



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA
Facultad de Ciencias Químicas e Ingeniería
Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias e Ingeniería
PROGRAMA DE MAESTRÍA EN CIENCIAS

Mutagénesis y análisis funcional del dominio D
de la enzima proteína disulfuro isomerasa de
Entamoeba histolytica

TESIS QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS
P R E S E N T A

Q.F.B. ZEILA YAZMÍN PÁEZ HERNÁNDEZ

Tijuana, B. C.

Agosto de 2012.

El presente trabajo de investigación fue realizado en el
LABORATORIO DE BIOTECNOLOGÍA
de la Facultad de Ciencias Químicas e Ingeniería de la
Universidad Autónoma de Baja California

Bajo la Co-Dirección de
DRA. ROSA ELENA MARES ALEJANDRE
DR. MARCO ANTONIO RAMOS IBARRA

Para la realización de este trabajo se obtuvo financiamiento del
CONSEJO NACIONAL DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA
(Financiamiento 155714, Fondo Sectorial SEP-CONACYT 2010 para Ciencia Básica)
PROGRAMA DE MEJORAMIENTO DEL PROFESORADO
(Financiamiento para la Incorporación de Nuevos PTC, Convocatoria 2011)

Dedicada con todo mí cariño...

A mis dos amores que ya no están físicamente, pero que me acompañan en cada día de mi vida tal como lo han hecho siempre. Mi fortaleza Doña Teo y mi tío querido.

A mi hermano Gregorio por brindarme las herramientas necesarias para forjar mi camino y lograr mis propósitos.

A mi madre por todo el amor y el esfuerzo invertido, por darme la oportunidad de estar aquí y la libertad de tomar mis propias decisiones.

A mis queridos hermanos Isabel, Miguel, Andrea y Laura por acompañarme y apoyarme en este camino.

Los amo.

AGRADECIMIENTOS

Al **Dr. Maco Antonio Ramos Ibarra** por su incomparable dirección, por apoyarme tanto en la realización de este proyecto como a nivel personal, por despertar en mí el interés por descubrir; y por supuesto, por soportarme dentro del laboratorio.

A la **Dra. Rosa Elena Mares Alejandro** por su comprensiva paciencia, los consejos, las enseñanzas y los buenos recuerdos.

Al **Dr. José Manuel Cornejo Bravo** y al **Dr. Samuel Guillermo Meléndez López** por sus acertados consejos.

A mis queridos amigos **Víctor, Iván, José, Reme, Bibi, Claudia, Ale, David** y **Giovanni** por acompañarme y hacer de esta experiencia algo extraordinario.

A mis compañeros del laboratorio de Biotecnología por todo el apoyo desinteresado y la disfrutable compañía.

A ti por las galletas, tu apoyo y tu cariño... **Te quiero.**

A todos ustedes que hicieron de esta etapa de mi vida una experiencia incomparable y hermosa.

Muchas gracias!

TABLA DE CONTENIDO

ÍNDICE DE FIGURAS	7
ÍNDICE DE TABLAS	8
ABREVIATURAS	9
1. INTRODUCCIÓN	10
1.1. Amibiasis y <i>Entamoeba histolytica</i>	10
1.1.1. Amibiasis	10
1.1.2. <i>Entamoeba histolytica</i>	10
1.1.3. Ciclo de vida	11
1.1.4. Diagnóstico y tratamiento	12
1.1.5. Fisiopatología.....	12
1.1.6. Virulencia	13
1.2. Proteína disulfuro isomerasa (PDI).....	15
1.2.1. Importancia de PDI	15
1.2.2. Familia de PDI	16
1.2.3. Familia PDI de <i>E. histolytica</i>	16
1.2.4. EhPDI como modelo de PDI amibiana	17
1.3. Retículo endoplásmico	18
1.3.1. Mecanismo de retención en el RE.....	19
1.3.2. Evidencia del retículo endoplásmico en <i>E. histolytica</i>	19
1.4. <i>Saccharomyces cerevisiae</i> como modelo	20
1.4.1. <i>S. cerevisiae</i> como célula eucarótica modelo	20
1.4.2. <i>S. cerevisiae</i> como modelo heterólogo.....	21
1.5. PDI de <i>Dictyostelium Discoideum</i>.....	21
2. JUSTIFICACIÓN.....	22
3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	23
3.1. Hipótesis	23
3.2. Objetivo general.....	23
3.3. Objetivos específicos.....	23
4. MATERIALES Y MÉTODOS	24
4.1. Reactivos biológicos y químicos.....	24
4.1.1. Oligonucleótidos sintéticos.....	24
4.1.2. Plásmidos.....	24
4.1.3. Células y medios de cultivo	25
4.1.4. Enzimas y otros reactivos biológicos.....	26
4.1.5. Reactivos químicos	26
4.1.6. Sistemas de purificación	27
4.2. Equipos	27
4.3. Protocolos generales	27

4.3.1.	<i>Condiciones típicas de amplificación (PCR)</i>	27
4.3.2.	<i>Purificación de productos de la reacción de PCR</i>	28
4.3.3.	<i>Purificación de fragmentos de ADN a partir de gel de agarosa</i>	28
4.3.4.	<i>Purificación de ADN plasmídico</i>	28
4.3.5.	<i>Análisis de ADN mediante electroforesis en gel de agarosa</i>	29
4.3.6.	<i>Transformación bacteriana</i>	29
4.4.	Construcción de plásmido pYEhPDI2, portador de <i>EhPDI</i> silvestre	29
4.4.1.	<i>Preparación del inserto y el vector</i>	30
4.4.2.	<i>Clonación del plásmido recombinante</i>	30
4.5.	Construcción de las variantes por delección del dominio D de <i>EhPDI2</i>	31
4.5.1.	<i>Diseño de oligonucleótidos</i>	31
4.5.2.	<i>Preparación de los insertos</i>	31
4.5.3.	<i>Clonación del plásmidos recombinantes</i>	32
4.6.	Complementación y análisis funcional de <i>EhPDI2</i> y sus variantes	33
4.6.1.	<i>Preparación de células de levadura electrocompetentes</i>	33
4.6.2.	<i>Transformación de células de levadura</i>	33
4.6.3.	<i>Intercambio de plásmido y rescate del fenotipo letal</i>	34
4.6.4.	<i>Análisis mediante auxotofías</i>	34
4.6.5.	<i>Análisis mediante PCR</i>	34
4.6.6.	<i>Análisis mediante curvas de crecimiento</i>	35
5.	RESULTADOS Y DISCUSIONES	36
5.1.	El dominio D de <i>EhPDI</i> predice 5 α-hélices	36
5.2.	Generación de un plásmido portador de <i>EhPDI</i> nativa	38
5.3.	<i>EhPDI2</i> complementa a la mutante ΔPDI1 de levadura	39
5.4.	Generación de plásmidos portadores de variantes del dominio D de <i>EhPDI</i>	41
5.5.	El dominio D de <i>EhPDI</i>, aparentemente, no participa en el mecanismo de retención intracelular de proteínas en levadura	42
5.6.	En levadura, <i>EhPDI</i> es retenida intracelularmente por un mecanismo independiente de la secuencia HDEL y del dominio D	44
6.	CONCLUSIONES	46
7.	REFERENCIAS	48

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Ciclo vital de <i>E. histolytica</i>	11
Figura 2. Espécimen intestinal de un paciente con colitis amibiana aguda.	13
Figura 3. Espécimen de un paciente con absceso hepático amibiano.	13
Figura 4. Representación esquemática de la estructura primaria de la <i>EhPDI</i>	17
Figura 5. Modelo de recuperación de proteínas solubles residentes de retículo endoplásmico.	18
Figura 6. Expresión y visualización de la proteína de GFP-KDEL en <i>E. histolytica</i>	20
Figura 7. Patrón de remociones seriadas del dominio D de la proteína <i>EhPDI</i>	31
Figura 8. Alineamiento de secuencias de los dominios D de las proteínas <i>EhPDI</i> y <i>DdPDI</i> , en comparación con la secuencia homóloga la proteína Erp29 de murino.	36
Figura 9. Predicción de la estructura terciaria del dominio D de <i>EhPDI</i> basado en homología de secuencias, usando como modelo al dominio D de Erp29 murino.	37
Figura 10. Análisis endonucleotídico preliminar del plásmido pYEhPDI2.	38
Figura 11. Caracterización molecular del plásmido pYEhPDI2 (clona 1).	39
Figura 12. Análisis funcional de <i>EhPDI2</i> mediante complementación de la mutante Δ PDI1 de <i>S. cerevisiae</i>	39
Figura 13. Análisis de auxotrofías de las complementantes <i>EhPDI2</i> en la mutante Δ PDI1 de <i>S. cerevisiae</i>	40
Figura 14. Análisis de la presencia episomal de pYEhPDI2, y ausencia de pCT38, en complementantes.	41
Figura 15. Análisis molecular de los plásmidos pYEhPDI2/DDR.	41
Figura 16. Análisis molecular de los plásmidos pYEhPDI2/DDF.	42
Figura 17. Análisis funcional de las variantes del dominio D de <i>EhPDI</i> mediante complementación de la mutante Δ PDI1 de <i>S. cerevisiae</i>	43

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Oligonucleótidos sintéticos.....	24
Tabla 2. Plásmidos utilizados.	25

ABREVIATURAS

<i>C</i>	<i>Carboxilo</i>
<i>CP</i>	<i>Cisteína proteinasa</i>
<i>D</i>	<i>Dictyostelium</i>
<i>Dd</i>	<i>Dictyostelium discoideum</i>
<i>E</i>	<i>Entamoeba</i>
<i>Ed</i>	<i>Entamoeba dispar</i>
<i>Eh</i>	<i>Entamoeba histolytica</i>
<i>Gal</i>	<i>Galactosa</i>
<i>GFP</i>	<i>Green fluorescent protein (Proteína verde fluorescente)</i>
<i>KDa</i>	<i>Kilodalton</i>
<i>N</i>	<i>Amino</i>
<i>NAcGal</i>	<i>N-acetilgalactosamina</i>
<i>p29</i>	<i>Peroxirredoxina de 29 KDa</i>
<i>pb</i>	<i>Pares de bases</i>
<i>PCR</i>	<i>Polymerase Chain Reaction (reacción en cadena de la polimerasa)</i>
<i>PDI</i>	<i>Proteína disulfuro isomerasa</i>
<i>RE</i>	<i>Retículo endoplásmico</i>
<i>Trx</i>	<i>Tiorredoxina</i>

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Amibiasis y *Entamoeba histolytica*

1.1.1. Amibiasis

La amibiasis está definida como la infección intestinal o extra-intestinal causada por el parásito protozoario *Entamoeba histolytica*. Esta enfermedad es una importante causa de morbilidad y mortalidad en países sub-desarrollados, prevaleciendo en las áreas tropicales. En México, la amibiasis es una de las 20 principales causas de enfermedad, encontrándose anualmente entre el quinto y sexto lugar. Gracias a la mejora en el acceso a fármacos anti-amibianos, el índice de mortalidad derivado de complicaciones severas ha disminuido en los últimos 40 años; sin embargo, un estudio sero-epidemiológico reciente reportó que el 8.41% de la población mexicana ha desarrollado anticuerpos anti-amibianos circulantes, lo cual indica una alta exposición al parásito [Ximénez *et al.*, 2009].

1.1.2. *Entamoeba histolytica*

El parásito protozoario causante de la amibiasis es un organismo eucariota unicelular estructuralmente simple, carente de peroxisomas y mitocondrias. Los trabajos pioneros sobre la morfología de *E. histolytica* revelaron la aparente carencia de estructuras diferenciadas; hasta ahora, sólo es posible apreciar un citosol abundante en vesículas no diferenciadas y vacuolas de varios tamaños. Además, no se ha encontrado evidencia de estructuras citoesqueléticas regulares ni de arreglos tubo-vesiculares semejantes a retículo endoplásmico y aparato de Golgi. Sin embargo, la poca evidencia morfológica y bioquímica disponible señala hacia un sistema endomembranoso muy primitivo, diferente al observado en metacariotes [Sánchez-López *et al.*, 2000].

La secuenciación automática y publicación del genoma de *E. histolytica* en 2005 le proporcionó a la comunidad científica una primera huella genética del parásito, la cual ha ido mejorando para obtener un conjunto de datos de alta calidad, revelando un tamaño

más acertado. El genoma de la cepa amibiana HM1:IMSS consiste de 20,799,072 pb y codifica para 8201 genes [Lorenzi *et al.*, 2010]. Mediante el uso bases de datos de familias de proteínas, tales como *Pfam* y *Prositate*, se ha logrado comparar a las secuencias codificantes amibianas, lo cual ha conllevado a la caracterización hipotética de proteínas cuya función aun es desconocida. Aunque la similitud de secuencias no debe asegurar las concordancias funcionales no demostradas, las bases de datos permiten especulaciones más acertadas acerca del papel de una proteína de interés [Golchrist y Petri, 2009].

1.1.3. Ciclo de vida

La Figura 1 esquematiza el ciclo biológico de *E. histolytica*. Inicialmente, durante el movimiento intestinal, los quistes y trofozoítos pasan a las heces. Típicamente, los quistes son encontrados en heces formadas (sólidas), mientras que los trofozoítos en heces diarreicas. La infección por *E. histolytica* ocurre por ingestión del quiste maduro en alimentos, bebidas o manos contaminadas con quistes. El desenquistamiento ocurre en el intestino delgado y los trofozoítos liberados migran hacia el intestino grueso. Los trofozoítos en la región íleo-cecal pueden multiplicarse por fisión binaria y adherirse a la mucosa intestinal, o bien, gracias al movimiento peristáltico, seguir el curso hacia el exterior, enquistarse y eliminarse en las heces.

Los quistes pueden sobrevivir días o semanas en el ambiente externo, debido a la protección que le brinda una pared quitinosa; en cambio, los trofozoítos liberados en heces diarreicas son rápidamente destruidos, por su sensibilidad al medio ambiente; además, en caso de ser ingeridos, no sobreviven la exposición al ambiente gástrico. En muchos casos, los trofozoítos permanecen confinados a la luz

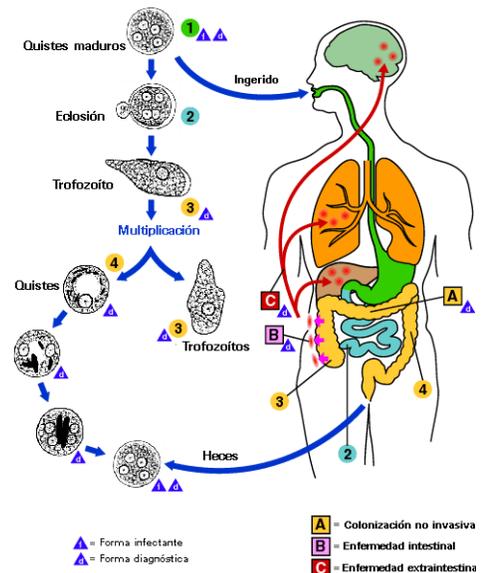


Figura 1. Ciclo vital de *E. histolytica*.

Tomado del sitio CDC (<http://www.cdc.gov/parasites/amebiasis/biology.html>)

intestinal (infección no invasiva) en individuos que son portadores. Por otro lado, en algunos pacientes los trofozoítos pueden invadir la mucosa intestinal (enfermedad intestinal), o a través del torrente sanguíneo, pasar a sitios extra-intestinales como el hígado, los pulmones y el cerebro (enfermedad extra-intestinal), resultando en manifestaciones patológicas [Centro de Control de Enfermedades (CDC)].

1.1.4. Diagnóstico y tratamiento

Debido a la gran similitud morfológica de *E. histolytica* y *E. dispar* (especie no patógena), es necesario que el diagnóstico de amibiasis sea capaz de discernir entre ambas especies. Ante esta necesidad, se han desarrollado métodos más eficaces que el simple diagnóstico asistido por microscopía, tales como el cultivo celular, análisis de zimodemos, colonoscopia, biopsias, inmunoensayos y algunas técnicas basadas en biología molecular (PCR convencional y en tiempo real), entre otras [Paul *et al.*, 2007].

Por otro lado, se ha optado tratar la amibiasis con derivados de nitroimidazoles, como metronidazol, tinidazol y secnidazol, siendo el metronidazol el fármaco de primera elección (tanto para amibiasis intestinal como extra-intestinal) debido a su acción altamente letal contra los trofozoítos, farmacocinética favorable, excelente biodisponibilidad y amplia distribución en las paredes intestinales y la mayoría de los tejidos [Salles *et al.*, 2007].

1.1.5. Fisiopatología

Las principales manifestaciones clínicas de la infección por *E. histolytica* son la colitis amibiana (intestinal) y el absceso hepático amibiano (extra-intestinal); además de otras patologías invasivas, como infecciones del tracto respiratorio y la amibiasis cerebral o genitourinaria, entre otros.

Colitis amibiana. La colitis amibiana (Figura 2) se caracteriza por la ulceración e inflamación del colon, la cual inicia cuando el trofozoíto tiene contacto con la capa mucosa y la degrada, accediendo a la superficie epitelial y permitiendo la adhesión celular, lo cual desencadena la expresión de su actividad citolítica y la inducción de la respuesta inflamatoria del hospedero [Bansal *et al.*, 2009]; ocasionando desde la erosión superficial de la mucosa colonizada hasta la formación de úlceras profundas (en forma de

botella) con bordes que socavan la mucosa y se extienden profundamente en el tejido [Mortimer y Chadee, 2010]. Esta patología tiene manifestaciones clínicas características que incluyen disentería o diarrea con sangre, colitis fulminante, apendicitis amiboide y amiboma de colon [Espinoza-Catellano y Martínez-Palomo, 2000]. La inflamación del intestino puede ser tan severa que la colitis amibiana suele ser confundida con la enfermedad inflamatoria intestinal.



Figura 2. Espécimen intestinal de un paciente con colitis amibiana aguda.

Tomado de Espinoza-Castellano y Martínez-Palomo, 2000.

Absceso hepático amibiano. El daño hepático (Figura 3) resulta de la migración de los trofozoítos del colon hacia el hígado, lo cual sucede una vez que éstos han penetrado al sistema porta, resistido el estrés que representa este nuevo ambiente, y seguido el flujo hasta el hígado [Santi-Rocca *et al.*, 2009]. Estos abscesos son regiones limitadas de hepatocitos muertos, células licuadas y restos celulares, rodeados por un borde de tejido conectivo, algunas células inflamatorias y trofozoítos [Stanley, 2001]. Las complicaciones más frecuentes de esta patología incluyen diseminación de las lesiones amibianas a estructuras cercanas como diafragma, espacio subfrénico, pleura, pulmones y pericardio [Salles *et al.*, 2007].

1.1.6. Virulencia

La virulencia de *E. histolytica* ha sido considerada como un proceso multifactorial, que incluye interacciones específicas a nivel celular y molecular. Se han



Figura 3. Espécimen de un paciente con absceso hepático amibiano.

Tomado de <http://www.stanford.edu/class/humbio103/ParaSites2006/Amoebiasis/>

relacionado a un número limitado de componentes amibianos como factores de virulencia, los cuales le permiten: (i) citoadherencia, mediada por una lectina de unión a residuos de galactosa y N-acetil-galactosamina; (ii) citólisis, inducida por tres proteínas formadoras de poros y una familia de cisteína proteinasas; y (iii) resistencia a especies reactivas de oxígeno, mediada por una peroxirredoxina, entre otros [Padilla-Vaca *et al.*, 1999; Que *et al.*, 2003; Santi-Rocca *et al.*, 2009].

Lectina de unión a residuos de galactosa y N-acetil-galactosamina. La destrucción de la células hospedero inicia una vez que el trofozoíto ha tenido contacto con la célula diana, acción que es mediada por algunos factores de virulencia clave, iniciando con la lectina de unión a Gal/NAcGal, la cual consiste de una subunidad pesada (*hgl*, 170 KDa) y una ligera (*lgl*, 31-35 KDa), unidas por enlaces disulfuro. Se ha observado que *hgl* tiene un dominio de unión a carbohidratos, el cual participa en la adhesión a las células diana; aunque la función de *lgl* no ha sido completamente estudiada, se ha encontrado que la regulación negativa de esta subunidad, en algunos casos, puede regular la virulencia del parásito [Padilla-Vaca *et al.*, 1999].

Cisteína proteinasas. Otro grupo importante de factores de virulencia amibiana es una familia de cisteína proteinasas (*CPs*) que se encargan principalmente de degradar la matriz extracelular. Aun cuando el proyecto genoma de *E. histolytica* ha mostrado la presencia de al menos 40 genes codificantes para *CPs*, pocos son expresados en trofozoítos, donde la *EhCP1* es una de las mayormente expresadas. En general, se ha encontrado que las *CPs* purificadas, recombinantes o nativas, hidrolizan colágeno, elastina, fibrinógeno y laminina, los cuales son elementos de la matriz extracelular; explicando la capacidad lítica e invasiva del parásito. Además, son hábiles para degradar elementos de la inmunidad humoral, como la IgA e IgG; y pueden interferir en la ruta alternativa del complemento, cortando la cadena α del componente C3 del complemento y degradando las anafilotoxinas C3a y C5a, lo cual correlaciona con la relativa escases de neutrófilos en abscesos hepáticos amibianos [Que *et al.*, 2003, Meléndez-López *et al.*, 2007].

Proteínas formadoras de poro. Los amibaporo (proteínas formadoras de poro) son una familia de proteínas membranales, contenidas en vesículas citoplásmicas de los trofozoítos, que juegan un papel muy importante en la virulencia del parásito, ya que se

consideran como los posibles mediadores de su actividad asesina. Estos componentes amibianos son capaces de lisar una amplia gama de células, incluyendo bacterianas y del hospedero, mediante la formación de poros en sus membranas (por oligomerización), afectando la integridad de la célula diana. La actividad permeabilizante de los amibaporo es dependiente del valor de pH del medio ambiente y de la protonación de un residuo de histidina; ya que, a valores de pH bajos (4 a 6), la forma protonada del residuo de histidina desencadena la dimerización y, posteriormente, la formación de estados oligoméricos de la proteína. Existen en tres isoformas de amibaporo (A, B, y C), las cuales consisten de 77 residuos de aminoácidos. La estructura del amibaporo A, el principal factor de virulencia de esta familia y mayormente estudiado, consistente de 5 α -hélices unidas por enlaces disulfuro, es ampliamente compartida por las isoformas B y C, tal como ha sido revelado mediante modelos moleculares [Leippe *et al.*, 2005].

Peroxirredoxina. E. histolytica usualmente reside y se reproduce en el colon humano, el cual constituye un ambiente de presión de oxígeno reducido. Durante la invasión a los tejidos, el parásito es expuesto a elevadas cantidades de especies reactivas de oxígeno (ROS) exógenas, como aniones radicales de superóxido (O_2^-) y peróxido de hidrógeno, las cuales dañan macromoléculas biológicas, causando un mal funcionamiento metabólico que puede matar al parásito. Como mecanismo de defensa, *E. histolytica* cuenta con una peroxirredoxina de 29 kDa (Ehp29), dependiente de tioles, en su superficie exterior, que reduce y detoxifica peróxidos y peroxinitritos bajo condiciones de estrés oxidativo. Interesantemente, se ha reportado que la regulación negativa de Ehp29 correlaciona con una elevación de los niveles de H_2O_2 , presumiblemente por el silenciamiento de la peroxirredoxina [Sen *et al.*, 2007].

1.2. Proteína disulfuro isomerasa (PDI)

1.2.1. Importancia de PDI

Los experimentos realizados por Anfinsen en 1961, con proteínas que poseen enlaces disulfuro, proporcionaron las primeras evidencias de que el plegamiento de proteínas es un proceso espontáneo y que no requiere otros factores para lograr el estado nativo *in vitro*, más que la proteína en sí. Sin embargo, la observación de que este

proceso era muy lento, en relación al esperado para la correcta formación de enlaces disulfuro, condujo a la búsqueda de un catalizador celular para este proceso. Como resultado de la búsqueda, se identificó a la proteína disulfuro isomerasa (PDI), una oxidoreductasa tiol/disulfuro que cataliza la oxidación, reducción e isomerización de enlaces disulfuro en polipéptidos nacientes, hasta alcanzar su conformación nativa y funcional [LaMantia y Lennarz, 1993]. La formación de puentes disulfuro ocurre en el lumen del retículo endoplásmico, donde el estado redox es más oxidante que en el citosol. La concentración de PDI en este compartimento ha sido estimada entre 0.2 y 0.5 mM.

Independientemente de su función principal como oxidoreductasa, PDI actúa como chaperona, inhibiendo la agregación de sustratos y facilitando su correcto plegamiento [Gruber *et al.*, 2006]. Por otro lado, es capaz de formar complejos heteroméricos; *p.e.*, es la subunidad β de la prolil 4-hidroxilasa, enzima tetramérica $\alpha_2\beta_2$ que cataliza la formación de residuos de 4-hidroxiprolina (requeridos para la estabilidad de colágeno y otras proteínas con estructuras parecidas a colágeno). Además, recientemente ha sido implicada en la degradación de proteínas no plegadas o incorrectamente plegadas, mediante su participación en el mecanismo de degradación asociada al retículo endoplásmico (ERAD) [Lee *et al.*, 2010].

1.2.2. Familia de PDI

PDI, y proteínas relacionadas, forman una familia compleja de proteínas que incluye al menos seis sub-familias: PDI, ERp57, ERp72, PDIR, P5, y PDI-D. Estructuralmente, las proteínas PDI comparten una región, de ± 100 residuos de aminoácidos, que es altamente homóloga a la proteína procariótica tiorredoxina, conocida como “dominio tiorredoxina o dominio-Trx”. El sitio activo de los dominios-Trx contienen el motivo WCGHCK, en el cual los dos residuos de cisteína ciclan entre estados de oxidación ditiol y disulfuro [Monnat *et al.*, 2000].

1.2.3. Familia PDI de *E. histolytica*

Para *E. histolytica* la formación correcta de enlaces disulfuros intra- o inter-moleculares es una modificación bioquímica importante para que algunos polipéptidos logren su conformación nativa y funcional, incluyendo algunos factores de virulencia. De

esta manera, la identificación y caracterización de enzimas que juegan papeles clave en el plegamiento oxidativo de proteínas es esencial para entender este proceso bioquímico [Ramos et al., 2005]. Mediante la realización de un análisis *post*-genómico, se encontró que *E. histolytica* posee una familia PDI conformada por 11 polipéptidos [Ramos et al., 2007].

1.2.4. *EhPDI* como modelo de PDI amibiana

La proteína *EhPDI* es probablemente la principal enzima PDI involucrada en el plegamiento de proteínas en *E. histolytica*, ya que presenta las características estructurales observadas en otras proteínas homólogas funcionales, como la PDI de *D. discoideum*, es activamente expresada en el estadio de trofozoíto y exhibe actividad oxidasa in vivo [Mares et al., 2010; Ramos et al., 2011]. *EhPDI* es expresada como una pre-proteína 337 residuos de aminoácidos, con una masa molecular calculada de 38 kDa. Mediante los análisis de predicción de estructura polipeptídica, se identificaron (Figura 4): un péptido señal de 15 residuos de aminoácidos, dos dominios-Trx funcionales (que presentan el motivo WCGHCK), y un dominio C-terminal, con alta similitud al dominio C-terminal de la proteína Erp29 (dominio D). Cabe mencionar que esta arquitectura es compartida por algunos miembros PDI de la clase 2 [Ramos et al., 2005]. Interesantemente, *EhPDI* carece de la secuencia canónica de retención/recuperación al retículo endoplásmico (K/HDEL) presente en el extremo C-terminal de proteínas solubles residentes de ese compartimento. La ausencia de la secuencia K/HDEL en proteínas PDI es una característica que ya ha sido estudiada en el homólogo de *D. discoideum* (*DdPDI*). Los resultados reportados demuestran que un segmento de 57 residuos de aminoácidos

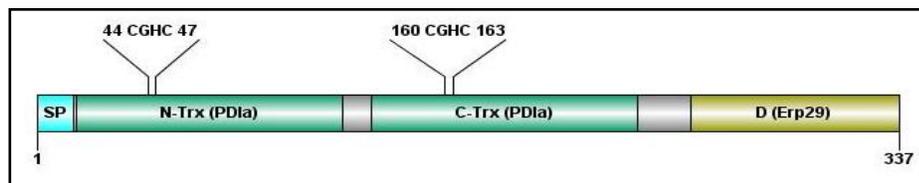


Figura 4. Representación esquemática de la estructura primaria de la *EhPDI*.

Se identifican el péptido señal (SP), los dominios Trx, y el dominio D. Además se señala la posición de los motivos estructurales de los dominios Trx.

del extremo C-terminal de *DdPDI*, llamado dominio D, es necesario para la retención intracelular de la proteína y suficiente para localizar a la proteína quimérica GFP-D en el retículo endoplásmico, sugiriendo la existencia de un mecanismo alternativo de retención [Monnat *et al.*, 2000].

1.3. Retículo endoplásmico

Típicamente, la membrana del retículo endoplásmico constituye más de la mitad del total de membrana celular. Está organizado como un laberinto en forma de red de túbulos ramificados y sacos aplanados que se extiende a través del citosol. Los túbulos y sacos se interconectan, y su membrana es continua con la membrana nuclear externa. De esta forma, el retículo endoplásmico y la membrana nuclear forman una capa continua, encerrando un solo espacio, llamado lumen, el cual ocupa más del 10% del volumen celular total [Alberts *et al.*, 2008].

El retículo endoplásmico es el primer organelo de la vía de secreción y, además, representa el sitio de ingreso de los polipéptidos recién sintetizadas al sistema túbulo-

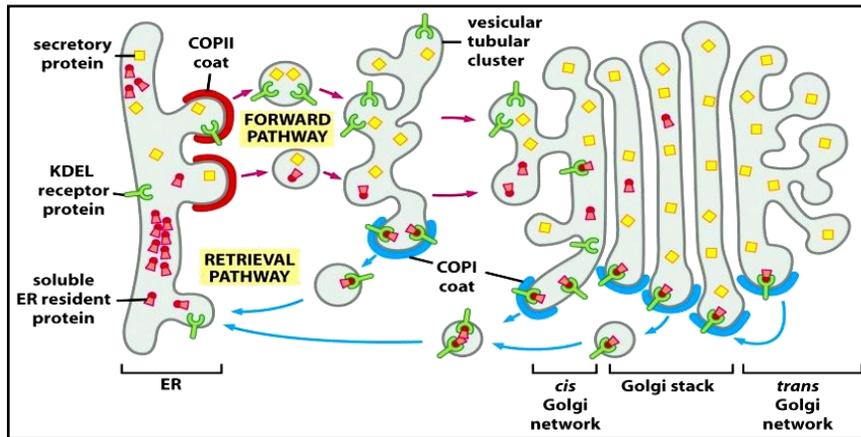


Figura 5. Modelo de recuperación de proteínas solubles residentes de retículo endoplásmico.

La recuperación de las proteínas inicia en agrupamientos tubulares vesiculares y continúa desde todas partes del aparato de Golgi. En el ambiente del retículo endoplásmico, las proteínas residentes de RE se disocian del receptor KDEL, el cual es regresado al aparato de Golgi para ser reutilizado.

vesicular endomembranoso [Monnat *et al.*, 2000]; es decir, los polipéptidos son procesados en este compartimento y posteriormente conducidos hacia su respectivo destino final (retículo endoplásmico, aparato de Golgi, lisosomas, endosomas, vesículas secretoras y la membrana plasmática) [Alberts *et al.*, 2008]. Se estima que aproximadamente una tercera parte de las proteínas eucarióticas pasan a través del retículo endoplásmico en su camino a la maduración [Gruber *et al.*, 2006].

1.3.1. Mecanismo de retención en el RE

El mecanismo de retención/recuperación de proteínas residentes del retículo endoplásmico depende de señales presentes en las proteínas residentes de este compartimento (Figura 5); *p.e.*, las proteínas membranales contienen señales que las unen directamente a la cubierta de COPI, y así empacadas en vesículas para su transporte retrógrado. El mecanismo de localización al retículo endoplásmico mejor estudiado es el que involucra el reconocimiento de la secuencia H/KDEL en el extremo C-terminal de las proteínas lumbales [Alberts *et al.*, 2008]. La interacción de esta señal y el receptor de *cis*-Golgi ERD2 es el mecanismo más conservado. La unión óptima entre señal y receptor ocurre a pH ácido, sugiriendo que la unión selectiva K/HDEL-ERD2 en Golgi y su separación en el retículo endoplásmico pueden ser facilitadas por la diferencia de valores de pH entre ambos compartimentos [Townesley *et al.*, 1994]. Por otro lado, un mecanismo alternativo ha sido identificado en *D. discoideum*: el dominio D, rico en α -hélices, es necesario para la retención intracelular de DdPDI y suficiente para localizar proteínas al retículo endoplásmico. Esto último sugiere la existencia de dos mecanismos evolutivamente divergentes para la retención/recuperación de proteínas residentes del retículo endoplásmico [Ramos *et al.*, 2005].

1.3.2. Evidencia del retículo endoplásmico en *E. histolytica*

A pesar de que *E. histolytica* no presenta un retículo endoplásmico típico (parecido al compartimento observado en células eucarióticas modelo), algunos estudios moleculares sugieren la existencia de un compartimento funcional equivalente; esto es, la identificación de: (i) la subunidad de 54 KDa de la partícula de reconocimiento de la secuencia señal [Ramos *et al.*, 1997], (ii) la proteína Sec61 (componente central del

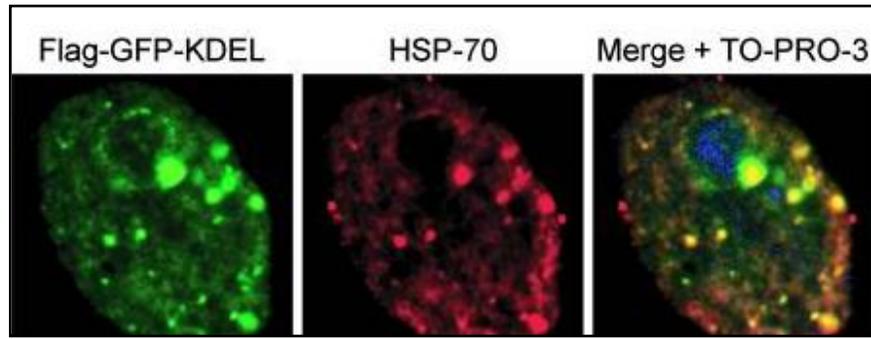


Figura 6. Expresión y visualización de la proteína de GFP-KDEL en *E. histolytica*.

Microscopía de inmunofluorescencia confocal demostrando la co-localización de GFP-KDEL y BiP en trofozoítos amibianos fijados. Los trofozoítos de *E. histolytica* fueron fijados con paraformaldeído, permeabilizados y teñidos con anticuerpos monoclonales de ratón anti-FLAG y policlonales de conejo anti-BiP, seguido de un reconocimiento con conjugados anti-ratón acoplado a Alexa 488 (verde) y anti-conejo acoplado a Alexa 568 (rojo). El núcleo fue teñido con TO-PRO-3 (azul). Tomado de Teixeira y Huston, 2008.

aparato de translocación) [Sánchez *et al.*, 2005], (iii) la subunidad STT3 del complejo oligosacariltransferasa [Salgado *et al.*, 2005], y (iv) la proteína disulfuro isomerasa *EhPDI* [Ramos *et al.*, 2005], hacen patente la presencia de funciones exclusivas del retículo endoplásmico. En otro estudio, donde se utilizaron técnicas de microscopía de inmunofluorescencia, fue posible evidenciar un retículo endoplásmico continuo en trofozoítos de *E. histolytica* HM-1:IMSS (Figura 6) [Teixeira y Huston, 2008].

1.4. *Saccharomyces cerevisiae* como modelo

1.4.1. *S. cerevisiae* como célula eucarótica modelo

La levadura *S. cerevisiae* fue el primer organismo eucariótico cuyo genoma fue completamente secuenciado. Posee un conjunto haploide de 16 cromosomas bien caracterizados, abarcando desde 200 a 2,200 Kb. La secuencia cromosómica total constituye 12.071 Mb, de la cual se han reportado 6,281 genes (5,863 codificantes para proteínas). Un total de 3.8% de los genes contienen intrones. El genoma es altamente compacto, con genes representando el 72% de la secuencia total. Aproximadamente el 30% de los genes han sido caracterizados experimentalmente, mientras que la mitad del

70% restante contiene motivos aparentemente funcionales, similares a aquellos previamente caracterizados en su relación estructura-función [Sherman, 1998].

Además, la levadura *S. cerevisiae* reúne varias características celulares que le permiten ser utilizada como modelo para estudios de biología: no es patógena, es de rápido crecimiento, tiene facilidad de réplica y aislamiento de mutantes, posee un sistema genético bien definido, y lo más importante, es un sistema altamente versátil para transfección. Por otro lado, posee dos estados genéticos estables (haploide y diploide), por lo que es muy útil en ensayos de complementación con mutaciones recesivas [Karathia *et al.*, 2011].

1.4.2. S. cerevisiae como modelo heterólogo

La levadura se ha convertido en un organismo clave para la investigación genómica, incluyendo análisis de expresión y función genética, localización de proteínas y actividades enzimáticas, y el análisis de interacciones proteína-proteína, entre muchas otras. Además, es posible introducir genes de otros organismos para realizar estudios sistemáticos de las funciones de sus productos [Mattanovich *et al.*, 2012].

1.5. PDI de Dictyostelium Discoideum

En la mayoría de los casos estudiados, PDI y proteínas relacionadas se comportan como proteínas residentes de RE. Esta distribución de estado fijo de PDI es el resultado de una combinación de retención directa y recuperación de su escape del RE. La mayoría de las proteínas residentes poseen una etiqueta de retención al RE en el C-terminal, pero se han reportado algunas excepciones a esa regla: *Acanthamoeba castellanii*, alfalfa, *Onchoecerca volvulus* y más recientemente, *Dictyostelium discoideum*; siendo este último el primer caso reportado en un organismo genéticamente tratable que permitió la investigación de los mecanismos no clásicos de retención/recuperación de la PDI a nivel molecular. La PDI de *D. discoideum* presenta dos motivos Tiorredoxina, carece de dominios b y b', así como de la secuencia de recuperación tipo H/KDEL y se ha identificado un segmento de 57 residuos en su C-terminal que le permite retener a GFP en el RE [Monnat *et al.*, 2000].

2. JUSTIFICACIÓN

La ausencia de una señal de retención canónica en algunas proteínas residentes del retículo endoplásmico es intrigante. Además, la existencia de un posible mecanismo alternativo de retención/recuperación de proteínas solubles residentes de este compartimiento es realmente atrayente (científicamente).

Por otro lado, la ausencia de una señal similar a KDEL en la proteína disulfuro isomerasa de *E. histolytica* (*EhPDI*) y la presencia de un dominio con características estructurales compartidas con el homólogo de *D. discoideum* es relevante, especialmente si se considera que la *EhPDI* representa un posible blanco para el diseño de moléculas terapéuticas con actividad anti-amibiana.

Aunque *E. histolytica* está muy lejos de ser un modelo experimental típico, es un reto para muchos parasitólogos evolucionistas. El análisis de su genoma permite conocer mejor al parásito y, a su vez, favorece la generación de nuevas hipótesis encaminadas a comprender sus mecanismos de interacción con el hospedero.

3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

3.1. Hipótesis

El dominio D de la proteína disulfuro isomerasa de *E. histolytica* (*EhPDI*) participa en un mecanismo de retención intracelular de proteínas en levadura.

3.2. Objetivo general

Determinar el papel funcional del dominio D de la proteína disulfuro isomerasa de *E. histolytica* (*EhPDI*), mediante un ensayo de complementación y rescate del fenotipo letal de la mutante Δ PDI de *S. cerevisiae*, para valorar su posible participación en un mecanismo de retención intracelular de proteínas.

3.3. Objetivos específicos

1. Obtener un plásmido de expresión en levadura que contenga la proteína *EhPDI* con el dominio D nativo (pYEhPDI2), mediante una estrategia de ingeniería de plásmidos.
2. Comprobar el papel funcional del dominio D de la proteína *EhPDI* mediante un ensayo de complementación en la mutante Δ PDI1/pCT38 de *S. cerevisiae*, utilizando el plásmido pYEhPDI2.
3. Obtener un grupo de plásmidos de expresión en levadura que contengan las variantes de la proteína *EhPDI*, con mutaciones por delección de las α -hélice del dominio D, mediante una estrategia de ingeniería de plásmidos.
4. Comprobar el papel funcional individual de cada α -hélice del dominio D de la proteína *EhPDI* mediante ensayos de complementación en la mutante Δ PDI1/pCT38 de *S. cerevisiae*, utilizando las variantes del plásmido pYEhPDI2.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Reactivos biológicos y químicos

4.1.1. Oligonucleótidos sintéticos

Los oligonucleótidos universales (M13FW y M13RV) y el N47.RM fueron utilizados para la amplificación del segmento correspondiente al carboxilo terminal de la enzima *EhPDI*. Los oligonucleótidos sintéticos para la construcción de las variantes mutagénicas del dominio D de *EhPDI* fueron diseñados de manera manual, utilizando como molde la predicción de la estructura secundaria. Todos los oligonucleótidos fueron adquiridos de la compañía *Operon Technologies* (Tabla 1).

Tabla 1. Oligonucleótidos sintéticos.

Nomenclatura	Secuencia nucleotídica 5' → 3'	Sitio de Restricción
M13FW	gtaaaacgacggccagtg	-
M13RV	ggaaacagctatgaccatg	-
N47.RM	gtggacattcgaaaaaacttg	-
P38DD9R	gacgac <u>ctcgag</u> tttagttttcctaagattttattgat	<i>Xho</i> I
P38DD89R	gacgac <u>ctcgag</u> ttatcctctctcaataattccttt	<i>Xho</i> I
P38DD789R	gacgac <u>ctcgag</u> ttatccttcaattgcctcagcttt	<i>Xho</i> I
P38DD6789R	gacgac <u>ctcgag</u> ttaaaggatcaatcaagttcagcaat	<i>Xho</i> I
P38DDR	gacgac <u>ctcgag</u> ttaga <u>attc</u> taattttccattctcatctct	<i>Xho</i> I, <i>Eco</i> RI
P38DD5F	gacgac <u>gaatt</u> caaagatgaaattataaaaaaa	<i>Eco</i> RI
P38DD56F	gacgac <u>gaatt</u> cggagcttattacgttaaagtc	<i>Eco</i> RI
P38DD567F	gacgac <u>gaatt</u> cggagcagattatgtagaaaaa	<i>Eco</i> RI
P38DD5678F	gacgac <u>gaatt</u> catgaaagccaagaaaattgat	<i>Eco</i> RI

Las secuencias reconocidas por las endonucleasas se muestran subrayadas.

4.1.2. Plásmidos

Los plásmidos utilizados, y sus características moleculares, se muestran en la Tabla 2. Todos los plásmidos fueron obtenidos de la reserva de productos biológicos del Laboratorio de Biotecnología de la Facultad de Ciencias Químicas e Ingeniería, UABC.

Tabla 2. Plásmidos utilizados.

Nombre	Características moleculares	Fuente
pBluescript SK(-)	Plásmido de clonación en bacteria. Contiene los orígenes de replicación f1 (bacteriófago) y ColE1 (bacteria). Expresa el gen que confiere resistencia a ampicilina (β -lactamasa). Contiene un sitio de clonaciones múltiples (MCS) que se encuentra interrumpiendo el gen <i>LacZ</i> (codificante para β -galactosidasa).	<i>Stratagene</i>
pRS413	Plásmido de expresión en levadura. Contiene los orígenes de replicación f1 (bacteriófago), pMB1 (bacteria) y CEN/ARS (levadura). Expresa el gen que codifica para la β -lactamasa (para selección en bacterias), y el gen que codifica para HIS3 (que complementa la auxotrofia a histidina en levaduras $\Delta his2$). Contiene un sitio de clonaciones múltiples (MCS) flanqueado por los promotores T3 y T7.	<i>New England Biolabs</i>
pBPelB:EhPDI	Plásmido de expresión en bacteria. Derivado de pBluescript. Contiene la secuencia codificante para PelB:EhPDI bajo el control del promotor de lactosa, lo que permite la expresión periplásmica inducida de la proteína disulfuro isomerasa de 38 KDa de <i>E. histolytica</i> .	Ramos <i>et al.</i> , 2005.
pYScPDI1	Plásmido de expresión en levadura. Derivado de pRS413. Contiene la secuencia codificante para ScPDI1 completa (incluyendo su péptido señal y la secuencia canónica HDEL) bajo el control de su propio promotor, lo que permite su localización y expresión constitutiva en el retículo endoplásmico (RE).	Mares, 2009.
pYEhPDI	Plásmido de expresión en levadura. Derivado de pRS413. Contiene la secuencia codificante para el péptido maduro de EhPDI fusionado al promotor más el péptido señal de ScPDI1 y etiquetada con la secuencia HDEL, lo que permite localización y expresión constitutiva de EhPDI en el RE.	Mares, 2009.

4.1.3. Células y medios de cultivo

La cepa XL1 Blue MRF⁺ de *Escherichia coli* (*Stratagene*) fue utilizada en los ensayos de biología molecular. Los cultivos bacterianos se realizaron en medios complejos (LB o 2X YT), líquidos y sólidos (suplementados con 1.7% de agar) [Sambrook *et al.*, 2001]. Los medios de cultivo se prepararon como se muestra en la tabla de la derecha (en g/L).

La cepa haploide RSA-416/pCT38 (*his3 leu2 ura3 pdi1::kanMX* pCT38 [CEN/ARS URA3 ScPDI1]) de *Saccharomyces cerevisiae* fue utilizada para los ensayos de complementación funcional y rescate de

Componente	LB	2X YT
Triptona	10	16
Extracto de levadura	5	10
NaCl	10	5

fenotipo letal [Mares *et al.*, 2009]. Esta cepa fue obtenida mediante un análisis aleatorio de esporas de la cepa diploide BY4743-YCL043c (*MAT a/α his3/his3 leu2/leu2 lys2/LYS2 met15/MET15 ura3/ura3 PDII/pdi1::kanMX*) (*Open Biosystems*), después de una transfección con el plásmido pCT38, el cual se replica de manera centromérica, complementa la auxotrofia a uracilo y expresa a la proteína ScPDI1 de manera constitutiva [Tachibana *et al.*, 1992].

La cepa haploide RSA-416/pCT38 fue cultivada en medios líquidos o sólidos (2% de agar). Para la propagación celular se utilizó el medio complejo YPD +G418 (1% de extracto de levadura, 2% de peptona y 2% de glucosa, suplementado con 200 µg/mL de geneticina G-418) o el medio mínimo SD +H +L +G418 (SD: 0.67% de “*YNB w/o amino acids*” y 2% de glucosa; suplementado con 20 mg/L de histidina, 60 mg/L de leucina y 200 µg/mL de G-418). Por otro lado, en los ensayos de complementación, la cepa RSA-416/pCT38 portadora de los plásmidos derivados de pRS413 (pYScPDI1, pYEhPDI y sus variantes) fue seleccionada en medio mínimo carente de histidina (SD +Leu +G418); además, para segregar el plásmido pCT38, los complementantes fueron seleccionados en el medio mínimo carente de histidina, pero suplementado con 0.1 % de ácido 5-fluororótico y 20 mg/mL de uracilo (SD +L +G418 +FOA +U).

4.1.4. Enzimas y otros reactivos biológicos

La ADN polimerasa de la bacteria *T. aquaticus* y la ADN ligasa del bacteriófago T4 fueron adquiridas de las compañías *Qiagen* y *New England Biolabs*, respectivamente. Las endonucleasas de restricción *EcoRV* y *XhoI* fueron obtenidas de *New England Biolabs*, en tanto *HindIII*, *BamHI*, *NcoI* y *XbaI* de *Fermentas*. La mezcla de desoxirribonucleótidos trifosfatados (dNTPs) y los marcadores de peso molecular de ADN (λ - *Hind III*) y proteínas (*ColorPlus™ Prestained Protein Marker Broad Range* y *Prestained Protein Marker Broad Range*) se adquirieron de *New England BioLabs*.

4.1.5. Reactivos químicos

Los reactivos químicos utilizados grado biología molecular: agarosa, tris base (tris-[hidroxietil]-aminometano), SDS (dodecil sulfato de sodio) y EDTA (ácido etilendiamino tetra-acético) fueron adquiridos de la compañía *IBI*; mientras que cloruro

de calcio, cloruro de sodio, bromuro de etidio, ampicilina, *YNB w/o aminoacids* (mezcla base de fuentes de nitrógeno sin aminoácidos), las perlas de vidrio tratadas con ácido, azul de xilencianol y azul de bromofenol fueron adquiridos de la compañía *Sigma* de México. De la compañía *Invitrogen* se utilizó la geneticina G-418; el ácido 5-fluoro-orótico (5-FOA) de *Toronto Research Chemicals*; el isopropanol y la dextrosa de la compañía *Productos Químicos de Monterrey*.

4.1.6. *Sistemas de purificación*

Todos los estuches comerciales para purificación de ADN fueron adquiridos de la compañía *Qiagen* y utilizados de acuerdo a las indicaciones establecidas por el proveedor. La purificación de ADN plasmídico se realizó con el estuche *QIAprep Spin Miniprep Kit*, la extracción de fragmentos de ADN a partir del gel de agarosa con el estuche *QIAquick Gel Extraction Kit* y la purificación de productos de PCR con el estuche *PCR Purification Kit*.

4.2. Equipos

La amplificación de ADN se realizó utilizando el termociclador *Multigene (LabNet)*. La visualización de geles de agarosa teñidos con bromuro de etidio se llevó a cabo usando el fotodocumentador *Gel Doc 2000 (Bio-Rad)*. La transfección de células de levadura se realizó mediante el equipo electroporador *Electro Cell Manipulator (Harvard Apparatus)*. Las lecturas de absorbancia fueron obtenidas usando el lector de microplacas *Microplate Reader 680 (Bio-Rad)*.

4.3. Protocolos generales

4.3.1. *Condiciones típicas de amplificación (PCR)*

Las mezclas de reacción se llevaron a cabo en un volumen final de 50 μ L, conteniendo 0.5 a 5.0 ng de ADN molde, 20 *p*moles de oligonucleótidos y 2.5 U de ADN polimerasa, en una solución amortiguadora 1X para reacciones de *PCR* (de acuerdo a las recomendaciones del proveedor). La amplificaciones se llevaron a cabo mediante las

siguientes condiciones de termociclado: 1 ciclo de desnaturalización inicial [2:00 a 94 °C]; 35 ciclos de amplificación exponencial [0:20 a 94 °C, 0:20 a 55 °C, 0:30 a 72 °C]; y 1 ciclo de extensión final [7:00 a 72 °C].

4.3.2. *Purificación de productos de la reacción de PCR*

Los productos de PCR fueron purificados siguiendo el protocolo recomendado por el proveedor (*Qiagen*): el volumen de la reacción fue mezclado con 5 volúmenes de amortiguador PB. La mezcla se transfirió a una columna *QIAquick Spin Column* y se centrifugó a 14,500 rpm durante 1 min. La columna fue lavada con 750 µL de amortiguador PE. El ADN fue eluído con 50 µL de agua destilada estéril mediante centrifugación a 14,500 rpm durante 1 min.

4.3.3. *Purificación de fragmentos de ADN a partir de gel de agarosa*

Los fragmentos de ADN fueron purificados a partir de gel de agarosa siguiendo las instrucciones recomendadas por el proveedor (*Qiagen*): la pieza de gel conteniendo el fragmento de interés fue redissuelto en 3 volúmenes de amortiguador QG mediante incubación a 55 °C durante 10 min. Enseguida, un volumen de isopropanol fue añadido, la mezcla se transfirió a una columna *QIAquick Spin Column* y se centrifugó a 14,500 rpm durante 1 min. La columna fue lavada con 750 µL de amortiguador PE. El ADN fue eluído con 30 µL de agua destilada estéril mediante centrifugación a 14,500 rpm durante 1 min.

4.3.4. *Purificación de ADN plasmídico*

La purificación de ADN plasmídico fue realizada mediante el protocolo recomendado por el proveedor (*Qiagen*): el paquete celular fue separado de un cultivo bacteriano de 1.5 mL mediante centrifugación a 10,000 rpm durante 2 min. La pastilla celular fue resuspendida en 250 µL de amortiguador P1 y mezclada con 250 µL de amortiguador P2. De manera inmediata, la mezcla fue neutralizada con 350 µL del amortiguador N3. Las proteínas precipitadas fueron separadas mediante centrifugación a 14,500 rpm durante 10 minutos y el sobrenadante fue transferido a una columna de *QIAprep Spin Column*. La columna fue lavada con 500 µL de amortiguador PB y 750 µL

del amortiguador PE. El ADN plasmídico fue recuperado en 100 μ L de agua destilada estéril mediante centrifugación a 14,500 rpm durante 1 min.

4.3.5. Análisis de ADN mediante electroforesis en gel de agarosa

Las diferentes muestras de ADN fueron analizadas mediante electroforesis en gel de agarosa (1 a 1.5%), conteniendo 0.5 μ g/mL de bromuro de etidio.

4.3.6. Transformación bacteriana

Las bacterias fueron transformadas mediante choque térmico. Las células competentes de *E. coli* fueron preparadas a partir de 1 mL de cultivo, siguiendo el protocolo estándar de laboratorio [Sambrook et al., 2001]. 1-2 μ L de la muestra de ADN (plásmido o ligación) fueron mezclados con 100 μ L de células competentes y mantenidos en hielo durante 30 min. Posteriormente, la mezcla fue colocada en un bloque térmico a 42 °C, mantenida durante 1.5 min, inmediatamente regresada a hielo y mantenida durante 5 min.

Las células fueron recuperadas en 1 mL de medio 2X YT e incubadas durante 1 h a 37 °C. La pastilla celular fue obtenida mediante centrifugación a 10,000 rpm durante 2 min. Las células fueron sembradas en medio LB sólido, suplementado con ampicilina a 150 μ g/mL (como marcador de selección) e incubadas durante la noche a 37 °C. Al día siguiente, las unidades formadoras de colonia capaces de crecer en presencia del antibiótico fueron consideradas como estables.

4.4. Construcción de plásmido pYEhPDI2, portador de *EhPDI* silvestre

La construcción del plásmido pYEhPDI2 (6587 pb) se realizó mediante la sustitución del extremo C-terminal del plásmido pYEhPDI (el cual contiene la secuencia codificante para *EhPDI* etiquetada con la señal HDEL en el extremo C-terminal) con la secuencia equivalente del plásmido pBPelB:EhPDI (la cual contiene la secuencia nativa). La sustitución se realizó mediante ligación de fragmentos de digestión con las endonucleasas *EcoRV* y *XhoI*.

4.4.1. Preparación del inserto y el vector

Amplificación de EhPDI silvestre. La secuencia codificante para *EhPDI* silvestre (carente de la etiqueta HDEL, denominado *EhPDI2*) fue amplificada mediante una reacción típica de *PCR* (protocolo general 4.3.1), usando los oligonucleótidos M13RV y M13FW (Tabla 1) como iniciadores y el plásmido pBPelB:EhPDI como molde (Tabla 2) [Ramos, 2005].

Digestión y purificación de PPCR EhPDI2 y de pYEhPDI. El producto de amplificación *EhPDI2* y el vector pYEhPDI fueron digeridos con las enzimas de restricción *EcoRV* y *XhoI*, siguiendo las recomendaciones del proveedor. El PPCR *EhPDI2* digerido fue purificado mediante columna (protocolo general 4.3.2), en tanto el vector pYEhPDI digerido fue purificado a partir de gel de agarosa (protocolo general 4.3.3). La recuperación y la pureza de los fragmentos fueron verificadas mediante electroforesis en gel de agarosa (protocolo general 4.3.5).

4.4.2. Clonación del plásmido recombinante

Ligación de PPCR EhPDI2 y pYEhPDI. Los fragmentos de digestión purificados y portadores de extremos compatibles (cohesivo-*XhoI*/romo-*EcoRV*) fueron ligados durante la noche a 15 °C, usando la T4 ADN ligasa y las condiciones de reacción recomendadas por el proveedor.

Transformación bacteriana. El producto de la ligación pYEhPDI2 fue transfectado mediante choque térmico en células de *E. coli* XL1-Blue MRF' competentes (protocolo general 4.3.6).

Selección y análisis de clonas positivas. Las transformantes estables fueron sembradas en medio LB líquido, suplementado como ampicilina a 150 µg/mL. A partir de 1.5 mL de cultivo, se purificó el ADN plasmídico (protocolo general 4.3.4). Posteriormente, las clonas positivas fueron identificadas mediante un análisis de restricción con las endonucleasas *BamHI* y *HindIII*. Adicionalmente, las clonas positivas fueron caracterizadas mediante la obtención de un patrón de fragmentos de restricción esperado, utilizando las endonucleasas *BamHI*, *EcoRV*, *HindIII*, y *NcoI*.

4.5. Construcción de las variantes por delección del dominio D de *EhPDI2*

4.5.1. Diseño de oligonucleótidos

Para el análisis de mutantes del dominio D de *EhPDI2*, se realizó el diseño de oligonucleótidos que permitieran la amplificación de un fragmento del gen que incluyera el dominio D con remociones seriadas de las α -hélices inferidas (Tabla 1). Para los oligonucleótidos en fase R (9R, 89R, 789R, y 6789R), se incluyó el sitio de reconocimiento para la endonucleasa *XhoI*, con el objeto de facilitar la sub-clonación subsecuente; en el único caso de la oligonucleótido DDR, se incluyeron los sitios de reconocimiento para las endonucleasas *XhoI* y *EcoRI*, este último con el objeto de facilitar la sub-clonación (subsecuente) de los fragmentos amplificados con los oligonucleótidos en fase F (5F, 56F, 567F, y 5678F). La Figura 7 muestra el patrón de remociones del dominio D esperado en las variantes de *EhPDI2*. La inferencia de las hélices alfa se realizó mediante un alineamiento de secuencias de este dominio con los dominios D de las proteínas Wind de *D. melanogaster*, ERp29 de murino, ERp29 de humano y PDI de *D. discoideum* del que, posterior al análisis comparativo, se infirió la longitud de cada hélice para el diseño de los oligonucleótidos.

4.5.2. Preparación de los insertos

Amplificación de las variantes de EhPDI2. La secuencia codificante para las

	<-- h5 -->	<----- h6 ----->	<---- h7 ---->	<---- h8 ----->	<----- h9 ----->
WT	KTAGRIAELDDLAKGFANKENKDEI	IKKAEAEIEGGAYYVKVMKRI	IERGADYVEKEKARINKILEN	PSMKAKKIDDFTRNLNVLEVF	
9R	KTAGRIAELDDLAKGFANKENKDEI	IKKAEAEIEGGAYYVKVMKRI	IERGADYVEKEKARINKILEN		
89R	KTAGRIAELDDLAKGFANKENKDEI	IKKAEAEIEGGAYYVKVMKRI	IERG		
789R	KTAGRIAELDDLAKGFANKENKDEI	IKKAEAEIEG			
6789R	KTAGRIAELDDL				
DD					
5F		KDEI	IKKAEAEIEGGAYYVKVMKRI	IERGADYVEKEKARINKILEN	PSMKAKKIDDFTRNLNVLEVF
56F			GAYYVKVMKRI	IERGADYVEKEKARINKILEN	PSMKAKKIDDFTRNLNVLEVF
567F				GADYVEKEKARINKILEN	PSMKAKKIDDFTRNLNVLEVF
5678F					MKAKKIDDFTRNLNVLEVF

Figura 7. Patrón de remociones seriadas del dominio D de la proteína *EhPDI*.

La nomenclatura indica las α -hélices removidas y la direccionalidad de la seriación (F, de izquierda a derecha; R, de derecha a izquierda). WT, secuencia silvestre del dominio D de *EhPDI*.

variantes del dominio D de *EhPDI2* fue amplificada mediante una reacción típica de *PCR* (protocolo general 4.3.1), usando como molde el plásmido pYEhPDI2 y como iniciadores el oligonucleótido N47.RM y los oligonucleótidos en fase R (Tabla 1: 9R, 89R, 789R, y 6789R) para los fragmentos DDR, o el oligonucleótido M13RV y los oligonucleótidos en fase F (Tabla 1: 5F, 56F, 567F, y 5678F) para los fragmentos DDF.

Digestión y purificación de los PPCR EhPDI2-DDR y EhPDI2-DDF. Los productos de amplificación *EhPDI2-DDR* (en fase R) fueron digeridos con las endonucleasas *EcoRV* y *XhoI*, en tanto aquellos en fase F (*EhPDI2-DDF*) fueron digeridos con las endonucleasas *EcoRI* y *XbaI*, siguiendo las recomendaciones del proveedor. Los productos de *PCR* (DDR y DDF) digeridos fueron purificados mediante columna (protocolo general 4.3.2). La recuperación y la pureza de los fragmentos fueron verificadas mediante electroforesis en gel de agarosa (protocolo general 4.3.5).

Digestión y purificación del plásmido pYEhPDI2. Como primera etapa en la obtención de variantes, el plásmido pYEhPDI2 fue digerido con una mezcla de endonucleasas *EcoRV/XhoI* y, posteriormente, fue purificado a partir de gel de agarosa (protocolo general 4.3.3). La recuperación y la pureza de los fragmentos fueron verificadas mediante electroforesis en gel de agarosa (protocolo general 4.3.5). El plásmido pYEhPDI2 con los extremos *EcoRV*-romo y *XhoI*-cohesivo fue utilizado para sub-clonar los productos de *PCR EhPDI2-DDR*.

Digestión y purificación del plásmido pYEhPDI2-DD. Como segunda etapa en la obtención de variantes, el plásmido pYEhPDI2-DD (obtenido en la primera etapa) fue digerido con una mezcla de endonucleasa *EcoRI/XbaI* y, posteriormente, fue purificado a partir de gel de agarosa (protocolo general 4.3.3). La recuperación y la pureza de los fragmentos fueron verificadas mediante electroforesis en gel de agarosa (protocolo general 4.3.5). El plásmido pYEhPDI2-DD con los extremos *EcoRI*-romo y *XbaI*-cohesivo fue utilizado para sub-clonar los productos de *PCR EhPDI2-DDF*.

4.5.3. Clonación del plásmidos recombinantes

Ligaciones. Los fragmentos de digestión purificados y portadores de extremos compatibles fueron ligados durante la noche a 15 °C, usando la T4 ADN ligasa y las condiciones de reacción recomendadas por el proveedor.

Transformación bacteriana. Los productos de las ligaciones fueron transfectados mediante choque térmico en células de *E. coli* XL1-Blue MRF' competentes (protocolo general 4.3.6).

Selección y análisis de clonas positivas. Las transformantes estables fueron resembradas en medio LB líquido, suplementado con ampicilina a 150 µg/mL. A partir de 1.5 mL de cultivo, se purificó el ADN plasmídico (protocolo general 4.3.4). Posteriormente, las clonas positivas (portadoras de las variantes del dominio D de *EhPDI*) fueron identificadas mediante un análisis de restricción con las endonucleasas *EcoRV* y *XbaI* (para las clonas pYEhPDI2-DDR) o *NcoI* y *XbaI* (para las clonas pYEhPDI2-DDF) mediante el polimorfismo de un fragmento de restricción.

4.6. Complementación y análisis funcional de *EhPDI2* y sus variantes

El ensayo de complementación funcional de la mutante Δ PDI1 de levadura con *EhPDI2*, y sus variantes, fue realizado utilizando células haploides de *S. cerevisiae* RSA-416/pCT38 [Mares, 2009; Tachibana *et al.*, 1992].

4.6.1. Preparación de células de levadura electrocompetentes

A partir de un cultivo joven, se aisló una colonia de la cepa RSA-416/pCT38 de *S. cerevisiae* y se inoculó en 50 mL de medio YPD suplementado con 200 µg/mL de G418.

El cultivo se incubó a 30 °C, con agitación vigorosa (300-350 rpm), hasta obtener una alta densidad celular (18-24 h). Posteriormente, las células fueron cosechadas, lavadas y resuspendidas en un volumen final de 0.5 mL de sorbitol 1 M frío, estéril.

4.6.2. Transformación de células de levadura

El plásmido portador de *EhPDI2*, o alguna de sus variantes, fue transfectado en las células electrocompetentes mediante choque eléctrico. En un microtubo, se preparó una mezcla conteniendo 1 µg del plásmido y 200 µL de células competentes, se mantuvo en hielo durante 5 min y se transfirió a una celda de electroporación de 2 mm. Para el choque eléctrico, se utilizaron las siguientes condiciones: 25 µF de capacitancia, 200 ohms de resistencia y un voltaje de 2.5 KV. Después del pulso de electroporación, las

células fueron recuperadas mediante la adición de 1 mL de 1 M sorbitol estéril e incubación a 30 °C (con agitación suave, 100 rpm) durante 15 min. Cabe mencionar que rutinariamente se utilizaron como controles a pYEhPDI, pYScPDI1 y pRS413.

Las transfectantes URA⁺ HIS⁺ fueron seleccionadas en medio SD suplementado con 60 mg/L de leucina y 200 µg/mL de G418. A partir de la suspensión de células recuperadas, 200 µL fueron sembrados (plaqueados) en la superficie del medio selectivo e incubada durante 78-96 h a 30 °C. Las unidades formadoras de colonia capaces de crecer en presencia del antibiótico y en ausencia de uracilo e histidina fueron consideradas como transfectantes estables.

4.6.3. Intercambio de plásmido y rescate del fenotipo letal

Las transfectantes estables fueron sometidas a un ensayo de intercambio de plásmidos (*plasmid shuffling*) con el fin de conocer si la enzima *EhPDI2*, o sus variantes, complementan la función de la enzima *ScPDI1*. Los plásmidos pYScPDI1 y pYEhPDI fueron utilizados como controles positivos, en tanto pRS413 como negativo. A partir de un cultivo líquido, la concentración celular fue cuantificada mediante densidad óptica. 0.1 UDO₆₅₀ fueron sembradas en los medios sintéticos SD +L +G418 (carente de uracilo y FOA) y SD +L +G418 +FOA +U (suplementado con uracilo y FOA). Los cultivos fueron incubados durante 96 - 120 h a 30 °C. Aquellas unidades formadoras de colonias capaces de rescatar el fenotipo letal; es decir, capaces de crecer en presencia de uracilo y FOA, fueron consideradas como clonas positivas (complementantes).

4.6.4. Análisis mediante auxotrofías

Un análisis de auxotrofías, utilizando medios selectivos, fue realizado para confirmar la complementación. 0.1 UDO₆₅₀ fueron sembradas en los medios sintéticos SD +L +G418, suplementado con uracilo (+U -FOA), con FOA (-U +FOA) o en ausencia de ambos (-U -FOA). Los cultivos fueron incubados durante 96-120 h a 30 °C.

4.6.5. Análisis mediante PCR

La presencia episomal de *EhPDI2*, y sus variantes, se realizó mediante una amplificación de *PCR*. A partir de un cultivo joven de las complementantes, se purificó el

ADN plasmídico mediante un protocolo estándar de laboratorio [Amberg *et al.*, 2005]. Brevemente, la pastilla celular (de un cultivo de 1.5 mL) fue resuspendida en 0.2 mL de lisis (2% de Tritón X-100; 1% de SDS; 100 mM de NaCl; 1 mM de EDTA; 10 mM de Tris-HCl, pH8); posteriormente, la suspensión celular fue mezclada con 0.2 mL de una solución de fenol: cloroformo: alcohol-isoamílico (25:24:1) y 0.3 g de perlas de vidrio. La lisis celular fue facilitada mediante agitación tipo vórtex (2-3 min). Después de dos extracciones con 1 volumen de cloroformo, la fase acuosa fue separada mediante centrifugación y conservada.

Los plásmidos portadores de *EhPDI2*, o sus variantes, fueron detectados mediante la amplificación positiva de un fragmento de 1.1 Kb, usando los iniciadores NBEhPDI (5'- gcgaggatcc GAT GTA GTA TCA TTA AAT CC -3') y CXEhPDI (5'- gcgactcgag GAA AAC TTC AAG TACA TTC AA -3'); adicionalmente la ausencia del plásmido pCT38 fue verificada mediante la amplificación negativa de un fragmento de 1.5 Kb, usando los iniciadores ScPDI1F (5'- acactcgatcc CAA CAA GAG GCT GTG GCC -3') y ScPDI1R (5'- acactcctgcag TTA CAA TTC ATC GTG AAT GGC -3') [Mares, 2009].

4.6.6. Análisis mediante curvas de crecimiento

Como fenotipo cuantitativo de la complementación, se determinaron los tiempos de duplicación celular mediante curvas de crecimiento. Brevemente, las complementantes fueron cultivadas en medio líquido SD +L +U +G418 durante la noche (30 °C, 300 rpm). Al día siguiente, se estimó la densidad celular mediante espectrofotometría (DO_{650}). Posteriormente, 3 mL de medio líquido YPD +G418 fueron suplementados con una dilución apropiada del cultivo joven de transformantes hasta lograr $DO_{650} = 0.1$. Los cultivos fueron incubados a 30 °C y 300 rpm. Enseguida, la DO_{650} fue registrada cada hora durante 8 h. Los datos obtenidos fueron capturados en el programa *GraphPad*[®] *Prism*[™] y el tiempo de duplicación celular fue calculado a partir de la tasa de crecimiento celular, utilizando la siguiente ecuación: $t_d = \ln 2 / \mu$; donde μ representa la rapidez específica de crecimiento celular y t_d el tiempo de duplicación.

5. RESULTADOS Y DISCUSIONES

5.1. El dominio D de *EhPDI* predice 5 α -hélices

De manera canónica, las proteínas solubles residentes del retículo endoplásmico poseen en el extremo C-terminal de su secuencia la etiqueta H/KDEL, la cual les permite ser retenidas/recuperadas en dicho compartimento. Las proteínas PDI1 de levadura (NCBI No. P17967) y PDIA1 de humano (NCBI No. P07237) poseen la secuencia HDEL y KDEL, respectivamente; sin embargo, las proteínas PDI de *E. histolytica* (*EhPDI*) y de *D. discoideum* (*DdPDI*) carecen de dicha señal [Ramos *et al.*, 2005]. Interesantemente, un estudio con la *DdPDI* reveló la presencia de un mecanismo alternativo para la retención/recuperación de proteínas en el retículo endoplásmico [Monnat *et al.*, 2000]. El mecanismo considera la participación de los últimos 57 residuos de aminoácidos del dominio C-terminal (dominio D); ya que la fusión de ese extremo a la proteína GFP fue suficiente para retenerla intracelularmente [Monnat *et al.*, 2000]. Una característica

EhPDI	AGRIAELDDLAKGF---ANKENKDEI IKKAE AIEG-----GAYYVK
DdPDI	AGRVEQLDTIATEFIA-AAAEVRKELVKKAO TVVDSLPEELRIEGSYIVK
1G7D	PGCLPAYDALAGQFIEASSREARQAILKQGQDGLSGVKE TDKK WASQY LK
	<---- h5 ----> <----- h6 -----> <-----h7
EhPDI	VMKRI IERGADYVEKEKARINKILENPSMKAKKIDDFTRNLNVLEVF---
DdPDI	VMKTIAEKSIDFVTTEIARITKLVSG-SMSGKKADEF AKKL NILESFKSK
1G7D	IMGKILDQGEDFPASELARISKLIEN-KMSEGKKEELQ RSLN ILTA FRKK
	-----> <----- h8 -----> <----- h9 ----->
EhPDI	-----
DdPDI	-----
1G7D	GAEKEEL

Figura 8. Alineamiento de secuencias de los dominios D de las proteínas *EhPDI* y *DdPDI*, en comparación con la secuencia homóloga la proteína Erp29 de murino.

Las α -hélices correspondientes al modelo 1G7D se muestran en la parte inferior.

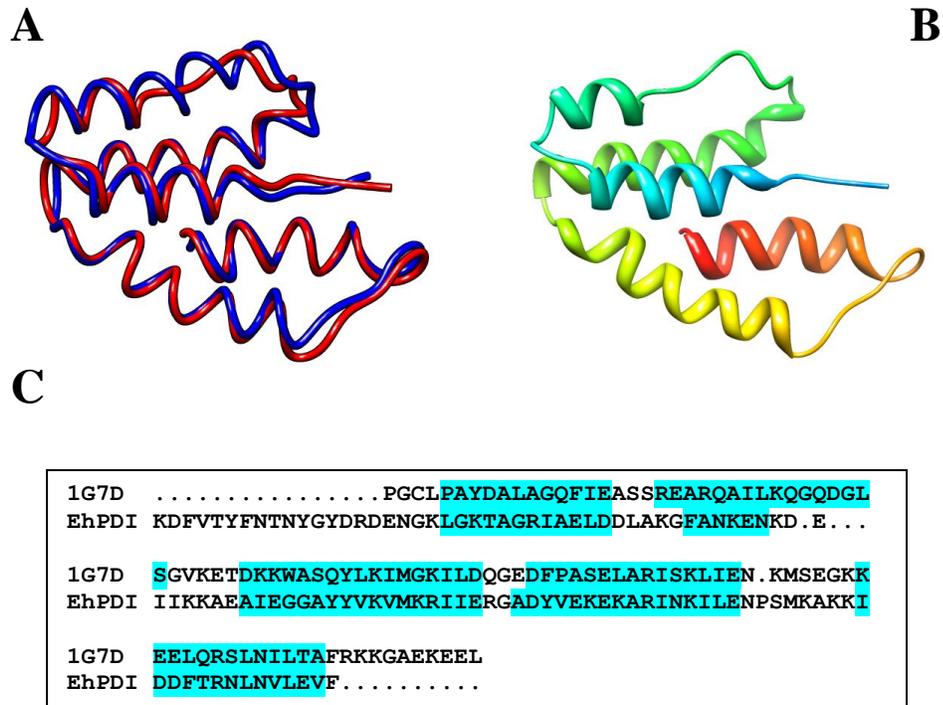


Figura 9. Predicción de la estructura terciaria del dominio D de *EhPDI* basado en homología de secuencias, usando como modelo al dominio D de Erp29 murino.

A. Representación tubular del trayecto seguido por los carbonos alfa de la estructura terciaria de dominio D de *EhPDI* (inferida) en comparación con la estructura cristalográfica del dominio D de *MmErp29 HuFRAP* (modelo, PDB No. 1G7D). La secuencia de murino se muestra en azul, en tanto la ambiana en rojo. Modelos realizados usando el programa *UCSF Chimera + Modeller*.

B. Representación en listones del plegamiento inferido del dominio D de *EhPDI*. La secuencia (amino a carboxilo) se indica en progresión de los colores del espectro visible (azul a rojo).

C. Alineamiento binario de secuencias homólogas (modelo + predicción) del dominio D ambiano y murino. Los residuos comprometidos en α -hélices se muestran sombreados en azul.

estructural del dominio D, es un plegamiento caracterizado por un arreglo de 5 α -hélices.

Sugerentemente, un análisis de predicción estructural de la proteína *EhPDI* reveló que el dominio D está conformado por 5 α -hélices (Figura 8). Como se observa, los dominio D de las proteínas *EhPDI* y *DdPDI* comparten un alto grado de similitud; aun más, el alineamiento estructural, utilizando al modelo tridimensional del dominio D de la proteína Erp29 de murino (PDB No. 1G7D) como molde, es posible inferir (a este nivel) el arreglo de 5 α -hélices del dominio D de *EhPDI*. Además, la predicción de la estructura tridimensional, basada en homología de secuencias, confirma las observaciones previamente establecidas (Figura 9).

Adicionalmente, mediante un análisis comparativo tipo *Blast2* fue posible identificar una extensión de 55 residuos en el C-terminal de *EhPDI*, el cual es estructuralmente similar al detectado en *DdPDI*. Estos enfoques, teórico-estructurales, sustentan la hipótesis que relaciona al extremo C-terminal (dominio D) de *EhPDI* con su posible participación en un mecanismo alternativo de retención/recuperación intracelular de proteínas en *E. histolytica* [Ramos *et al.*, 2005].

5.2. Generación de un plásmido portador de *EhPDI* nativa

Como etapa inicial, se realizó un ensayo de complementación funcional de la mutante Δ PDI1 de levadura usando la proteína *EhPDI* en su forma nativa (es decir, con el extremo C-terminal intacto), ya que los estudios previos se habían realizado etiquetándola con la secuencia señal HDEL (de retención/recuperación de la *ScPDI1*) [Mares, 2009].

El plásmido pYEhPDI fue modificado, mediante ingeniería de plásmidos, con el fin de sustituir el extremo C-terminal. El plásmido pYEhPDI2 fue obtenido satisfactoriamente. Brevemente, el intercambio de dominios C-terminal involucra la incorporación de otro sitio de reconocimiento por la endonucleasa *HindIII*, lo que compromete a la obtención de un patrón de restricción visible de 3 fragmentos (cuando se trata con la mezcla *BamHI/HindIII*) para pYEhPDI2, en lugar de 2 fragmentos (para pYEhPDI). Como se observa en la Figura 10, la clona 1 muestra el patrón de restricción esperado; a diferencia de la clona 2, que conserva el patrón parental.

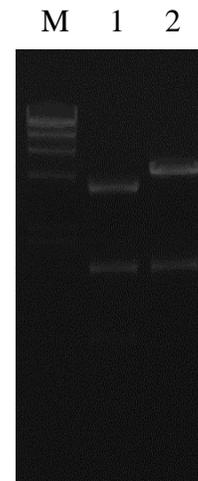


Figura 10. Análisis endonucleotídico preliminar del plásmido pYEhPDI2.

Separación de fragmentos de restricción de la mezcla de endonucleasas *BamHI/HindIII*, de las clonas 1 y 2. La clona 1 presenta el patrón esperado. M, λ -*HindIII*.

Adicionalmente, la clona 1 fue caracterizada mediante un análisis del patrón de restricción usando las endonucleasas *Bam*HI, *Eco*RV, *Hind*III, y *Nco*I (Figura 11).

5.3. *Eh*PDI2 complementa a la mutante Δ PDI1 de levadura

Con el fin de comprobar si la versión silvestre de la proteína PDI amibiana (denominada *Eh*PDI2) es capaz de complementar la mutante Δ PDI1 de levadura, el plásmido pYEhPDI2 fue transfectado en células haploides RSA-416/pCT8. Las transfectantes estables Ura⁺ His⁺ fueron apropiadamente seleccionadas (Figura 12, panel izquierdo). Posteriormente, el plásmido pCT38 fue purgado (segregación) mediante crecimiento en presencia de ácido 5-fluoro-orótico (FOA). El plásmido pCT38 codifica para la orotidina-5'-fosfato

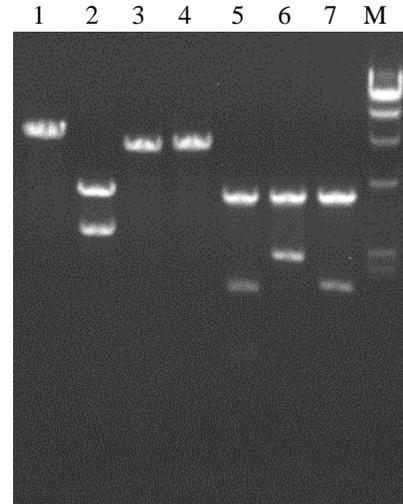


Figura 11. Caracterización molecular del plásmido pYEhPDI2 (clona 1).

Nomenclatura de los carriles: 1, *Eco*RV; 2, *Hind*III; 3, *Bam*HI/*Eco*RV; 4, *Bam*HI/*Nco*I; 5, *Hind*III/*Bam*HI; 6, *Hind*III/*Eco*RV; y 7, *Hind*III/*Nco*I. M, λ -*Hind*III.

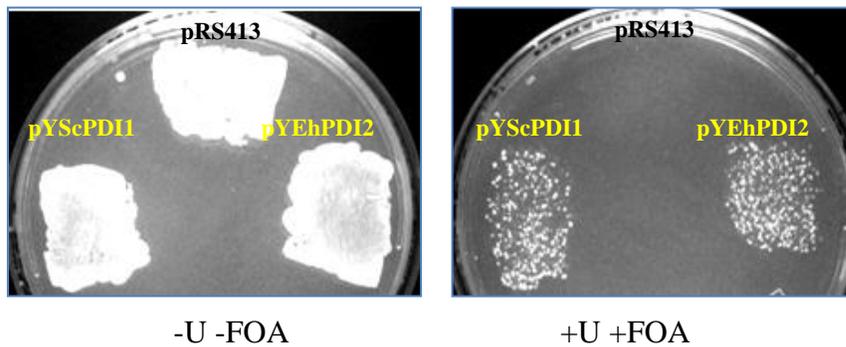


Figura 12. Análisis funcional de *Eh*PDI2 mediante complementación de la mutante Δ PDI1 de *S. cerevisiae*.

Medio base: SD +L +G418.

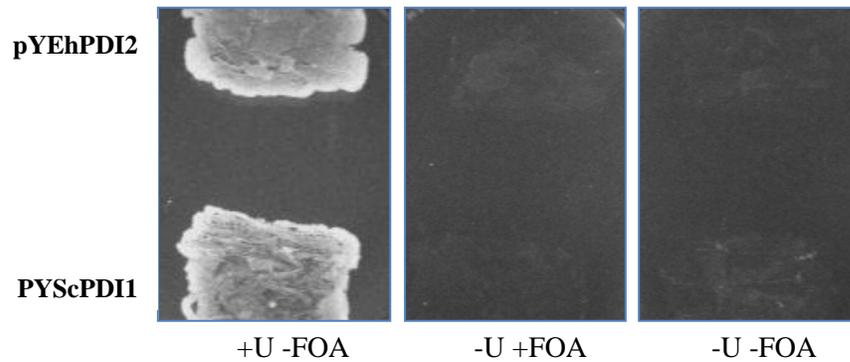


Figura 13. Análisis de auxotrofías de las complementantes *EhPDI2* en la mutante Δ PDI1 de *S. cerevisiae*.

Medio base: SD +L +G418.

descarboxilasa, enzima que convierte a FOA en el compuesto 5-fluoro-uracilo, el cual es tóxico para las células. Como se observa en el panel derecho de la Figura 12, las células portadoras del plásmido pYEhPDI2 fueron capaces de rescatar el fenotipo letal y proliferar en presencia de FOA (cabe mencionar que el medio debe ser suplementado con uracilo para complementar la auxotrofia *ura3*). Con este resultado, es posible establecer que la proteína *EhPDI* silvestre (con su dominio D nativo) es capaz de complementar funcionalmente a la mutante Δ PDI1 de *S. cerevisiae*.

Adicionalmente, las complementantes fueron analizadas mediante un ensayo sencillo de determinación de auxotrofías. Considerando que las células RSA-416/pYEhPDI2 debían presentar un fenotipo $\text{Ura}^- \text{His}^+$, fueron proliferadas en medio selectivos (Figura 13). Como se observa, las células portadoras de pYEhPDI sólo proliferan en presencia de uracilo (ausencia de histidina), como era esperado; además, también se observa su incapacidad de proliferar en presencia de FOA (el cual purgaría a posibles remanentes de pCT38) y en ausencia de uracilo (lo que comprueba su dependencia a esta base nitrogenada); incluso, en ausencia de FOA no se observó proliferación, lo que corrobora la segregación total de pCT38 y la dependencia de uracilo.

Por otro lado, el tiempo de duplicación (t_d) fue determinado como rasgo fenotípico cuantitativo. Mediante curvas de crecimiento celular, se calcularon los t_d de 1.5 y 1.8 h para las complementantes con pYEhPDI2 y pYScPDI1, respectivamente;

resultado muy similar al valor observado para células de levadura de fenotipo silvestre (1.5-2.0 h en medio YPD). Adicionalmente, la presencia episomal del plásmido pYEhPDI2, y ausencia de pCT38, en las complementantes RSA-416/pYEhPDI2 fue verificado mediante PCR, usando iniciadores gen-específicos (Figura 14).

5.4. Generación de plásmidos portadores de variantes del dominio D de *EhPDI*

Posteriormente, se realizaron ensayos de complementación funcional de la mutante Δ PDI1 de levadura usando variantes del dominio D de la proteína *EhPDI*.

El plásmido pYEhPDI2 fue modificado, mediante ingeniería de plásmidos, con el fin de sustituir el dominio D nativo. Brevemente, el intercambio de fragmentos compromete la pérdida de un segmento (codificante para α -helices), evento que puede ser detectado mediante el polimorfismo de un fragmento de restricción, cuando los plásmidos portadores de las variantes son tratados con una mezcla de las endonucleasas

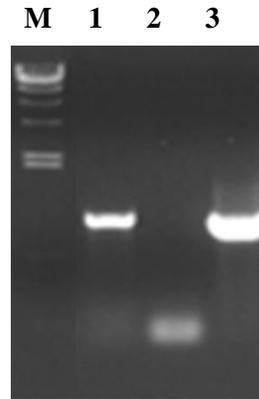


Figura 14. Análisis de la presencia episomal de pYEhPDI2, y ausencia de pCT38, en complementantes.

Separación (en gel de agarosa al 1%) de los productos amplificados. Notación: M, λ -HindIII; 1, PCR EhPDI2; 2, PCR ScPDI1; 3, PCR control positivo.

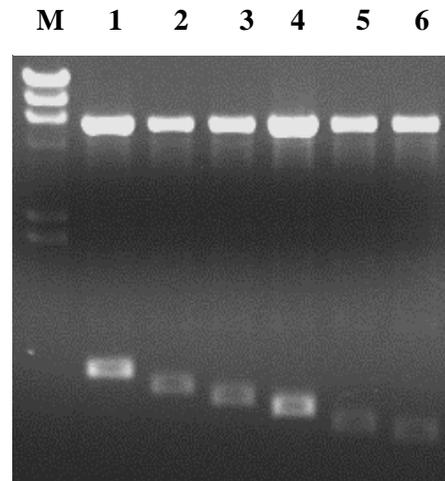


Figura 15. Análisis molecular de los plásmidos pYEhPDI2/DDR.

Nomenclatura de los carriles: M, λ /HindIII; 1, pYEhPDI2; 2, pYEhPDI2/DD9R; 3, pYEhPDI2/DD89R; 4, pYEhPDI2/DD789R; 5, pYEhPDI2/DD6789R; 6, pYEhPDI2/DDR.

EcoRV/XbaI (para los plásmidos DDR) y *NcoI/XbaI* (para los plásmidos DDF).

Como se observa en la Figura 15, todos los plásmidos DDR presentan un fragmento común de (5599 pb); sin embargo, se observa un patrón en escalera (esperado) para el fragmento polimórfico (*carriles: 1, 598 pb; 2, 522 pb; 3, 471 pb; 4, 426 pb; 5, 360 pb; 6, 321 pb*). Por otro lado, la Figura 16 muestra que todos los plásmidos DDF presentan dos fragmentos comunes (5502 y 348 pb); sin embargo, se observa el patrón en escalera (esperado) para el fragmento polimórfico (*carriles: 1, 737 pb; 2, 677 pb; 3, 638 pb; 4, 596 pb; 5, 536 pb; 6, 466 pb*).

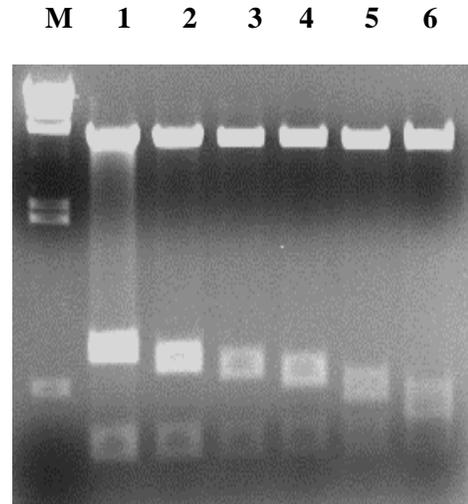


Figura 16. Análisis molecular de los plásmidos pYEhPDI2/DDF.

Nomenclatura de los carriles: M, λ /HindIII; 1, pYEhPDI2; 2, pYEhPDI2/DD5F; 3, pYEhPDI2/DD56F; 4, pYEhPDI2/DD567F; 5, pYEhPDI2/DD5678F; 6, pYEhPDI2/DDR.

5.5. El dominio D de *EhPDI*, aparentemente, no participa en el mecanismo de retención intracelular de proteínas en levadura

Con el fin de identificar la participación individual de las α -hélices del dominio D de la PDI amibiana en el mecanismo de retención intracelular de proteínas en levadura, mediante complementación funcional y rescate del fenotipo letal de la mutante Δ PDI1, los plásmidos portadores de las variantes de EhPDI fueron transfectados en células haploides RSA-416/pCT8. Las transfectantes estables Ura⁺ His⁺ fueron apropiadamente seleccionadas (Figura 17, panel izquierdo). Posteriormente, el plásmido pCT38 fue purgado (segregación) mediante crecimiento en presencia de ácido 5-fluoro-orótico (FOA).

Como se observa en el panel derecho de la Figura 17, las células portadoras de las variantes del plásmido pYEhPDI2 fueron capaces de proliferar en presencia de FOA (cabe mencionar que el medio debe ser suplementado con uracilo para complementar la

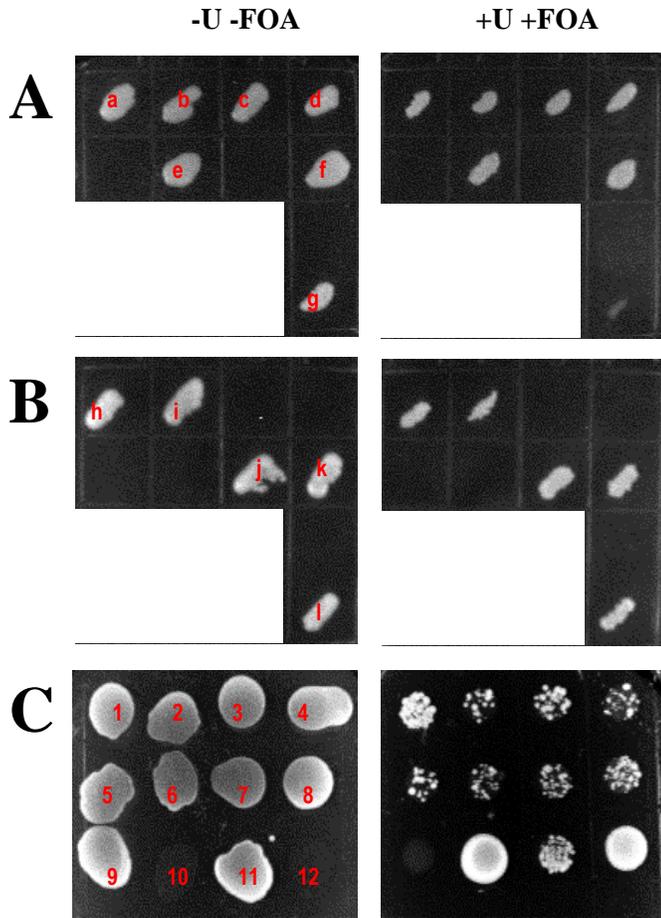


Figura 17. Análisis funcional de las variantes del dominio D de *EhpDI* mediante complementación de la mutante Δ PDI1 de *S. cerevisiae*.

Paneles: izquierda, proliferación celular en medio base (SD +L +G418); derecha, proliferación celular en medio base suplementado con uracilo y FOA.

A. Variantes DDR de pYEhPDI2: DDR (a,b,c,d); DD9R (e); DD6789R (f); control, pYEhPDI2 (g).

B. Variantes DDR de pYEhPDI2: DD89R (h,i); DD789R (j,k); control, pYEhPDI2 (l).

C. Variantes DDF de pYEhPDI: DD5F (1,2); DD56F (3,4); DD567F (5,6); DD5678F (7,8); controles, pRS413 (9); pYScPDI1 (10); pYEhPDI2 (11); pYEhPDI (12).

auxotrofía *ura3*). Interesantemente, este resultado apunta a la noción de que ninguna de las α -hélices es importante para el mecanismo de retención de *EhpDI*; inclusive, en ausencia del dominio D es posible la complementación funcional de la mutante Δ PDI1 de *S. cerevisiae*, sugiriendo que *EhpDI* es retenida intracelularmente por otro mecanismo (discutido más adelante).

Adicionalmente, las complementantes fueron analizadas mediante un ensayo sencillo de determinación de auxotrofías, el cual mostró que mantenían la correlación genotipo-fenotipo esperado. Por otro lado, el tiempo de duplicación (t_d), determinado como rasgo fenotípico cuantitativo, permaneció similar a la silvestre. Paralelamente, la presencia episomal de las variantes de pYEhPDI2 fue verificada mediante *PCR*, usando iniciadores gen-específicos (resultados no mostrados).

5.6. En levadura, *EhPDI* es retenida intracelularmente por un mecanismo independiente de la secuencia HDEL y del dominio D

El papel del retículo endoplásmico es crucial en la biosíntesis de proteínas, ya que muchas proteínas lumbales y membranales son procesadas en este compartimiento. Modificaciones bioquímicas, incluyendo plegamiento, formación y rearreglo de enlaces disulfuro, glicosilación y oligomerización, son asistidas por proteínas residentes del retículo endoplásmico (tales como Bip, PDI, calnexina y calreticulina, entre otras) [Alberts *et al.*, 2008].

A pesar de la alta concentración de proteínas en el retículo endoplásmico, las proteínas lumbales residentes no son secretadas y son detectadas a baja concentración en otros compartimientos de la vía de secreción (*p.e.* aparato de Golgi). Esta localización selectiva es principalmente atribuida a la participación de dos componentes moleculares: una señal de retención en proteínas residentes (H/KDEL) del retículo endoplásmico y un receptor de membrana (ERD2) en el aparato de Golgi, que asegura la recuperación de aquellas que se fugan hacia ese compartimiento [Janson *et al.*, 1998].

Por otro lado, existe poco conocimiento de mecanismos que aseguran la retención de proteínas solubles del retículo endoplásmico que carecen de la secuencia canónica de retención/recuperación. Interesantemente, en un estudio con la proteína PDI de *D. discoideum* (*DdPDI*), carente de KDEL [Monnat *et al.*, 1997], se reportó la existencia de un mecanismo alterno que involucra la participación del dominio C-terminal (dominio D) [Monnat *et al.*, 2000]. Además, los resultados sugieren la co-existencia de ambos mecanismos (canónico y alterno) en *S. cerevisiae* y *D. discoideum*.

Con respecto a *E. histolytica*, evidencias moleculares y celulares han demostrado la existencia del mecanismo canónico. Por un lado, un receptor homólogo a ERD2 ya fue identificado [Sánchez-López *et al.*, 1998] y, por otro, proteínas, como BIP, presentan la secuencia KDEL [Ghosh *et al.*, 1999]. Aun más, la localización intracelular de proteínas etiquetadas con KDEL, como la quitinasa amibiana y la proteína reportera GFP, sugiere que este mecanismo es funcionalmente activo en el estadio de trofozoíto [Ghosh *et al.*, 1999; Teixeira *et al.*, 2008].

Curiosamente, los datos experimentales señalan que la proteína PDI de *E. histolytica* (*EhPDI*), carente de la secuencia canónica y con un dominio D similar al homólogo de *D. discoideum* [Ramos *et al.*, 2005], es retenida en un compartimento intracelular (aparentemente el retículo endoplásmico) [Manning-Cela *et al.*, 2003; Salgado *et al.*, 2005; González *et al.*, 2011]. Estas evidencias sugieren la existencia de un mecanismo alternativo en *E. histolytica*, probablemente similar al determinado en *D. discoideum* y *S. cerevisiae*.

Desafortunadamente, los datos obtenidos en el presente proyecto no son completamente concluyentes. Aparentemente, la proteína *EhPDI*, y sus variantes, son retenidas intracelularmente, en la mutante Δ PDI1 de levadura, el tiempo suficiente para complementar la función y rescatar el fenotipo letal. Una posible explicación que pudiera apoyar los resultados observados es la formación de hetero-oligómeros (*EhPDI* con proteínas que contengan la secuencia canónica; *p.e.* Bip) [Gillece *et al.*, 1999]. Por otro lado, se ha reportado que la remoción de la secuencia HDEL de la proteína Bip de levadura favorece su fuga del retículo endoplásmico, pero a una velocidad más lenta (comparada con las proteínas secretorias naturales), lo cual es compensado mediante una sobre-expresión [Hardwick *et al.*, 1990]; aun más, la remoción de la secuencia HDEL de la proteína PDI1 de levadura favorece su secreción, pero a una velocidad que permite la complementación y rescate del fenotipo letal [Günther *et al.*, 1993; LaMantia y Lennarz, 1993].

6. CONCLUSIONES

Mediante protocolos estándar de biología molecular, se construyó el plásmido de expresión en levadura pYEhPDI2, el cual contiene la secuencia codificante para la proteína *EhPDI* con el dominio D nativo. El plásmido pYEhPDI2 fue exitosamente transfectado y mantenido, de manera episomal, en células mutantes Δ PDI1 de *S. cerevisiae* (haploides RSA-416/pCT8). El ensayo de intercambio de plásmidos demostró que la proteína *EhPDI* (con el dominio D nativo) es capaz de complementar funcionalmente la mutante Δ PDI1 de levadura y rescatar el fenotipo letal; además, se observó un restablecimiento de la velocidad de crecimiento celular a valores similares a los observados con la proteína homóloga (*ScPDI1*).

Mediante protocolos de mutagénesis dirigida, se construyó un grupo de plásmidos, derivados de pYEhPDI2, portadores de variantes del dominio D de *EhPDI*; específicamente, carentes de secuencias codificantes para α -hélices (deleciones secuenciales inversa- y progresivamente). Los plásmidos variantes de pYEhPDI2 fueron exitosamente transfectados y mantenidos, de manera episomal, en células mutantes Δ PDI1 de *S. cerevisiae* (haploides RSA-416/pCT8). Los ensayos de intercambio de plásmidos demostraron que las variantes de la proteína *EhPDI*, portadoras de diferentes mutaciones del dominio D, son capaces de complementar funcionalmente la mutante Δ PDI1 de levadura y rescatar el fenotipo letal; además, se observó que mantienen la velocidad de crecimiento celular en valores similares a los observados con la proteína homóloga (*ScPDI1*).

A pesar de que los resultados obtenidos no son completamente concluyentes, con respecto a la participación del dominio D de *EhPDI* en un mecanismo de retención intracelular de proteínas, éstos sugieren que *E. histolytica* pudiera poseer un mecanismo similar al observado en *D. discoideum* y *S. cerevisiae*.

Finalmente, la observación de que *EhPDI* carente del dominio D permanece intracelularmente y rescata el fenotipo letal de la mutante Δ PDI de levadura es intrigante. Diferentes ensayos podrían apoyar o rechazar algunas hipótesis que se han planteado; *p.e.*

formación e identificación de hetero-oligómeros, inducción de la expresión y mantenimiento de una concentración fija de la proteína, o la existencia de un mecanismo de secreción lenta de la proteína, que le proporcione el tiempo suficiente realizar las funciones vitales; sin descartar la posible participación de otro dominio (*p.e.* tiorredoxina) en alguno de estos mecanismos.

7. REFERENCIAS

- Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. Molecular Biology of The Cell. Fifth edition. Garland Science. 2008: 769-71.
- Amberg DC, Burke DJ, Strathern JN. Methods in Yeast Genetics: A Cold Spring Harbor Laboratory Course Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press. 2005.
- Bansal D, Ave P, Kerneis S, Frileux P, Boché O, Baglin AC, Dubost G, Leguern AS, Prevost MC, Bracha R, Mirelman D, Guillén N, Labruyère E. An ex-vivo human intestinal model to study *Entamoeba histolytica* pathogenesis. PLoS Negl Trop Dis. 2009; 3(11): e551.
- CDC, Centro de Control de Enfermedades de los Estados Unidos de Norteamérica, <http://www.cdc.gov/parasites/amebiasis/biology.html>. 2010
- Espinosa-Cantellano M, Martínez-Palomo A. Pathogenesis of intestinal amebiasis: from molecules to disease. Clin Microbiol Rev. 2000; 13(2): 318-31.
- Ghosh SK, Field J, Frisardi M, Rosenthal B, Mai Z, Rogers R, Samuelson J. Chitinase secretion by encysting *Entamoeba invadens* and transfected *Entamoeba histolytica* trophozoites: localization of secretory vesicles, endoplasmic reticulum, and Golgi apparatus Infect Immun. 1999; 67(6): 3073-81.
- Gilchrist CA, Petri WA Jr. Using differential gene expression to study *Entamoeba histolytica* pathogenesis. Trends Parasitol. 2009; 25(3): 124-31.
- Gillece P, Luz JM, Lennarz WJ, de La Cruz FJ, Römisch K. Export of a cysteine-free misfolded secretory protein from the endoplasmic reticulum for degradation requires interaction with protein disulfide isomerase. J Cell Biol. 1999; 147(7): 1443-56.
- González E, de Leon Mdel C, Meza I, Ocadiz-Delgado R, Gariglio P, Silva-Olivares A, Galindo-Gómez S, Shibayama M, Morán P, Valadez A, Limón A, Rojas L, Hernández EG, Cerritos R, Ximenez C. *Entamoeba histolytica* calreticulin: an endoplasmic reticulum protein expressed by trophozoites into experimentally induced amoebic liver abscesses. Parasitol Res. 2011; 108(2): 439-49.
- Gruber CW, Cemazar M, Heras B, Martin JL, Craik DJ. Protein disulfide isomerase: the structure of oxidative folding. Trends Biochem Sci. 2006; 31(8): 455-64.
- Günther R, Srinivasan M, Haugejorden S, Green M, Ehbrecht IM, Küntzel H. Functional replacement of the *Saccharomyces cerevisiae* Trg1/Pdi1 protein by members of the mammalian protein disulfide isomerase family. J Biol Chem. 1993; 268(11): 7728-32.

- Hardwick KG, Lewis MJ, Semenza J, Dean N, Pelham HR. ERD1, a yeast gene required for the retention of luminal endoplasmic reticulum proteins, affects glycoprotein processing in the Golgi apparatus. *EMBO J.* 1990; 9(3): 623-30.
- Janson IM, Toomik R, O'Farrell F, Ek P. KDEL motif interacts with a specific sequence in mammalian erd2 receptor. *Biochem Biophys Res Commun.* 1998; 247(2): 447-51.
- Karathia H, Vilaprinyo E, Sorribas A, Alves R. *Saccharomyces cerevisiae* as a model organism: a comparative study. *PLoS One.* 2011; 6(2): e16015.
- LaMantia ML, Lennarz WJ. The essential function of yeast protein disulfide isomerase does not reside in its isomerase activity. *Cell.* 1993; 74(5): 899-908.
- LaMantia ML, Lennarz WJ. The essential function of yeast protein disulfide isomerase does not reside in its isomerase activity. *Cell.* 1993; 74(5): 899-908.
- Lee SO, Cho K, Cho S, Kim I, Oh C, Ahn K. Protein disulphide isomerase is required for signal peptide peptidase-mediated protein degradation. *EMBO J.* 2010; 29(2): 363-75.
- Leippe M, Bruhn H, Hecht O, Grötzinger J. Ancient weapons: the three-dimensional structure of amoebapore A. *Trends Parasitol.* 2005; 21(1):5-7.
- Lorenzi HA, Puiu D, Miller JR, Brinkac LM, Amedeo P, Hall N, Caler EV. New assembly, reannotation and analysis of the *Entamoeba histolytica* genome reveal new genomic features and protein content information. *PLoS Negl Trop Dis.* 2010; 4(6): e716.
- Manning-Cela R, Marquez C, Franco E, Talamas-Rohana P, Meza I. BFA-sensitive and insensitive exocytic pathways in *Entamoeba histolytica* trophozoites: their relationship to pathogenesis. *Cell Microbiol.* 2003; 5(12): 921-32.
- Mares RE, La enzima PDI de *Entamoeba histolytica* (EhPDI) es capaz de complementar la mutante de *Saccharomyces cerevisiae* Δ PDI1 y rescatar el fenotipo letal. Tesis Doctoral. 2009.
- Mares RE, Magaña PD, Meléndez-López SG, Licea AF, Cornejo-Bravo JM, Ramos MA. Oxidative folding and reductive activities of EhPDI, a protein disulfide isomerase from *Entamoeba histolytica*. *Parasitol Int.* 2009; 58(3): 311-3.
- Mattanovich D, Branduardi P, Dato L, Gasser B, Sauer M, Porro D. Recombinant protein production in yeasts. *Methods Mol Biol.* 2012; 824: 329-58.
- Meléndez-López SG, Herdman S, Hirata K, Choi MH, Choe Y, Craik C, Caffrey CR, Hansell E, Chávez-Munguía B, Chen YT, Roush WR, McKerrow J, Eckmann L, Guo J, Stanley SL Jr, Reed SL. Use of recombinant *Entamoeba histolytica* cysteine proteinase 1 to identify a potent inhibitor of amebic invasion in a human colonic model. *Eukaryot Cell.* 2007; 6(7): 1130-6.

- Monnat J, Hacker U, Geissler H, Rauchenberger R, Neuhaus EM, Maniak M, Soldati T. *Dictyostelium discoideum* protein disulfide isomerase, an endoplasmic reticulum resident enzyme lacking a KDEL-type retrieval signal. *FEBS Lett.* 1997; 418(3): 357-62.
- Monnat J, Neuhaus EM, Pop MS, Ferrari DM, Kramer B, Soldati T. Identification of a novel saturable endoplasmic reticulum localization mechanism mediated by the C-terminus of a *Dictyostelium* protein disulfide isomerase. *Mol Biol Cell.* 2000; 11(10): 3469-84.
- Mortimer L, Chadee K. The immunopathogenesis of *Entamoeba histolytica*. *Exp Parasitol.* 2010; 126(3): 366-80.
- Padilla-Vaca F, Ankri S, Bracha R, Koole LA, Mirelman D. Down regulation of *Entamoeba histolytica* virulence by monoxenic cultivation with *Escherichia coli* O55 is related to a decrease in expression of the light (35-kilodalton) subunit of the Gal/GalNAc lectin. *Infect Immun.* 1999; 67(5): 2096-102.
- Paul J, Srivastava S, Bhattacharya S. Molecular methods for diagnosis of *Entamoeba histolytica* in a clinical setting: an overview. *Exp Parasitol.* 2007; 116(1): 35-43.
- Que X, Kim SH, Sajid M, Eckmann L, Dinarello CA, McKerrow JH, Reed SL. A surface amebic cysteine proteinase inactivates interleukin-18. *Infect Immun.* 2003; 71(3): 1274-80.
- Ramos MA, Mares RE, Magaña PD, Ortega JE, Cornejo-Bravo JM. In silico identification of the protein disulfide isomerase family from a protozoan parasite. *Comput Biol Chem.* 2008; 32(1): 66-70.
- Ramos MA, Mares RE, Magaña PD, Rivas ID, Meléndez-López SG. *Entamoeba histolytica*: biochemical characterization of a protein disulfide isomerase. *Exp Parasitol.* 2011; 128(1): 76-81.
- Ramos MA, Mercado GC, Salgado LM, Sanchez-Lopez R, Stock RP, Lizardi PM, Alagón A. *Entamoeba histolytica* contains a gene encoding a homologue to the 54 kDa subunit of the signal recognition particle. *Mol Biochem Parasitol.* 1997; 88(1-2): 225-35.
- Ramos MA, Sanchez-Lopez R, Mares RE, Olvera F, Alagón A. Identification of an *Entamoeba histolytica* gene encoding a protein disulfide isomerase that functionally complements the dsbA mutation in *Escherichia coli*. *Mol Biochem Parasitol.* 2005; 143(2): 236-40.
- Salgado M, Villagómez-Castro JC, Rocha-Rodríguez R, Sabanero-López M, Ramos MA, Alagón A, López Romero E, Sánchez-López R. *Entamoeba histolytica*: Biochemical and molecular insights into the activities within microsomal fractions. *Exp Parasitol.* 2005; 110(4): 363-73.

- Salles JM, Salles MJ, Moraes LA, Silva MC. Invasive amebiasis: an update on diagnosis and management. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2007; 5(5): 893-901.
- Sambrook J, Fritsch E, Maniatis T. *Molecular cloning: A laboratory manual.* Cold Spring Harbor Laboratory Press. 3rd edition. 2001.
- Sánchez R, Saralegui A, Olivos-García A, Scapolla C, Damonte G, Sanchez-Lopez R, Alagón A, Stock RP. *Entamoeba histolytica*: intracellular distribution of the sec61alpha subunit of the secretory pathway and down-regulation by antisense peptide nucleic acids. *Exp Parasitol.* 2005; 109(4): 241-51.
- Sanchez-Lopez R, Gama-Castro S, Ramos MA, Merino E, Lizardi PM, Alagón A. Cloning and expression of the *Entamoeba histolytica* ERD2 gene. *Mol Biochem Parasitol.* 1998; 92(2): 355-9.
- Sánchez-López R, Gutiérrez A, Juárez P, Olvera A, Olvera F, Ramos MA, Sánchez R, Saralegui A, Stock RP, Alagón A. Molecular genetics of the secretory pathway in *Entamoeba histolytica*: an overview. *Arch Med Res.* 2000; 31(4 Suppl): S151-2.
- Santi-Rocca J, Rigotherier MC, Guillén N. Host-microbe interactions and defense mechanisms in the development of amoebic liver abscesses. *Clin Microbiol Rev.* 2009; 22(1): 65-75.
- Sen A, Chatterjee NS, Akbar MA, Nandi N, Das P. The 29-kilodalton thiol-dependent peroxidase of *Entamoeba histolytica* is a factor involved in pathogenesis and survival of the parasite during oxidative stress. *Eukaryot Cell.* 2007; 6(4): 664-73.
- Sherman F. An introduction to the genetics and molecular biology of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Encyc Molec Biol Molec Med.* 1998; 6: 302-25.
- Stanley SL. Pathophysiology of amoebiasis. *Trends Parasitol.* 2001; 17(6):280-5.
- Tachibana C, Stevens TH. The yeast EUG1 gene encodes an endoplasmic reticulum protein that is functionally related to protein disulfide isomerase. *Mol Cell Biol.* 1992; 12(10): 4601-11.
- Teixeira JE, Huston CD. Evidence of a continuous endoplasmic reticulum in the protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. *Eukaryot Cell.* 2008; 7(7):1222-6.
- Townsley FM, Frigerio G, Pelham HR. Retrieval of HDEL proteins is required for growth of yeast cells. *J Cell Biol.* 1994; 127(1): 21-8.
- Ximénez C, Morán P, Rojas L, Valadez A, Gómez A. Reassessment of the epidemiology of amebiasis: state of the art. *Infect Genet Evol.* 2009; 9(6):1023-32.