. e) Alineamiento de la secuencia obtenida en la secuenciación y la secuencia del 3'UTR del gen de *actina* obtenida de la base de datos *Pathema Entamoeba*.

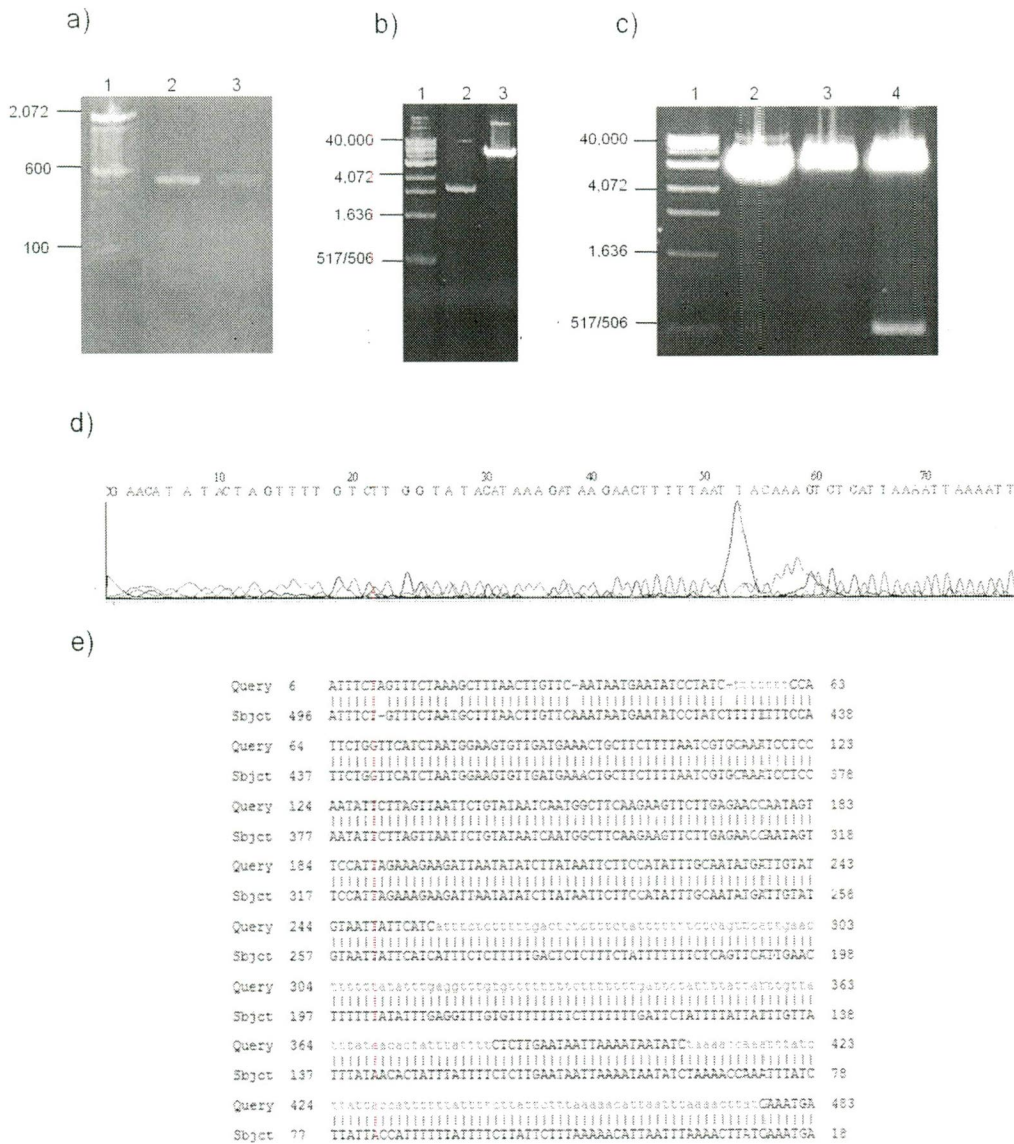


Figura 13. Clonación del fragmento de 600 pb del 3'UTR del gen de *actina* de *E. histolytica* en el vector pRL-null. a) Amplificación del fragmento de 600 pb del 3'UTR del gen de *actina*. 1). Marcador de talla molecular de 1kb, 2 y 3). Amplicón del fragmento de 600 pb del 3'UTR de actina, b) Restricción del vector pRL-null e inserto del 3'UTR del gen de actina. 1) Marcador de talla molecular, 2). Fragmento del 3'UTR del gen de actina 3). Vector pRL-null restringido. c) Análisis de restricción del DNA plasmídico de colonias candidatas de clonación. 1) Marcador de talla molecular de 1Kb, 2,3 y 4) DNA plasmídico que libera inserto de 600 pb. d) Electroferograma de secuenciación de una clona candidata. e) Alineamiento de la secuencia obtenida en la secuenciación y la secuencia del 3'UTR del gen de actina obtenida de la base de datos *Pathema Entamoeba*.

Una vez obtenidas y verificadas las construcciones de los plásmidos pGL3-3'A y pRL-null-3'A, se continuó con la implementación del sistema de genes reporteros. En ésta etapa se clonaron dos fragmentos del promotor del gen de la adhesina *Ehadh112*, uno correspondiente a 469 pb y otro de 151 pb. Se eligieron estas regiones debido a que ya han sido caracterizadas con el gen reportero CAT. En este sistema se vio que la actividad transcripcional del fragmento de 469 pb del promotor del gen *EhAdh112* es alta y similar a la actividad del promotor de actina y que la actividad del fragmento de 150 pb es del 20% con respecto al fragmento de 469 pb (Azuara *et al.*, 2004). Este resultado indica que dentro de las 469 pb se encuentran los elementos necesarios para la regulación transcripcional del gen *Ehadh112*, caracterizándolo como un promotor fuerte, y además que el fragmento de 151 pb es el promotor mínimo (Azuara *et al.*, 2004). Para la clonación de éstas regiones se diseñaron y sintetizaron oligonucleótidos específicos con los sitios de restricción *XhoI/HindIII* para amplificar los fragmentos de 469 pb y de 151 pb, utilizando como molde a la construcción p469CAT, la cual contiene ambos fragmentos (Azuara *et al.*, 2007). Estos fragmentos fueron clonados en el vector pGL3-3'A que es el vector donde se analizó la funcionalidad de la secuencia TATCCA. En el vector pRL-null-3'A se clonó la región de 150 pb con la finalidad de tener una construcción que fue cotransfectada junto al vector donde se analizaría la secuencia TATCCA y se planteo utilizarla para normalizar la actividad obtenida por luciferasa. (Figuras 14,15 y 16).

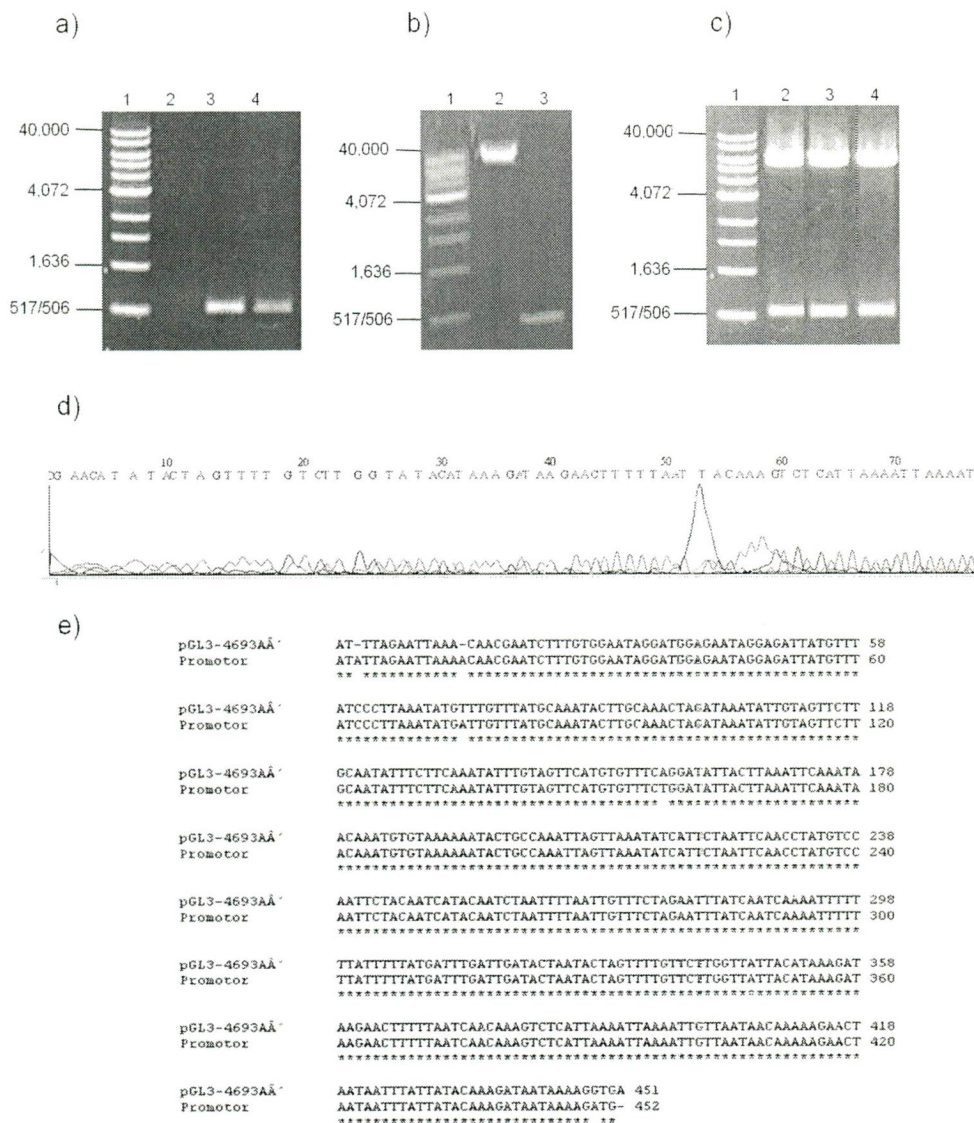


Figura 14. Clonación del fragmento de 469 pb del promotor del gen *Ehadh112* de *E. histolytica* en el vector pGL3-3'A. a) Amplificación del fragmento de 469 pb del gen *Ehadh112*. 1) Marcador de talla molecular de 1Kb, 2 y 3) Amplicón de 469 pb del gen *Ehadh112*, b) Restricción del vector pGL3-3'A y del fragmento del gen *Ehadh112*. 1) Marcador de talla molecular. 2) Vector pGL3-3'A restringido con las enzimas *BamHI/HindIII*, 3) Restricción del fragmento del gen *Ehadh112*. c) Análisis de restricción del DNA plasmídico de colonias candidatas de clonación. 1) Marcador de talla molecular de 1Kb, 2, 3 y 4) DNA plasmídico que libera inserto de 469 pb. d) Electroferograma de la secuencia de una clona candidata. e) Alineamiento de la secuencia obtenida en la secuenciación y la secuencia del promotor del gen *Ehadh112* obtenida de la base de datos *Pathema Entamoeba*.

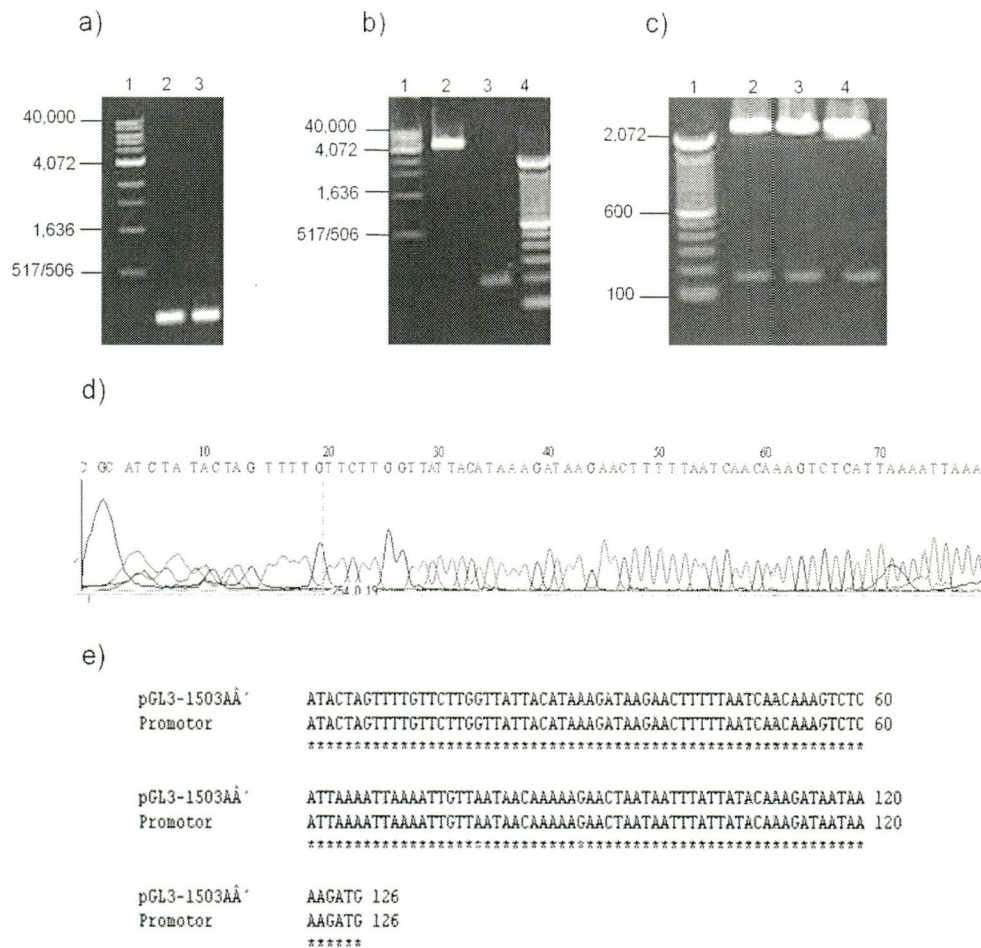


Figura 15. Clonación del fragmento de 150 pb del promotor del gen *Ehadh112* de *E. histolytica* en el vector pGL3-3'A. a) Amplificación del fragmento de 150 pb del gen de la *Ehadh112*. 1) Marcador de talla molecular de 1Kb, 2 y 3) Amplicón de 150 pb del gen *Ehadh112*. b) Restricción del vector pGL3-3'A y del fragmento del gen *Ehadh*. 1) Marcador de talla molecular, 2) Vector pGL3-3'A restringido 3) Restricción del fragmento del gen *Ehadh112*. c) Análisis de restricción del DNA plasmídico de colonias candidatas de clonación. 1) Marcador de talla molecular de 100 pb, 2, 3 y 4) DNA plasmídico que liberan el inserto de 150 pb. d) Electroferograma de secuenciación de clona candidata. e) Alineamiento de la secuencia obtenida en la secuenciación y la secuencia del promotor del gen de la adhesina obtenida de la base de datos *Pathema Entamoeba*.

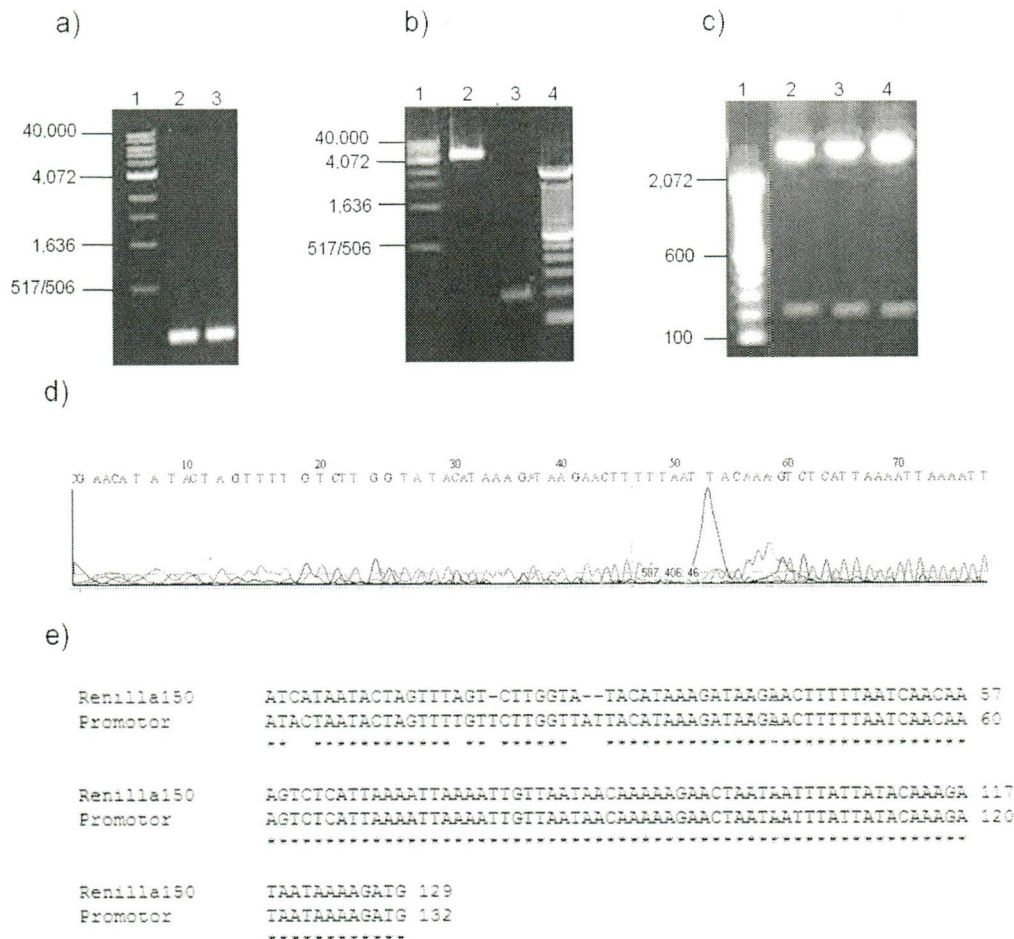


Figura 16. Clonación del fragmento de 150 pb del promotor del gen *Ehadh112* de *E. histolytica* en el vector pRL-null. a) Amplificación del fragmento de 150 pb del gen de la *Ehadh112*. 1). Marcador de talla molecular de 1Kb, 2 y 3) Amplicón de 150 pb del gen *Ehadh112*, b) Restricción del vector pRL-null y del fragmento del gen *Ehadh112*. 1) Marcador de talla molecular, 2) Vector pRL-null restringido. 3) Restricción del fragmento del gen *Ehadh112*. c) Análisis de restricción del DNA plasmídico de colonias candidatas de clonación. 1) Marcador de talla molecular de 100 pb, 2,3 y 4) DNA plasmídico que libera inserto de 150 pb. d) Electroferograma de la secuenciación obtenida de la clona candidata. e) Alineamiento de la secuencia obtenida en la secuenciación y la secuencia promotor del gen de la *Ehadh112* obtenida de la base de datos *Pathema Entamoeba*.

Debido a que el segundo objetivo planteado en este trabajo de investigación fue analizar funcionalmente a la secuencia TATCCA, se seleccionó el promotor del gen *HSP100* de *E. histolytica* (Véase figura 17), el cual contiene a esta secuencia. La elección de este promotor se basó en el análisis *in silico* realizado por Cárdenas (2008), en donde el encontró que este gen posee el elemento de reconocimiento a MYB (TATCCA) a -285 pb río arriba del sitio de inicio de la traducción (ATG), además de que este elemento se encuentra en el contexto de un promotor y cuenta con una caja TATA ubicada a -44 pb (Figura 17). Otra característica tomada en cuenta es que este promotor ya ha sido parcialmente caracterizado por el grupo de Bernes (2005), el cual encontró que cuando trofozoítos de *E. histolytica* es sometida a estrés calórico de 42° C el gen *HSP100* se sobre expresa. Para llevar a cabo el ensayo funcional se obtuvieron las construcciones pGL3-HSP100-2853'A, la cual posee 285 pb río arriba del ATG del gen *HSP100* y la construcción pGL3-HSP100-2603'A, la cual posee 260 pb río arriba del ATG del gen, *HSP100* en la cual se deletó la secuencia TATCCA (Figura 17). Para ambas construcciones se amplificó el promotor del gen de *Hsp100* usando como molde DNA genómico. La secuencia de oligonucleótidos empleados se muestran en la Figura 17.

-285

```

-313 ATTTAAATAATAACTTAACATTTATCAAATAGATTTAGACTCTTATTAATAAAACAATTTA
-253 ATTACTCATTATTTTGGAGTGTTTGATAATCATTTCATTCTCATTCCCTTCATTTATCATT
-193 GTCATTTTGGCTGTTAATTATGTTATTATTAGTTTATATAAATCCACGTTGATCCACGTA
-133 TACATGAATACATGAATAAGAAAGTGTGAATAACAGCCAACACATCAATAAGCCAAACACA
-73 TCAACCATACTGAGTATTTAAAGGAAGTGAAGAAATAATTAGCATTTTAGAAATAAGGTA
-13 TGGATCCAAACAAATGGACAGATGCAACAGTTCAAATGTTCAAAGAATC
+1

```

Figura 17. Secuencia nucleotídica del promotor del gen *HSP100* de *E. histolytica*. En negritas se encuentra la ERM TATCCA, subrayado se encuentran las secuencias que se utilizaron para el diseño de los oligonucleotidos que se utilizaron para amplificar el promotor del gen y en la caja se muestra su posible caja TATA.

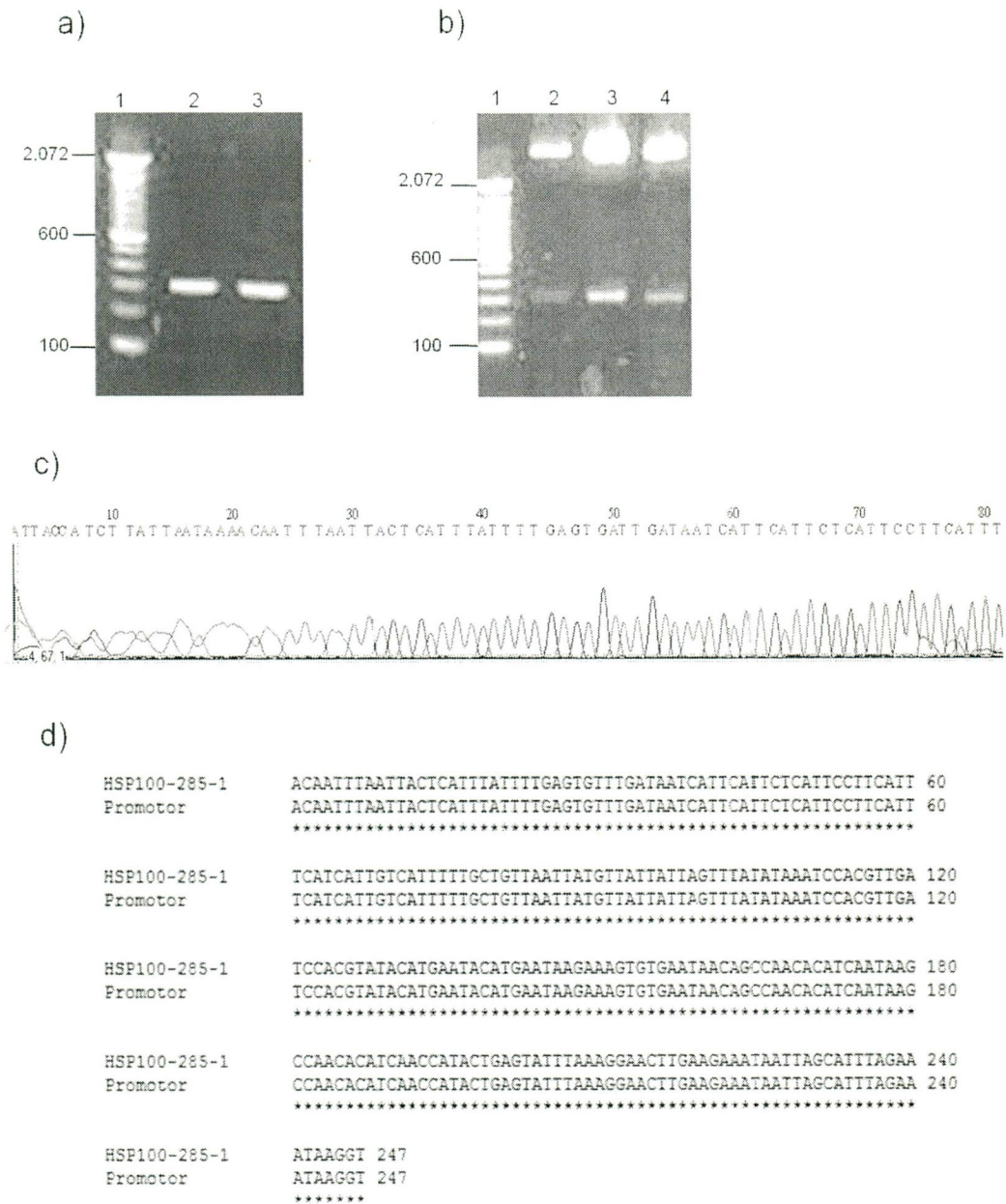


Figura 18. Clonación del fragmento de 285 pb del promotor del gen *HSP100* de *E. histolytica* en el vector pGL3-3'A. a) Amplificación del fragmento de 285 pb del gen *HSP100*. **1)** Marcador de talla molecular de 100 pb. **2 y 3)** Amplicón de 285 pb del promotor del gen *HSP100*. b) Análisis de restricción del DNA plasmídico de colonias candidatas de clonación. **1)** Marcador de talla molecular de 100 pb. **2,3 y 4)** Colonias que liberaron el inserto de 285 pb. c) Electroferograma de la secuenciación obtenida de la clona candidata. d) Alineamiento de la secuencia obtenida en la secuenciación y la del promotor del gen *HSP100* obtenida de la base de datos *Pathema Entamoeba*.

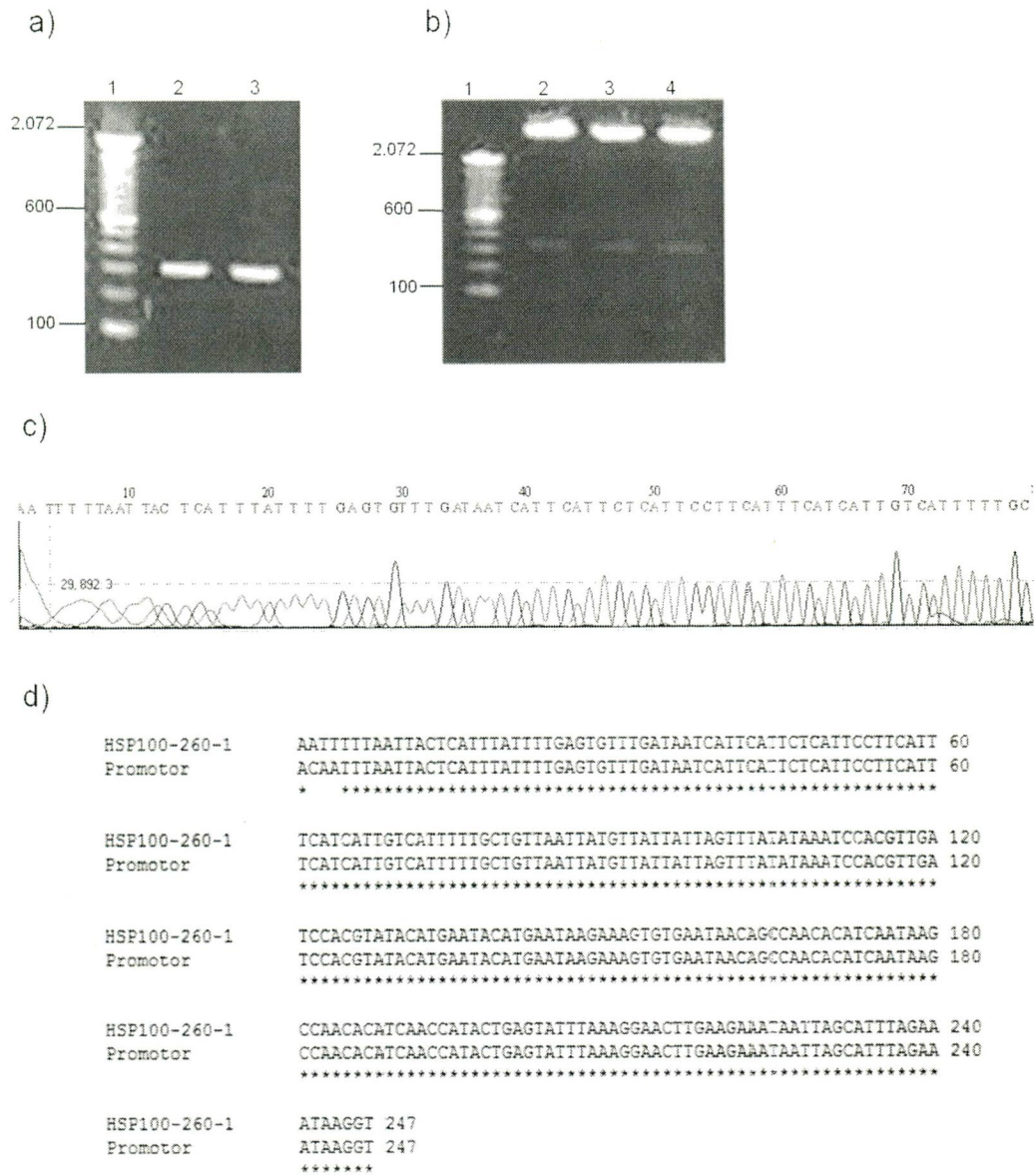


Figura 19. Clonación del fragmento de 260 pb del promotor del gen *HSP100* de *E.histolytica* en el vector pGL3-3'A. a) Amplificación del fragmento de 260 pb del gen *HSP100*. 1). Marcador de talla molecular de 100 pb. 2 y 3). Amplicón de 285 pb del gen *HSP100*, b) Análisis de restricción del DNA plasmídico de colonias candidatas de clonación. 1) Marcador de talla molecular de 100 pb. 2,3 y 4) Colonias que liberaron el inserto de 260 pb. c) Electroferograma de la secuenciación obtenida de la clona candidata. d) Alineamiento de la secuencia obtenida en la secuenciación y la del promotor de 260pb del gen *HSP100* obtenida de la base de datos *Pathema Entamoeba*.

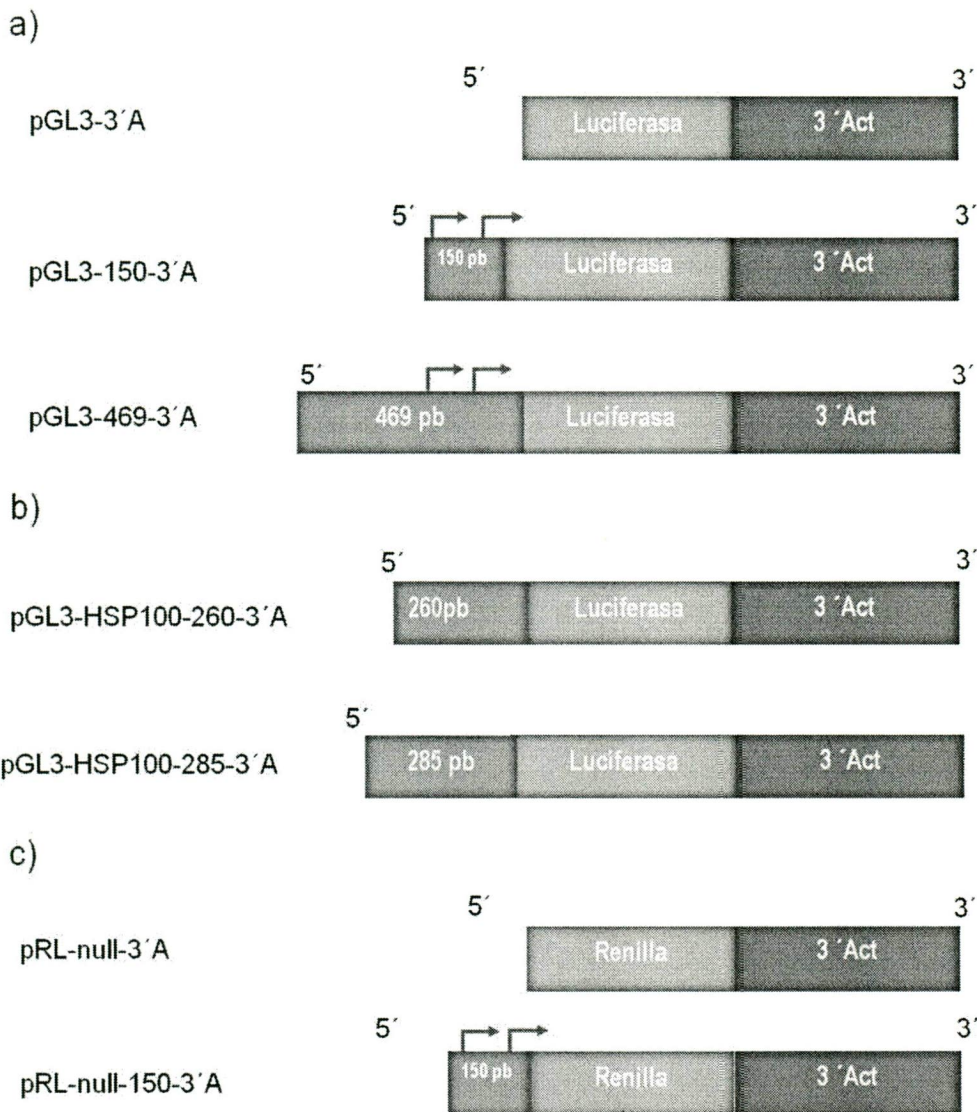


Figura 20. Representación esquemática de las construcciones realizadas para la implementación del sistema de vectores reporteros. a) Se muestran las construcciones que tienen el gen reportero de luciferasa y que fueron utilizadas como control de estandarización del sistema de genes reporteros. b) Construcciones utilizadas para evaluar la funcionalidad del ERM TATCCA en *E. histolytica*. c) Construcciones que contienen al gen de *Renilla* que servirán para la normalización de luciferasa en el sistema de reporteros.

Obtenidas las construcciones pGL3-3'A, pGL3-150-3'A y pGL3-469-3'A, se iniciaron los ensayos de transfección mediante electroporación de trofozoítos de *E. histolytica*. Primeramente se llevó a cabo un ensayo para determinar la eficiencia de transfección utilizando el plásmido pKT-GFP5, ya que éste tiene clonado el gen que codifica para la proteína Rab, fusionada a la proteína fluorescente GFP (Saito *et al.*, 2005). Las células transfectadas se cosecharon 48 hrs post-transfección y se evaluó la eficiencia de transfección mediante el uso de microscopía confocal. Para el primer ensayo de eficiencia de transfección se utilizaron las condiciones de electroporación reportadas por Purdy (1995) con el gen reportero CAT las cuales consisten en utilizar 2.8×10^6 trofozoítos y dar dos pulsos de 1200 Volts y 25 μ F. Con éstas condiciones se obtuvo una eficiencia de transfección del 100%, sin embargo la viabilidad celular fue muy baja (menor al 20%). (Véase figura 21). La figura 21 muestra la expresión de la proteína Rab fusionada a GFP que nos indica que las amibas están siendo transfectadas, sin embargo, se observa poca viabilidad celular.

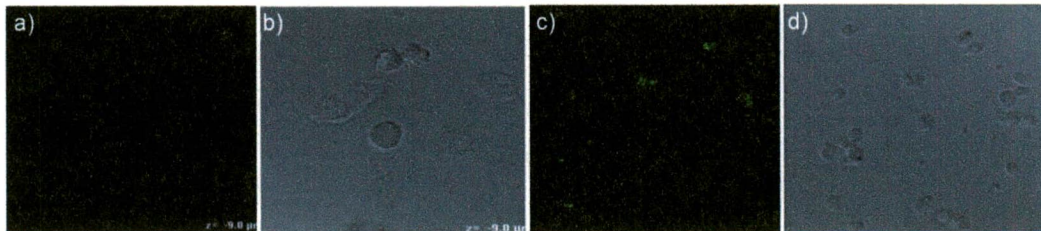


Figura 21. Eficiencia de transfección de trofozoítos de *E. histolytica* utilizando al plásmido pKT-GFP5. Microscopía confocal 60X con parásitos adheridos en laminillas fijados con paraformaldehído al 4%. **a)** Imagen en campo claro (Nomarski) de amibas sin transfectar. **b)** Contraste de fases de amibas sin transfectar. **c)** Imagen en campo claro (Nomarski) de amibas de amibas transfectadas con el plásmido pKT-GFP5. **d)** Contraste de fases de amibas transfectadas con el plásmido pKT-GFP5.

Debido a la poca viabilidad celular obtenida en los ensayos, las condiciones del protocolo de transfección se modificaron. Estos cambios consistieron en aumentar el número de células a 4×10^6 y disminuir el voltaje de 1200 a 500 Volts de acuerdo a lo reportado por Singh (1997). Con estas condiciones se obtuvo una eficiencia de transfección del 100%, así como una mejora considerable en la viabilidad celular. Lo cual indica que éstas son óptimas para llevar a cabo las transfecciones (Figura 22).

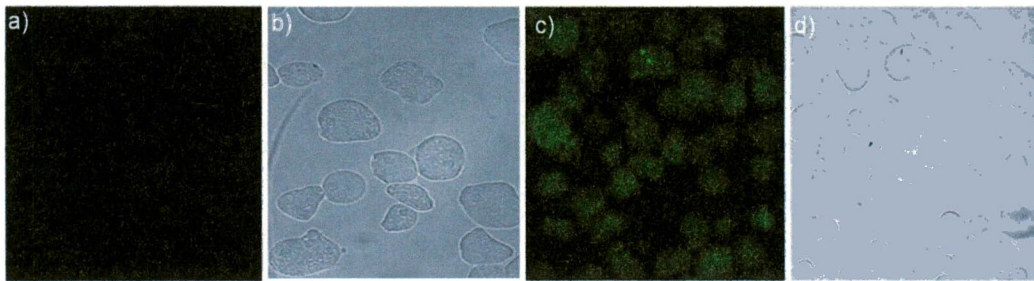


Figura 22. Eficiencia de transfección de trofozoítos de *E. histolytica* utilizando al plásmido pKT-GFP5. Microscopía confocal 60X con parásitos adheridos en laminillas fijados con paraformaldehído al 4%. **a)** Imagen en campo claro (Nomarski) de amibas sin transfectar. **b)** Contraste de fases de amibas sin transfectar. **c)** Imagen en campo claro (Nomarski) de amibas de amibas transfectadas con el plásmido pKT-GFP5. **d)** Contraste de fases de amibas transfectadas con el plásmido pKT-GFP5.

Previo al ensayo de luciferasa en amiba, se hizo una curva de concentración de proteína luciferasa recombinante (promega), esto con la finalidad de conocer la eficiencia y sensibilidad del equipo al cuantificar concentraciones crecientes de la proteína. Para llevar a cabo la curva, primeramente, se realizó la dilución 1:3 del stock de la proteína luciferasa recombinante a partir de la cual se llevaron a cabo diluciones seriadas, de tal forma que la concentración de la proteína recombinante fue de 0.03, 0.3, 3 y 33 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ (Véase figura 23). El equipo Fluoroskan Ascente FL detectó a la proteína luciferasa a partir de una concentración de 0.03 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, mientras que las unidades máximas de luciferasa se observaron a una concentración de 33 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$. Posterior a ésta primera prueba se realizó un ensayo de sensibilidad utilizando extractos citoplasmáticos de células MDCK transfectadas con el plásmido pXP2-CD1 que contiene al gen reportero de luciferasa, bajo el control del promotor del gen de ciclina D1 humana, con ello evaluamos el funcionamiento del equipo al cuantificar la expresión de luciferasa en estos extractos celulares (Figura 23b). Para realizar la prueba de cuantificación de la expresión de luciferasa se utilizaron las concentraciones de 0.782, 1.56, 3.12, 6.25, 12.51 y 25.02 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ de proteína. El resultado de este ensayo muestra que el equipo fue capaz de detectar la expresión de luciferasa a partir de una concentración de 0.782 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ de proteína y que al utilizar la concentración de 25.02 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ se observa un incremento máximo en las URL (Unidades Relativas de Luciferasa).

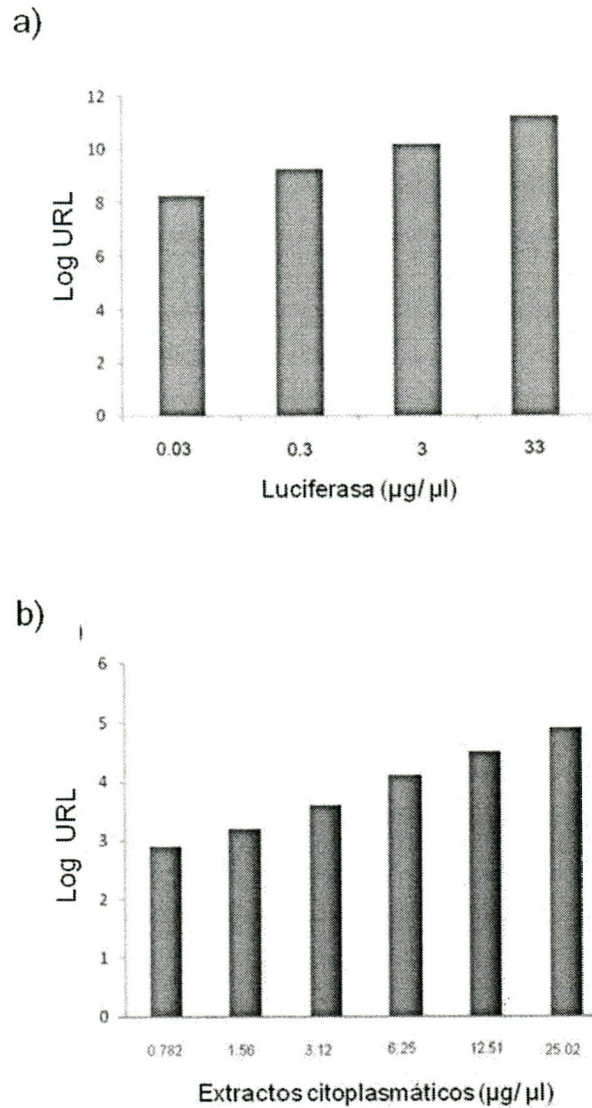


Figura 23. Curva estándar de luciferasa recombinante. a) Curva estándar de proteína luciferasa recombinante b) Curva de expresión de luciferasa en extractos citoplasmáticos de células MDCK transfectadas con el plásmido pXP2-CD1 que contiene al gen reportero de luciferasa, bajo el control del promotor del gen de la ciclina D1 humana.

Posteriormente, se transfectó el plásmido pTP4i con las condiciones de transfección antes descritas. Se utilizó este plásmido ya que tiene clonado al promotor al gen de luciferasa bajo el promotor de la lectina, que es un promotor fuerte (Singh *et al.*, 1998). Este plásmido fue donado gentilmente por la Dra. Singh. Primeramente, se llevó a cabo una cinética de tiempo con la cual analizamos diferentes tiempos de expresión de la luciferasa. Los tiempos que se evaluaron fueron 12, 18 y 24 hrs. Los resultados de este experimento nos muestran que la proteína luciferasa tiene un pico máximo de expresión a las 18 hrs y que este disminuye a partir de las 24 hrs (Figura 24). Con este ensayo seleccionamos el tiempo de expresión de luciferasa de 18 hrs post transfección. El tiempo de expresión máxima de la expresión de luciferasa coincide con los datos reportados por Hamman (1995) y Gilchrist (1995), sin embargo las actividades que obtuvimos fueron inferiores a las obtenidas por ellos.

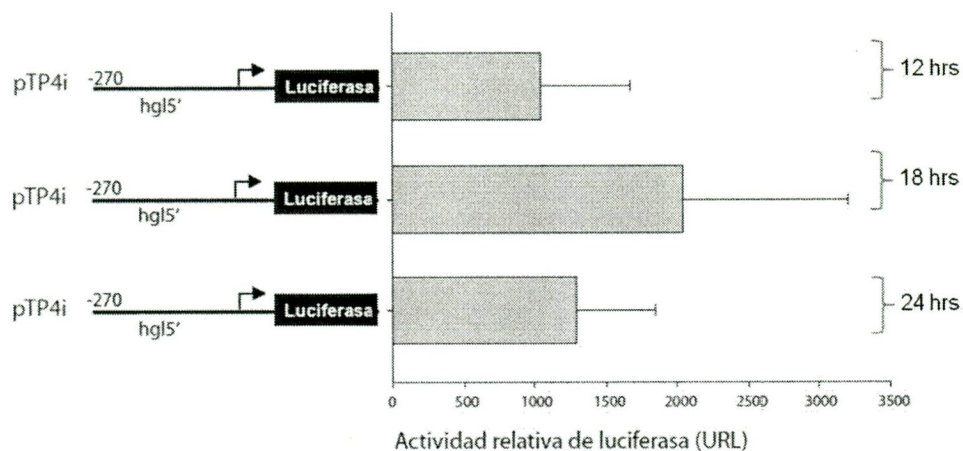


Figura 24. Cinética de expresión de la proteína luciferasa en amibas transfectadas con la construcción pTP4i. a) Representación esquemática de la construcción pTP4i utilizada como control en el ensayo de estandarización de la transfección. Esta construcción se encuentra bajo el control del promotor del gen de la subunidad hgl de la lectina. b) Actividad relativa de luciferasa de la construcción pTP4i. Para cada ensayo se transfectó por electroporación 40 µg de la construcción plasmídica en trofozoítos de *E. histolytica*. La actividad transcripcional se determinó a diferentes intervalos de tiempo (12, 18 y 24 hrs) post-transfección.

Al transfectar las construcciones pGL3-469-3'A, la cual contiene al promotor de 469 pb del gen *Ehadh112* y la construcción sin promotor pGL3-3'A (Véase figura 25). Encontramos que con las condiciones establecidas pudimos determinar diferencias en la expresión de luciferasa entre la construcción que contiene un promotor y la que no lo tiene; sin embargo los datos obtenidos seguían siendo inferiores a los reportados por otros grupos. Para corroborar que el gen de la luciferasa se estaba expresando, correctamente realizamos ensayos de RT-PCR (Figura 25). Los ensayos de RT-PCR muestran que el gen reportero de luciferasa se transcribe en *E. histolytica*. De manera interesante, encontramos diferencias de expresión entre las construcciones pGL3-469-3'A, y pGL3-3'A; sin embargo en el control negativo de la reacción de retrotranscripción también se detectó el transcrito de luciferasa, lo cual indica una contaminación de DNA plasmídico. El DNA plasmídico provenía de las altas concentraciones de plásmido que se utilizan durante la transfección por electroporación de amibas (40 µg) y también demuestran que el plásmido está siendo resistente a las digestión con la DNasa que utilizamos para tratar el RNA.

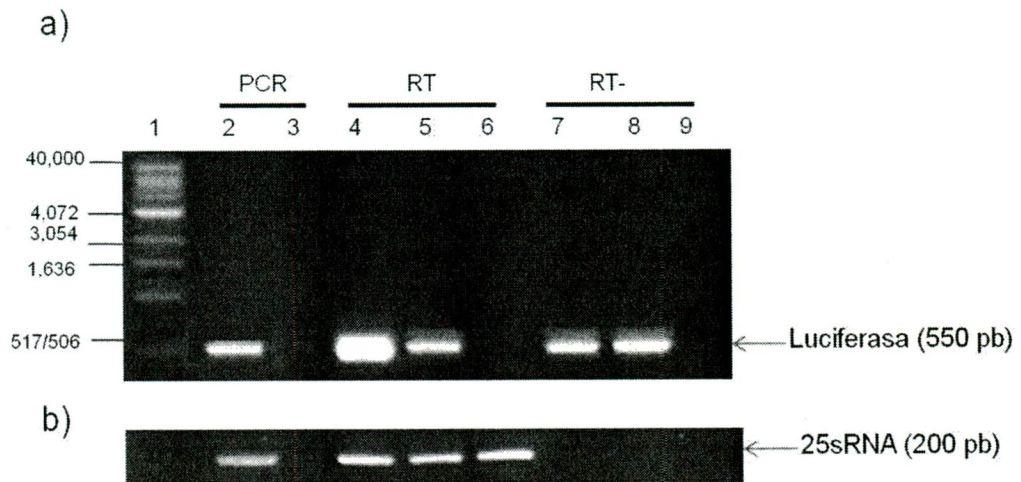


Figura 25. Detección del transcrito del gen de *luciferasa* en amibas transfectadas mediante electroporación con la construcciones pGL3-469-3'A y pGL3-3'A. a) Detección del RNAm de luciferasa **1)** Marcador de talla molecular de 500 pb. **2)** Control positivo del PCR. **3)** Control negativo de PCR. **4)** Transcrito del gen de luciferasa de amibas transfectadas con la construcción pGL3-469-3'A que contiene al con el promotor de 469 pb del gen *Ehadh112*. **5)** Transcrito del gen de luciferasa de amibas transfectadas con el vector vacío de luciferasa pGL3-3'A. **6)** Control de amibas sin transfectar. **7, 8 y 9)** Control negativo de retrotranscripción 4, 5 y 6. **b)** Control de carga 25s RNA, amplificado bajo las mismas condiciones que gen de *luciferasa*. Las flechas señalan la detección de los respectivos amplicones.

Debido a las dificultades presentadas en los ensayos de transfección por electroporación descritos se decidió utilizar una nueva metodología de transfección de amibas por medio de lipofección, utilizando el reactivo *Superfect*. Ésta metodología ya ha sido empleada en transfecciones estables de trofozoítos para sobreexpresar diferentes genes como son HMG1 (Abhyankar *et al.*, 2008) y EhMybdr (Ehrenkauf *et al.*, 2009). Una de las ventajas que posee el uso de lípidos sobre la electroporación es que utiliza una menor concentración de DNA plasmídico (10 µg), así como un menor número de células. Para este ensayo primeramente, se realizó una cinética de tiempo con la cual evaluamos cual es el tiempo optimo de expresión de la proteína luciferasa. Para ello, se transfectaron trofozoítos de *E. histolytica* con el plásmido pGL3-469-3'A. Posteriormente las células se cosecharon a las 18, 24 y 48 hrs post-transfeccion. De manera interesante encontramos que el mejor tiempo de expresión de la luciferasa se presenta a las 18 horas post-transfección y que ésta actividad se ve disminuida a partir de las 24 hrs en un 30% con respecto al tiempo de 18 hrs (Véase figura 27). Para corroborar estos resultados se llevo a cabo un ensayo de inmunodetección en fase sólida en el cual utilizamos extractos proteicos de *E. histolytica* transfectadas y el anticuerpo policlonal anti-luciferasa (Véase figura 27). El resultado de la inmunodetección revela la presencia de la proteína luciferasa (61 kDa) en los extractos de amibas transfectadas con el plásmido pGL3-469-3'A, el peso obtenido corresponde al peso de la proteína luciferasa recombinante, la cual fue utilizada como control positivo. Sin embargo, también se detectó la presencia de otra banda que corresponde a un peso molecular de 50 kDa lo cual sugiere que la proteína luciferasa podría haberse degradando, debido a la batería lítica que posee este parásito principalmente compuesta por proteasas. Por lo que pusimos especial énfasis en incluir inhibidores de cisteín proteasas como E-64, tanto en la transfección como durante la lisis celular.

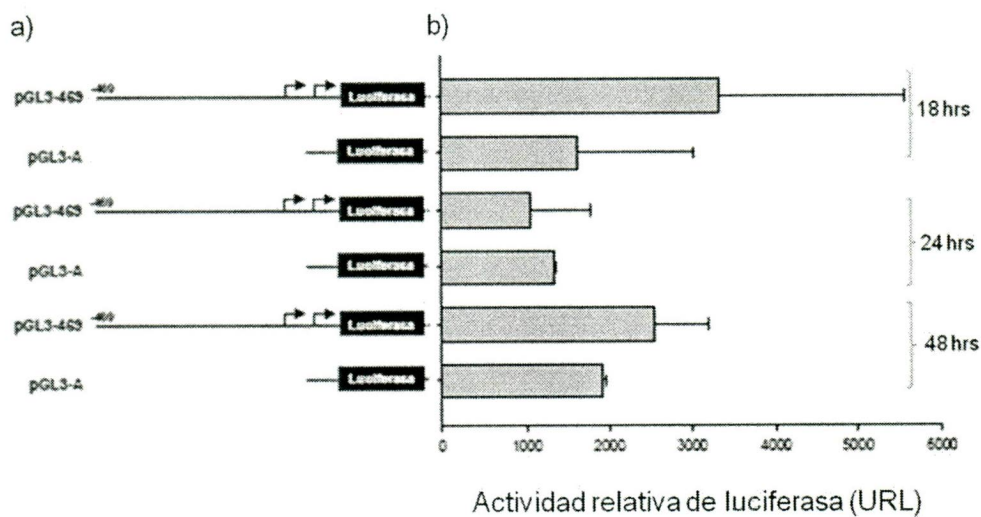


Figura 26. Cinética de expresión de la proteína luciferasa en amibas transfectadas por lipofección con las construcciones pGL3-469-3'A y pGL3-3'A. a) Representación esquemática de las construcciones utilizadas como control en el ensayo de estandarización de la transfección. Las construcciones utilizadas fueron pGL3-4693A la cual contiene un promotor fuerte y pGL3-150-3A que contiene un promotor mínimo. b) Actividad relativa de luciferasa de las construcciones analizadas. Para cada ensayo se transfectó 10 µg de las construcciones plasmídicas en trofozoítos de *E. histolytica*. La actividad transcripcional se determinó a diferentes intervalos de tiempo (18, 24 y 48 hrs) post-transfección. La actividad mostrada es el resultado de tres experimentos independientes realizados por triplicado. La significancia estadística fue determinada por la prueba t- student con el programa Sigma Plot.

Con ésta otra metodología de transfección, realizamos la detección del el transcrito del gen de la luciferasa. Se evaluó a través de una cinética de expresión para corroborar cual era mejor tiempo de expresión del gen reportero. Para ello se probó el sistema a las 18 y 24 hrs. Como se puede apreciar en la figura 27a y b el transcrito fue detectado a partir de las 18 hrs, sin embargo, a las 24 hrs fue más abundante. Con estos datos nosotros especulamos que a partir de las 18 hrs la proteína luciferasa ya se encuentra presente en los trofozoítos *E.histolytica* y que a las 24 hrs el gen reportero de luciferasa se sigue transcribiendo, no obstante aunque el transcrito es más abundante a ese tiempo, la proteína es más susceptible a la degradación a las 24 hrs (Véase figura 27c). Fue por ello que seleccionamos el tiempo de 18 hrs post- transfección para realizar los ensayos posteriores.

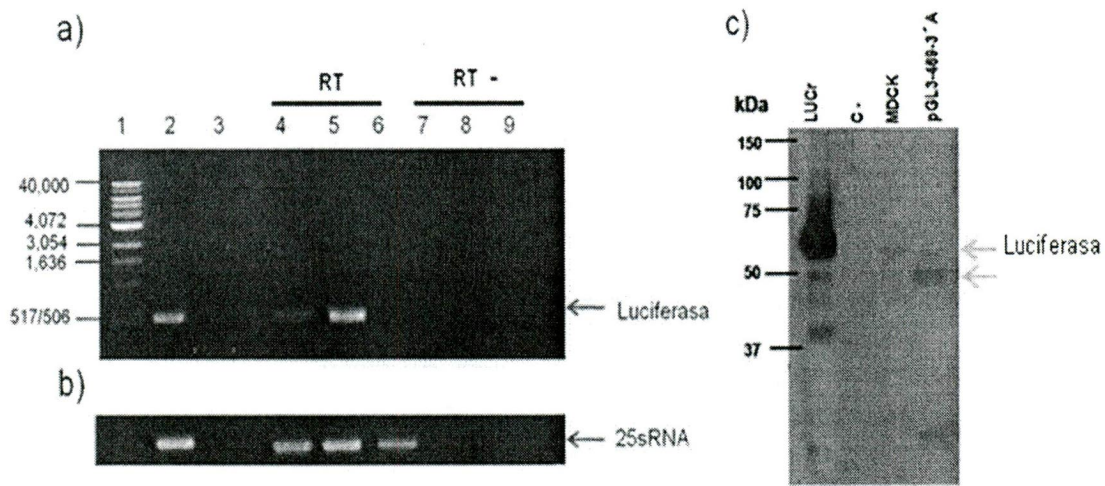


Figura 27. Detección del transcrito del gen de *luciferasa* e Inmunodetección en fase sólida de la proteína luciferasa en trofozoítos transfectados por lipofección con la construcción pGL3-469-3'A. a) Detección del RNAm de luciferasa en amibas transfectadas. **1)** Marcador de talla molecular de 1 Kb. **2)** Control positivo de la PCR, **3)** Control negativo de reacción PCR, **4)** Transcrito del gen de luciferasa de amibas transfectadas con el fragmento del promotor de 469 pb del gen de la *Ehadh112* 18 horas post-transfección, **5)** Transcrito del gen de luciferasa de amibas transfectadas con el fragmento del promotor de 469 pb del gen de la *Ehadh112* 24 horas post-transfección, **6)** Control de amibas sin transfectar, **7,8 y 9)** Control negativo de la retrotranscripción RT- de los carriles 4,5 y 6. **b)** Control de carga 25sRNA, amplificado bajo las mismas condiciones que el gen de luciferasa. Las flechas señalan la detección de los respectivos amplicones. **c)** Inmunodetección de la proteína luciferasa en amibas transfectadas.

Una vez que concluimos que se estaba llevando a cabo la transcripción del reportero de luciferasa realizamos los ensayos bajo éstas condiciones. En éste se analizó la expresión del gen de *luciferasa* en la construcción pGL3-469-3'A que se encuentra bajo el promotor de 469 pb del gen *Ehadh112* y la construcción pGL3-3'A que no posee ningún promotor (Véase figura 27). Con este resultado concluimos que la expresión gen reportero de luciferasa bajo el promotor *Ehadh112* el cual contiene el fragmento de 469 pb es más abundante en comparación con el transcrito detectado en la construcción que no posee promotor.

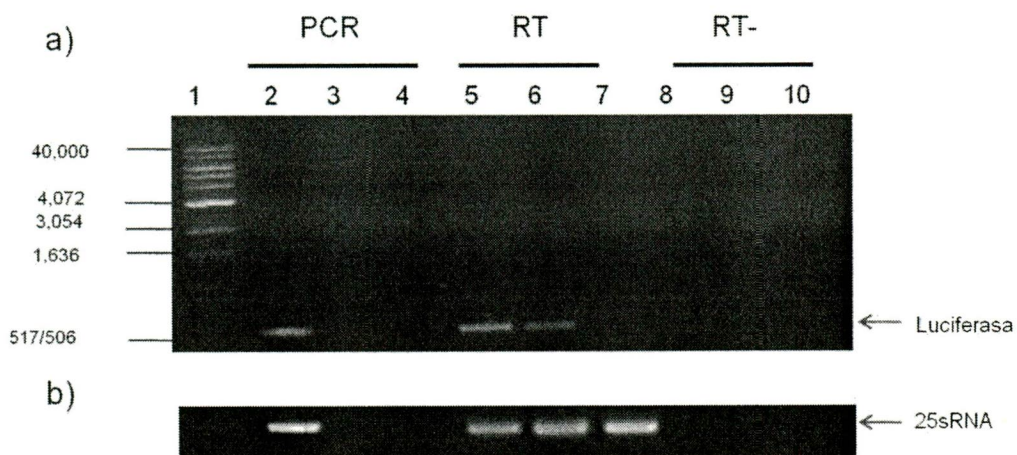


Figura 28. Detección del transcrito del gen de *luciferasa* en amibas transfectadas por lipofección con las construcciones pGL3-469-3'A y pGL3-3'A. 1) Marcador de talla molecular de 1 Kb, 2) Control positivo del PCR, 3 y 4) Control negativo del PCR, 5) Transcrito del gen de luciferasa de amibas transfectadas con el promotor de 469 pb del gen de la *Ehadh112*, 6) Transcrito del gen de *luciferasa* de amibas transfectadas con el vector vacío de luciferasa, 7) Control de amibas sin transfectar, 8, 9 y 10) Control negativo de retrotranscripción carriles 5,6 y 7. b) Control de carga 25s RNA, amplificado bajo las mismas condiciones que el gen de *luciferasa*. Las flechas señalan la detección de los respectivos amplicones.

Una vez estandarizadas las condiciones ideales de transfección y detección de luciferasa se llevo a cabo el análisis funcional de la secuencia TATCCA. Para ello se realizaron ensayos de transfección, donde se utilizaron las construcciones pGL3-469-3'A que contiene el promotor fuerte del gen *Ehadh112*, pGL3-150-3'A que contiene el promotor mínimo del gen *Ehadh112*, y pGL3-3A, que no posee promotor, como controles. Para evaluar el papel funcional de la secuencia TATTCCA se transfectaron las construcciones pGL3-HSP100-285-3'A que contiene el promotor de 285 pb del gen *HSP100* y por consiguiente posee a la secuencia TATCCA y por último la construcción, en donde se evaluó el efecto de la delección de dicha secuencia pGL3-HSP100-260-3'A.

El resultado de este experimento muestra una diferencia de actividad transcripcional entre los promotores control, es decir que cuando se utiliza al promotor fuerte de 469 pb la actividad transcripcional observada es 70% mayor en relación a la construcción que contiene al promotor mínimo del gen *Ehadh112* (150 pb). Ésta diferencia es significativa ya que el análisis estadístico arrojó un valor de $p=0.00472$ cabe mencionar que la significancia estadística es considerada cuando se obtiene un valor $p<0.05$ la prueba *t-Student*. El análisis del efecto de la secuencia TATCCA sobre la actividad del promotor muestra que al deletar la secuencia TATCCA la actividad del promotor del gen *HSP100* se ve disminuida un 50% (pGL3-HSP100-260-3'A) con respecto a la actividad de la construcción que contiene la secuencia la secuencia TATCCA (pGL3-HSP100-285-3'A). Al realizar el análisis estadístico encontramos que el valor de $p=0.012$, lo cual indica que la diferencia es significativa. Por consiguiente se demuestra que la secuencia TATCCA es relevante para la actividad del promotor del gen *HSP100*.

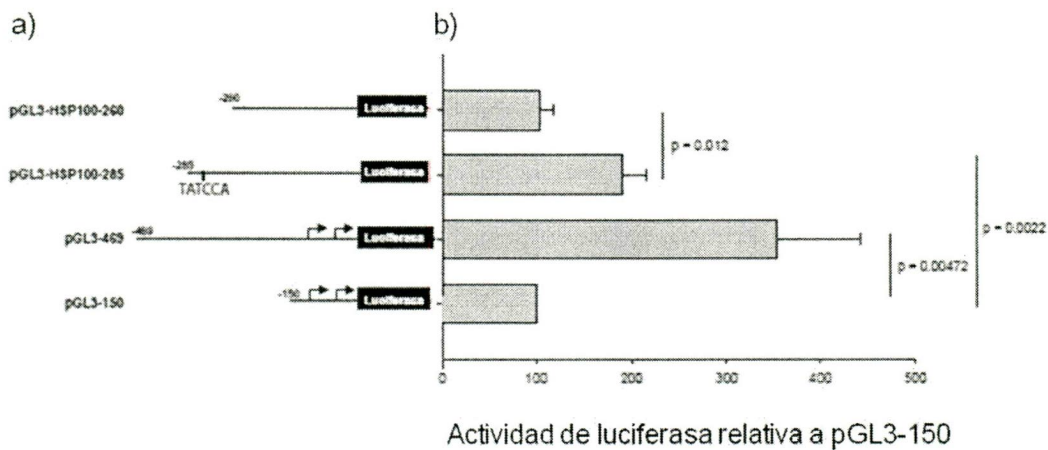


Figura 29. Análisis funcional del efecto de la delección de la secuencia TATCCA en la actividad del promotor *HSP100*. a) Representación esquemática de las construcciones utilizadas en el ensayo de transfección. PGL3-HSP100-285-3'A que contiene la secuencia TATCCA, pGL3-HSP100-260-3'A que tiene deletada la secuencia TATCCA, y las construcciones pGL3-4693'A y pGL3-150-3'A utilizadas como control b) Actividad relativa de luciferasa de las construcciones analizadas. Para el ensayo se transfectaron 10 µg de las construcciones que contienen diferentes fragmentos de los promotores de los gen *HSP100* y *EhAdh112*. La actividad de luciferasa ésta expresada como actividad relativa relacionada a la actividad de luciferasa que presentó la construcción que contiene el promotor mínimo (pGL3-150-3'A). Cada barra corresponde a la actividad relativa de luciferasa, la desviación estándar es representativa de tres experimentos independientes realizados por triplicado. La significancia estadística fue determinada por la prueba de t-Student con el programa Sigma plot.

8. Discusión

Entender los mecanismos celulares y moleculares que se llevan a cabo en el parásito *E. histolytica* a lo largo de su ciclo de vida es uno de los principales retos en el estudio de la amibiasis. Para que estos mecanismos ocurran, *E. histolytica* cuenta con una red de regulación de la expresión génica la cual le permite contar con proteínas adecuadas en un tiempo determinado, por lo que uno de los niveles de regulación de gran relevancia para este parásito debe ser el control transcripcional. En el control transcripcional se involucran elementos *cis-acting* como promotores, aumentadores, silenciadores, activadores sitio específicos y elementos de regulación en *trans* que involucran a factores de transcripción que pueden tener funciones de activadores, represores, coactivadores, correpresores y a proteínas modificadoras de la cromatina (Tymms *et al.*, 2000, Bernes *et al.*, 2005).

El dominio de unión a DNA MYB es el dominio más abundante relacionado con el control transcripcional en *E. histolytica* (Clark *et al.*, 2007 e Yyer *et al.*, 2007). Hasta el momento se han descrito 34 proteínas que contienen este dominio y que son potenciales factores de transcripción los cuales podrían participar en el control transcripcional del genoma de este parásito (Ehrenkauf *et al.*, 2009 y Meneses *et al.*, 2010). Para caracterizar su función como factores de transcripción e identificar las secuencias que reconocen en sus promotores blanco se han utilizado diferentes estrategias. Una de éstas estrategias es la utilizada por el grupo de Ehrenkauf (2009), quien caracterizó a la proteína EhMybdr, la cual pertenece a la familia Myb SHAQKYF. La estrategia utilizada fue la sobre-expresión de la proteína EhMybdr y por medio de microarreglos se identificaron los genes que modificaron su expresión en respuesta a la sobreexpresión de ésta proteína. Posteriormente, se analizaron las regiones promotoras de estos genes por medio del programa MEME en busca de secuencias comunes y se observó que algunos de estos genes tenían conservada la secuencia CCCCCC. Mediante ensayos de EMSA se corroboró que proteínas de extractos nucleares que sobre-expresaban a la proteína EhMybdr reconocían ésta secuencia. Sin embargo, cabe mencionar que

BIBLIOTECA UACM

existen otros genes que modificaron su expresión y el análisis bioinformático reveló otras secuencias que se encontraron conservadas en sus promotores y que hasta el momento no han sido estudiadas. Una característica importante de las proteínas Myb SHAQKYF es que presentan en la tercer α -hélice del repetido 3 una sustitución del triptófano por el motivo $^S/_T\text{HAQK}^Y/_F$ el cual les permite reconocer variaciones de la secuencia canónica (TAACgG) o bien secuencias diferentes en los promotores de sus genes blanco. Es por ello que nuestro grupo de investigación plantea la existencia de otras secuencias que pudieran ser reconocidas por miembros de la familia MYB SHAQKYF, ya que el genoma de este parásito contiene al menos 9 genes que codifican para proteínas de ésta familia (Meneses *et al.*, 2010).

Por otro lado, se han identificado algunas proteínas de la familia MYB SHAQKYF en otros organismos tales como plantas, como es el caso de la proteína OsMYB1 de *Oriza sativa* que reconoce a la secuencia **TATCCA** (Lu *et al.*, 1998), en algas como la proteína LCR1 de *Chlamydomonas reinhardtii* (Yoshioka *et al.*, 2004) y la proteína MybE en el organismo amebode *Dictyostelium discoideum*, la cual reconoce a la secuencia GGGGCGGG (Fukuzawa *et al.*, 2006 y Tsujioka *et al.*, 2007).

En ésta tesis nos planteamos estudiar la secuencia **TATCCA**, la cual podría estar involucrada en el control transcripcional de algunos genes de *E. histolytica*. Basados en el análisis *in silico* realizado por Cárdenas (2008), quien encontró que la secuencia **TATCCA** se encuentra presente en 117 promotores de genes que codifican para proteínas que participan en la transducción de señales, la regulación de DNA y RNA, en la traducción, la respuesta al estrés por choque térmico, la virulencia entre otros. Por otro parte, se tienen reportes bibliográficos en donde la secuencia TATCCA tiene un papel relevante en la regulación del gen de la α -amilasa de *Oriza sativa*, cuando ésta es sometida a estrés nutricional (Lu *et al.*, 1998). Por lo que la secuencia TATCCA es considerada como un elemento esencial en el control transcripcional en genes del arroz.

En *E. histolytica* se han llevado a cabo diferentes aproximaciones para el estudio de secuencias, que pudieran ser relevantes en la regulación transcripcional. El grupo de Hackney (2007) ha optado por otras estrategias, para determinar la funcionalidad de secuencias, las cuales incluyen búsquedas de secuencias en promotores de genes que tienen un patrón de expresión común en respuesta a una determinada condición. Para ello se han analizado los datos obtenidos por microarreglos y mediante el uso de algoritmos bioinformáticos identificaron motivos que se encuentran conservado en genes que aumentaron su expresión en condiciones de choque térmico. Tal es el caso de la secuencia $^{A/T}AAACCCT$ que se encuentra enriquecida en promotores de genes ribosomales. También se identificaron otros motivos como son GAATGATG, AACTATTTAAACAT $^{C/T}C$ y TGAACCTATAAACATC presentes en las regiones promotoras genes de baja expresión. Además, demuestran que proteínas de extractos nucleares de tofozoito de *E. histolytica* se unen de manera específica a éstas secuencias, sin embargo aún no se tiene la identidad ni la caracterización de éstas proteínas. Este enfoque permite conocer redes transcripcionales que pueden ser identificadas utilizando datos de expresión (Hackney *et al.*, 2007). Es importante mencionar que dos de las secuencias encontradas (AACTATTTAAACAT $^{C/T}C$ y TGAACCTATAAACATC) en este estudio son muy similares a la secuencia **TATCCA**, ya que como se puede apreciar ésta secuencia posee dos sustituciones con respecto a las secuencias **TAAACA** y **TATAAA**. Todos estos antecedentes refuerzan la idea del estudio de la secuencia TATCCA en *E. histolytica* (Hackney *et al.*, 2007).

En este trabajo, inicialmente se determinó si proteínas presentes en los extractos nucleares de *E. histolytica* reconocían a la secuencia TATCCA, por medio de ensayos EMSA. Con estos resultados corroboramos que la secuencia TATCCA puede ser blanco de unión de posibles factores de transcripción tipo Myb. Sin embargo, para confirmar ésta aseveración es necesario contar con anticuerpos así como con proteínas recombinantes purificadas, siendo una de las limitantes que tuvimos para la realización de estos ensayos. Las proteínas EhMyb son altamente hidrofóbicas, es por ello que se ha la purificación de una proteína recombinante. A pesar de esta limitación se diseñó una nueva estrategia para continuar con el estudio de ésta secuencia utilizando extractos

crudos de bacterias que sobre-expresaron a las proteínas EhMyb10 (Familia EhMybR2R3) y EhMybS3 (familia EhMybSHAQKYF) y como control negativo un extracto crudo de bacterias que sobre-expresaron solamente a GST. Esto último debido a que ésta etiqueta se encuentra fusionada a las proteínas inducidas utilizadas en estudio. Nuestros resultados mostraron la formación de un solo complejo cuando se utilizaron extractos crudos de bacterias que sobre-expresaron a la proteína EhMybS3. Sin embargo, este no se observó cuando se utilizaron extractos crudos de bacterias que sobreexpresan a las proteínas EhMyb10 o GST. Con ésta observación proponemos que las proteínas Myb con motivo SHAQKYF podrían reconocer a la secuencia TATCCA, no obstante todavía es necesario llevar a cabo otros ensayos con los cuales definiríamos la especificidad de la unión.

Para probar la funcionalidad de la secuencia TATCCA se utilizó el sistema de reporteros con luciferasa se probaron las construcciones control, que contenían diferentes fragmentos del promotor de la adhesina *Ehadh112*. Los resultados obtenidos en nuestros ensayos nos indican que se pueden apreciar diferencias entre las actividades de estos fragmentos del promotor *Ehadh112*, sin embargo las lecturas de luciferasa que obtuvimos son inferiores a las ya reportadas por otros grupos (Heidrun *et al.*, 1995 y Girlisch *et al.*, 1995). Esto nos lleva a concluir que el sistema de genes reporteros de luciferasa en este parásito tiene limitantes. Una de ellas pudiera ser la degradación de la proteína, ya que *E. histolytica* es un organismo que posee una gran batería lítica compuesta principalmente por cistein proteasas, las cuales podrían promover la degradación del producto del gen reportero. Técnicamente, para evitar su proteólisis, se añaden inhibidores de proteasas, uno ellos es el E-64c cuya característica principal es inhibir las cistein proteasas, además que se caracteriza por ser soluble a través de la membrana, por lo que éste se utiliza desde la recuperación celular. El uso de los inhibidores de proteasas en la obtención de los extractos totales de amiba también es de suma importancia, es por ello que también se añade E-64 y leupeptina, ya que se ha reportado que su uso incrementa la actividad de luciferasa (Girlisch *et al.*, 1995).

Para el análisis funcional de la secuencia TATCCA se generaron dos construcciones la primera pGL3-HSP100-285 3'A y contiene a la secuencia TATCCA en la posición -285 y la segunda es pGL3-HSP100-260 3'A que no posee la secuencia. Al analizar los resultados de ésta delección encontramos que hay un cambio significativo en la actividad transcripcional del promotor del gen *HSP100* ya que la actividad de la construcción que posee la delección se redujo en un 50% con respecto a la actividad transcripcional de la construcción que contiene la secuencia TATCCA. Este efecto nos sugiere que ésta secuencia es importante en la actividad transcripcional del promotor del gen *HSP100*. Los cambios observados podrían ser debidos a las proteínas que interaccionan en esa secuencia, nosotros proponemos que podría tratarse de proteínas Myb SHAQKYF.

Una herramienta esencial en el análisis funcional de promotores y sus secuencias ha sido el uso de genes reporteros tales como CAT y Luciferasa. Sin embargo, la expresión de los genes reporteros está condicionada a la utilización de las regiones de poliadenilación de genes propios de este parásito (Purdy *et al.*, 1995). Con estos sistemas se han identificado los elementos que conforman el *core* de un promotor amebiano como son la caja TATA, el INR y la secuencia GAAC, así como secuencias relevantes para la actividad de promotores como lo son las secuencias URE. Éstas estrategias han permitido evaluar diversos fragmentos de un promotor y con ello determinar su papel funcional, sin embargo, estos ensayos son laboriosos y requieren de la generación de múltiples construcciones que contengan diferentes fragmentos del promotor a estudiar. Sin embargo, el sistema de genes reporteros permite evaluar el papel funcional de secuencias que se han obtenido de búsquedas bibliográficas y que se han encontrado presentes en el genoma de este parásito por medio de análisis *in silico* sin hacer uso de microarreglos, ya que son ensayos muy costosos. Es por ello que en este trabajo se planteó el estudio de posibles elementos de reconocimiento a factores de transcripción MYB utilizando construcciones que contenían al gen reportero de luciferasa para validar los datos obtenidos de nuestras búsquedas *in silico*. En este trabajo utilizamos al gen de la luciferasa ya que no requiere de la utilización de

sustratos radiactivos, si no de un sustrato quimioluminiscente, el producto del gen reportero se expresa a partir de las 18 hrs post-transfección, el ensayo es rápido y sólo requiere de algunos pocos segundos por muestra. Con ésta metodología se han evaluado promotores tales como el gen de la lectina (Purdy *et al.*, 1995) y ferredoxina (Gilchrist *et al.*, 1995) en *E. histolytica*.

Como ya se ha visto, el estudio de secuencias relevantes para la regulación transcripcional ha sido abordado desde varios enfoques. En ésta tesis estandarizamos e impletemos el uso de ensayos bioquímicos EMSA y de ensayos funcionales utilizando el gen reportero de la luciferasa para analizar la funcionalidad de secuencias identificadas por búsquedas *in silico* en promotores de genes de *E. histolytica* las cuales se hayan identificado en otros organismos, con la idea de que al conservarse el dominio de unión a DNA de las proteínas con dominio de unión a DNA MYB también se conserven las secuencias que estos reconocen.

9. Conclusiones

- Proteínas de extractos nucleares de *E. histolytica* reconocen a la secuencia TATCCA.
- El complejo obtenido con la secuencia TATCCA se compitió específicamente con la secuencia canónica de Myb por lo que proteínas tipo MYB podrían estar reconociendo esta secuencia.
- Proteínas de extractos de bacterias enriquecidos con la proteína EhMybS3 forman complejos DNA proteína con la secuencia TATCCA y no así aquellos extractos enriquecidos con la proteína EhMyb10.
- El sistema de genes reporteros de luciferasa nos permitió evaluar diferencias en la actividad de diferentes fragmentos del promotor del gen *EhAdh112* de *E. histolytica*.
- La secuencia TATCCA es relevante en la regulación de la expresión del gen *Hsp100* de *E. histolytica*.

10. Referencias

1. **Abhyankar M., Hochreiter A., Hershey J., Evans C., Zhang Y., Crasta O., et al.** 2008. Characterization of an *Entamoeba histolytica* high-mobility-group box protein induced during intestinal infection. *Eukaryot Cell* 7: 1565-1572.
2. **Azuara E., Flores E., Lopez C. and Orozco E.** 2005. *Entamoeba histolytica*: Structural and functional analysis of the *Ehadh112* gene promoter. *Experimental Parasitology*. 110: 280–285.
3. **Baxt L., Singh U.** 2008. New insights into *Entamoeba histolytica* pathogenesis. *Curr Opin Infect Dis*. 21(5):489-94.
4. **Bernes S., Siman R. and Ankri S.** 2005. Epigenetic and classical activation of *Entamoeba histolytica* heat shock protein 100 (EHSP100) expression. *FEBS Letters* 579:6395–6402.
5. **Boschet C., et al.**, 2004. Characterization of PfMyb1 transcription factor during erythrocytic development of 3D7 and F12 *Plasmodium falciparum* clones. *Mol. Biochem. Parasitol.*138:159–163.
6. **Bruchhaus I., Roeder T., Lotter H., Schwerdtfeger M. and Tannich E.** 2002. Differential gene expression in *Entamoeba histolytica* isolated from amoebic liver abscess. *Molecular Microbiology*. 44:1063–1072.
7. **Castañón C., Luna J., de Dios E., et al.** 2010. A unicellular organism containing two active genes encoding for members of the TBP family. *Protein Expr Purif* 70:48-59.
8. **Chastanet A., Derre I., Nair S. and Msadek T.** 2004. *clpB*, a novel member of the *Listeria monocytogenes* CtsR regulon, is involved in virulence but not in general stress tolerance. *J. Bacteriol.* 186: 1165–1174.
9. **Clark C., et al.** 2007. Structure and content of the *Entamoeba histolytica* genome. *Adv. Parasitol.* 65: 51–190.
10. **Clos J., Klaholz L., Kroemer M., Krobitch S. and Lindquist, S.** 2001 Heat shock protein 100 and the amastigote stage-specific A2 proteins of *Leishmania donovani*. *Med. Microbiol. Immunol. (Berl)* 190: 47–50.

11. **Cruz J., Hernández C., Méndez J., Pérez E and Ortega A.** 2003. Collagen-induced STAT family members activation in *Entamoeba histolytica* trophozoites. FEMS Microbiology Letters 229: 203-209.
12. **da Silva M. Perez A., de Cássia R., de Morales C., Siqueira-Neto J., et al.** 2010. The *Leishmania amazonensis* TRF (TTAGGG repeat-binding factor) homologue binds and co-localizes with telomeres. BMC Microbiology. 10:136.
13. **de Dios G., Luna P., Rivera M., Olivares J., López C., and Orozco E.** 2005. Entamoeba histolytica TATA-box binding protein binds to different TATA variants in vitro. FEBS Journal 272: 1354–1366.
14. **Diamond L.S., et al.,** 1978. A new medium for the axenic cultivation of *Entamoeba histolytica* and other *Entamoeba*. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 72: 431–432.
15. **Davidson C., Ray E. and Lipsick J.** 2004. Myb Transcription Factors: Their Role in Growth, Differentiation and Disease. Chapter 1. Evolution of MYB Proteins. 1-33.
16. **Ehrenkauf G., Haque J., Hackney J., Eichinger D. and Singh U.** 2007a. Identification of developmentally regulated genes in *Entamoeba histolytica*: insights into mechanisms of stage conversion in a protozoan parasite. Cellular Microbiology. 9: 1426–1444.
17. **Ehrenkauf GM, Eichinger DJ, Singh U.** 2007b. Trichostatin A effects on gene expression in the protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. BMC Genomics. 5: 8:216.
18. **Ehrenkauf G.M., Hackney J.A. and Singh U.** 2009. A developmentally regulated Myb domain protein regulates expression of a subset of stage-specific genes in *Entamoeba histolytica*. Cell Microbiol 11: 898-910.
19. **Espinosa M. and Martinez A.** 2000. Pathogenesis of Intestinal Amebiasis: From Molecules to Disease. Clinical Microbiology Review.13:318–331.

20. **Flores-Soto E., Azuara-Liceaga E., Lopez-Camarillo C., Orozco E.** 2005. The *Entamoeba histolytica* Ehcp112 gene has a distal and weak promoter. *Exp Parasitol.* **110**(3):286-291

21. **Freitas L., Rafael Marques R., Lindsay Ann Pirrit L., Schenkman S. and Scherf A.** 1999. Identification of the telomere in *Trypanosoma cruzi* reveals highly heterogeneous telomere lengths in different parasite strains. *Nucleic Acids Research.* **27** (12): 2451-2456.

22. **Fukuzawa M., et al.** 2006. Regulation of Dictyostelium prestalk-specific gene expression by a SHAQKY family MYB transcription factor. *Development* **133**: 1715–1724.

23. **García-Rivera G., Gómez C., Pérez D., Flores E., Rodríguez M., Orozco E.** 2000. Structural characterization of the 5'-flanking regions of the *Entamoeba histolytica* Ehcp112 and Ehadh112 genes. *Arch Med Res.* **31**(4 Suppl):S303-304

24. **Gilchrist C., Streetsa H., Ackersb J. and Hall R.** 1995. Transient expression of luciferase in *Entamoeba histolytica* driven by the ferredoxin gene 5' and 3' regions. *Molecular and Biochemical Parasitology* **74**:1-10.

25. **Gilchrist C., Mann B., and Petri W.** 1998. Control of Ferredoxin and Gal/GalNAc Lectin Gene Expression in *Entamoeba histolytica* by a cis-Acting DNA Sequence. *Infection and Immunity.* **66**(7): 2383–2386.

26. **Gilchrist C.A., Holm, C.F., Hughes, M.A., Schaenman, J.M., Mann, B.J. and Petri W.A.** 2001. Identification and characterization of an *Entamoeba histolytica* upstream regulatory element 3 sequence-specific DNA-binding protein containing EF-hand motifs. *J Biol Chem* **276**: 11838-11843.

27. **Gilchrist C., Houpt E., Trapaidze N., Fei Z., Crasta O., Asgharpour A., Evans C., et al.** 2006. Impact of Intestinal colonization and invasion on the *Entamoeba histolytica* transcriptome. *Molecular & Biochemical Parasitology.* **147**:163-176.

28. **Gilchrist C., Baba D., Zhang Y., Crasta O., Evans C. and et al.** 2008. Targets of the *Entamoeba histolytica* Transcription Factor URE-BP. *PLOS Neglected Tropical Disease*. 2: 1-11
29. **Gómez C., Macías M., Pérez D., Suárez M., Nieto A., Medel O., Orozco R and Náder E.** 2007. A Novel Heat Shock Transcription Factor Family in *Entamoeba histolytica*. *American Journal of Infectious Diseases* 3 (2): 115-122.
30. **Hackney J., Ehrenkauf G. and Singh U.** 2007. Identification of putative transcriptional regulatory networks in *Entamoeba histolytica* using Bayesian inference. 35(7): 2141–2152.
31. **Hamann L., Nickel R., and Tannich E.** 1995. Transfection and continuous expression of heterologous genes in the protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. *Proc. Natl. Acad.* 92:8975-8979.
32. **Heidrun B., Lioutas C., Dobinsky S., Nickel R., Tannich E.** 1995. Analysis of the 170-kDa lectin gene promoter of *Entamoeba histolytica*. *Molecular and Biochemical Parasitology*. 7:1-10.
33. **Hsu, Hong-Ming.** 2004. Biochemical Characterization of tvMyb family proteins in *Trichomonas vaginalis*.
34. **Ehrenkauf G., Eichinger D., Singh U.** 2007. Trichostatin A effects on gene expression in the protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. *BMC Genomics*. 8:216.
35. **Iyer, L.M., et al.,** 2008. Comparative genomics of transcription factors and chromatin proteins in parasitic protists and other eukaryotes. *Int. J. Parasitol.* 38: 1–31.
36. **Jin H., Martin C.,** 1999. Multifunctionality and diversity within the plant MYB-gene family. *Plant Mol. Biol.* 41: 577–585.
37. **Laughlin et al.,** 2005. Secreted and cell-surface adhesive proteins in *Entamoeba histolytica*. *Expert Reviews in Molecular Medicine*. 7: 13.
38. **Leippe M.** 1997. Amoebapores; *Parasitol. Today* 13: 178–183.
39. **Lipsick J.** 1996. One billion years of Myb. *Oncogene* 13: 223–235.

40. Loftus B., Anderson I., Davies R., Alsmark U.C., Samuelson J., Amedeo P., Roncaglia P., Berriman M., Hirt R.P., Mann B.J., Nozaki T., Suh B., Pop M., Duchene M., Ackers J., Tannich E., Leippe M., Hofer M., Bruchhaus I., Willhoeft, U., Bhattacharya A., Chillingworth T., Churcher C., Hance Z., Harris B., Harris D., Jagels, K., Moule S., Mungall K., Ormond D., Squares R., Whitehead S., Quail M.A., Rabbinowitsch E., Norbertczak H., Price C., Wang Z., Guillen N., Gilchrist C., Stroup S.E., Bhattacharya S., Lohia A., Foster P.G., Sicheritz-Ponten, T., Weber C., Singh U., Mukherjee C., El-Sayed, N.M., Petri Jr., W.A., Clark C.G., Embley T.M., Barrell B., Fraser C.M. and Hall N. 2005. The genome of the protist parasite *Entamoeba histolytica*. *Nature* 433: 865–868.
41. Lu C., Lim K and Su Y.1998. Sugar Response in the Promoter of a Rice α -Amylase Gene Serves as a Transcriptional Enhancer. *The journal of Biological Chemistry*. 273(17): 10120-10131.
42. Lu C., Tuan-hua D., Lon H. and Su M. Three Novel MYB Proteins with One DNA Binding Repeat Mediate Sugar and Hormone Regulation of α -Amylase Gene Expression. *The Plant Cell*. 14: 1963-1980.
43. Luna-Arias J, Hernández-Rivas R, de Dios-Bravo G, Garcia 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 (Pt 1):33-40.
44. MacFarlane R., Shah H., Singh U. 2005. Transcriptional profiling of *Entamoeba histolytica* trophozoites. *International Journal for Parasitology* 35 (5): 533–542.
45. MacFarlane R. and Singh U. 2006. Identification of Differentially Expressed Genes in Virulent and Nonvirulent *Entamoeba* Species: Potential Implications for Amebic Pathogenesis. *Infection and Immunity*. 340–351
46. Malo M., Abedrapo M., Chen A., Mozumder M., Pushpakaran P., Alkhoury F., Zhang W. Fleming E. and Hodin R.2003. Improved eukaryotic promoter-detection vector carrying two luciferase reporter genes. *BioTechniques* 35:1150-1154.

47. **Malo M., Mozumder M., Chen A., Mostafa G., Zhang X. and Hodin R.** 2006. pFRL7: An ideal vector for eukaryotic promoter analysis. *Analytical Biochemistry* 350: 307–309.
48. **Mccooy J., Mann B., and Petri W.** 1994. Adherence and Cytotoxicity of *Entamoeba histolytica* or How Lectins Let Parasites Stick Around. 62(8): 3045-3050.
49. **Mendoza L., Orozco E., Rodríguez MA., García-Rivera G., Sánchez T., García E., Gariglio P.** 2003. Ehp53, an *Entamoeba histolytica* protein, ancestor of the mammalian tumour suppressor p53. *Microbiology* 149:885-893.
50. **Meneses E., Cárdenas E., Zárate S., Brieba L., Orozco L., López C., Azuara E.** 2010. The R2R3 Myb protein family in *Entamoeba histolytica*. *Gene* 455 : 32–42
51. **Ness S., et al.** 1989. The v-myb oncogene product binds to and activates the promyelocyte-specific mim1. *Cell* 59: 1115-1125.
52. **Ogata K., Tahirov T. and Ishii S.** 2004. Myb Transcription Factors: Their Role in Growth, Differentiation and Disease. *The C-Myb DNA Binding Domain. Biomedical and life Sciences.* 2: 223-238.
53. **Okada M., Huston C., Oue M., Mann J., William A. Petri Jr W., Kita K., Nozaki T.** 2006. Kinetics and strain variation of phagosome proteins of *Entamoeba histolytica* by proteomic analysis. *Molecular & Biochemical Parasitology* 145: 171–183.
54. **Orozco E., Suarez M., and Sánchez T.** 1985. Differences in adhesion, phagocytosis and virulence of clones from *Entamoeba histolytica*, strain HM1: IMSS. *International Journal for Parasitology.* 15: 655-660.
55. **Pearson RJ, Singh U.** Approaches to characterizing *Entamoeba histolytica* transcriptional regulation. *Cell Microbiol.* 2010. 12(12):1681-90.
56. **Pérez D., Gómez C., López E., Tannich E., and Orozco E.** 1997. Transcriptional Analysis of the *EhPgp5* Promoter of *Entamoeba histolytica* Multidrug-resistant Mutant. 273:13.7285–7292.

57. **Purdy J., Mann B., Pho L., and Petri W.** 1994. Transient transfection of the enteric parasite *Entamoeba histolytica* and expression of firefly luciferase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 19; 91(15): 7099–7103.
58. **Purdy J.E., et al.** 1996. Upstream regulatory elements controlling expression of the *Entamoeba histolytica* lectin. *Mol. Biochem. Parasitol.* 78: 91–103.
59. **Que X. and Sharon L. Reed.**2000. Cysteine Proteinases and the Pathogenesis of Amebiasis. *Clinical Microbiology Reviews.*13(2):196-206.
60. **Romero M., Gómez C., López I., Martínez M., Orozco E. and Rodríguez.** 2007. Structural and functional analysis of the *Entamoeba histolytica EhrabB* gene promoter. *BMC Molecular Biology.* 8(82):1-12.
61. **Saito Y., Loftus B., Hall N., and Nozaki T.** 2005. The diversity of Rab GTPases in *Entamoeba histolytica* *Exp Parasitol.* 110(3):244-52
62. **Singh U., Rogers J., Mann B. and Petri W.** 1995. Transcription initiation is controlled by three core promoter elements in the *hgl5* gene of the protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 94: 8812–8817.
63. **Singh U. and Rogers J.** 1998. The Novel Core Promoter Element GAAC in the *hgl5* Gene of *Entamoeba histolytica* is Able to Direct a Transcription Start Site Independent of TATA or Initiator Regions. *The Journal of Biological Chemistry.* 273(34): 21663–21668.
64. **Spensley M., Kim Y, Picot E., Reid J., Ott S., Chris Helliwell C and Carré A.** 2009. Evolutionarily Conserved Regulatory Motifs in the Promoter of the *Arabidopsis* Clock Gene *LATE ELONGATED HYPOCOTYL*^{[C],[W]}. *The Plant Cell* 21:2606-2623.
65. **Sun C.H., et al.** 2002. A novel Myb-related protein involved in transcriptional activation of encystation genes in *Giardia lamblia*. *Mol. Microbiol.* 46: 971–984.
66. **Tillack M., Nowak N., Lotter H., Bracha R., Mirelman D., Tannich E., Bruchhaus I.** 2006. Increased expression of the major cysteine proteinases by stable episomal transfection underlines the important role of EhCP5 for the pathogenicity of *Entamoeba histolytica*. *Molecular & Biochemical Parasitology.*149: 58–64.

67. **Towbin H, Staehelin T., and Gordon J.** 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 76(9):4350-4.
68. **Toyofuku K., Umemura T. and Yamaguchi J.** 1998. Promoter elements required for sugar-repression of the RAMy3D gene for α -amylase in rice. *FEBS Letters.* 428: 275-280.
69. **Trejos J., Castaño J.** 2009. Factores de virulencia del patógeno intestinal *Entamoeba histolytica*. *Infect.* vol.13 no.2.
70. **Tsujioka M., Zhukovskaya N., Yamada Y., Fukuzawa M. and et al.** 2007. Dictyostelium Myb transcription factors function at culmination as activators of ancillary stalk differentiation. *Eukaryot Cell.* 6(3):568-70.
71. **Tymms M.** Transcription Factor Protocols. Humana press. Vol. 130. *Methods in Molecular Biology* Methods in Molecular Biology, vol. 130, Transcription Factor Protocols Edited by: M. J. Tymms © 2000 Humana Press Inc., Totowa, NJ.
72. **Vines R., Purdy J., Ragland B., Samuelson J., Mann B. and Petri W.** 1995. Stable episomal transfection of *Entamoeba histolytica*. *Molecular and Biochemical Parasitology.* 7:265-267.
73. **Weber C., Guigon G., Bouchier C., Frangeul L., Moreira S., Sismeiro O., Gouyette C., Mirelman D., Yves J., and Guillen N.** 2006. Stress by Heat Shock Induces Massive Down Regulation of Genes and Allows Differential Allelic Expression of the Gal/GalNAc Lectin in *Entamoeba histolytica*. *Eukaryotic Cell.* 8:71-875.
74. **World Health Organization.** 1997. WHO/PAHO/UNESCO report. A consultation with experts on amoebiasis. *Epidemiol. Bull* 18: 13-14.
75. **Ximénez C., Morán P., Ramos F., Ramiro M.** 2007. Amibiasis intestinal: estado actual del conocimiento. *Med Int Mex.* 23(5):398-407.
76. **Yang T., Perasso R. and Baroin-Tourancheau A.** 2003. Myb Genes in Ciliates: A Common Origin with the *myb* Protooncogene? *Protist.* 154 (2): 229-238.

77. **Yoshioka S., Taniguchi F., Miura K., Inoue T., Yamano T., and Fukuzawa H.** 2004. The Novel Myb Transcription Factor LCR1 Regulates the CO₂-Responsive Gene *Cah1*, Encoding a Periplasmic Carbonic Anhydrase in *Chlamydomonas reinhardtii*. *The Plant Cell*. 16:1466–1477.



Pedro Abumada



REP. DE CUBA No. 99 DESP. 23-A
CENTRO HISTÓRICO MÉXICO, D.F.

TESIS URGENTES

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

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

TEL. 5512-8469

PART. 2619-0742