

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA

Facultad de Ciencias Químicas e Ingeniería



**Expresión de *EhCP1* en el periplasma bacteriano y efecto
del ambiente redox sobre su estructura y función**

T E S I S

que para obtener el título de

QUÍMICO FARMACOBIOLOGO

P R E S E N T A

Ekaterina Jalomo Khayrova

Tijuana, B.C.

Abril de 2017.

Universidad Autónoma de Baja California

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS E INGENIERÍA

"2017 Año del 60 Aniversario de la Universidad Autónoma de Baja California"

FOLIO No. 010


Tijuana, B. C., a 28 de marzo, 2017.

C. Ekaterina Jalomo Khayrova
Pasante de Químico Farmacobiólogo
Presente

El tema de trabajo y/o tesis para su examen profesional, en la
Opción Tesis

Es propuesto, por el Dr. Marco Antonio Ramos Ibarra y la Dra. Rosa Elena Mares Alejandro, quienes serán los responsables de la calidad de trabajo que usted presente, referido al tema "Expresión de *EhCP1* en el periplasma bacteriano y efecto del ambiente redox sobre su estructura y función" el cual deberá usted desarrollar, de acuerdo con el siguiente orden:

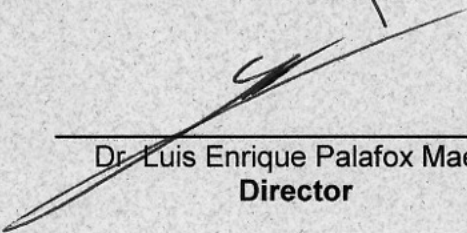
- I.- INTRODUCCIÓN
- II.- HIPÓTESIS Y OBJETIVO
- III.- MATERIALES Y MÉTODO
- IV.- RESULTADOS Y DISCUSIONES
- V.- CONCLUSIONES
- VI.- BIBLIOGRAFÍA



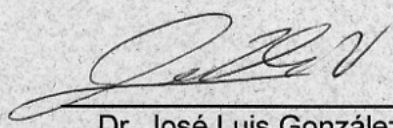
Dr. Marco Antonio Ramos Ibarra
Presidente

Rosa E. Mares A.

Dra. Rosa Elena Mares Alejandro
Secretaria



Dr. Luis Enrique Palafox Maestre
Director



Dr. José Luis González Vázquez
Subdirector

Jalomo Khayrova, Ekaterina

**Expresión de *EhCP1* en el periplasma bacteriano y
efecto del ambiente redox sobre su estructura y función**

Tesis de licenciatura

Todos los derechos sobre los datos y resultados, derivados de la investigación realizada, contenidos en este documento son propiedad de los autores y de las instituciones donde se realizó el estudio. Por tal motivo, se prohíbe la reproducción, distribución, publicación, traducción, y cualquier otro uso o adaptación (total o parcial) de la información, por cualquier medio o forma de difusión.

La prohibición anterior no tendrá validez, de forma exclusiva y limitada, cuando el uso o adaptación de la información cumpla los siguientes requisitos:

1. el material o medio de difusión sea utilizado sólo para fines académicos, no lucrativos ni comerciales;
2. incluir la siguiente cita: “Jalomo Khayrova, Ekaterina. Expresión de *EhCP1* en el periplasma bacteriano y efecto del ambiente redox sobre su estructura y función. Tesis de licenciatura. Programa Educativo de Químico Farmacobiólogo, Facultad de Ciencias Químicas e Ingeniería, Universidad Autónoma de Baja California. Abril de 2017.”
3. enviar un correo electrónico a mramos@uabc.edu.mx, solicitando anuencia y dando aviso de qué datos se van a utilizar y cuál es el propósito de su uso.

Lo anterior no otorga derecho o licencia alguna, respecto a la información utilizada.

Para cualquier otro asunto relacionado, contactar a mramos@uabc.edu.mx.

D.R. © Jalomo Khayrova, Ekaterina. Tesista.

D.R. © Ramos Ibarra, Marco Antonio. Director de tesis.

D.R. © Facultad de Ciencias Químicas e Ingeniería. Unidad Académica de la UABC.

D.R. © Universidad Autónoma de Baja California. Institución de Educación Superior.

©2017.

Tesis: Expresión de *EhCP1* en el periplasma bacteriano y efecto del ambiente redox sobre su estructura y función.

Grado: Licenciatura, Programa Educativo de Químico Farmacobiólogo.

Institución: Universidad Autónoma de Baja California.

Sustentante: Ekaterina Jalomo Khayrova.

Fecha: Abril de 2017.

El presente proyecto de investigación fue realizado en el **Laboratorio de Biotecnología** de la **Facultad de Ciencias Químicas e Ingeniería de la UABC**, bajo la co-dirección de los profesores **Dr. Marco Antonio Ramos Ibarra** y **Dr. Rosa Elena Mares Alejandre**, con financiamiento del **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT)**: Fondo Sectorial SEP-CONACYT para **Investigación en Ciencia Básica** (apoyo 155714) y Fondo Sectorial SSA/IMSS/ISSSTE para **Investigación en Salud** (apoyo 161544), otorgados al Dr. Ramos Ibarra.

Los resultados correspondientes fueron presentados en tres eventos académicos: (i) **4to. Encuentro Estatal de Jóvenes Investigadores en Baja California**, 29 y 30 de septiembre de 2016 (Tijuana, BCN); (ii) **3er. Congreso Interinstitucional de Jóvenes Investigadores**, 27 y 28 de octubre de 2016 (Guanajuato, GTO); (iii) **XXXI Congreso Nacional de Bioquímica**, 06-11 de noviembre de 2016 (Aguascalientes, AGS). La participación en los tres eventos académicos fue apoyada por la Dirección de la Facultad de Ciencias Químicas e Ingeniería de la UABC.

Tesis: Expresión de *EhCP1* en el periplasma bacteriano y efecto del ambiente redox sobre su estructura y función.

Grado: Licenciatura, Programa Educativo de Químico Farmacobiólogo.

Institución: Universidad Autónoma de Baja California.

Sustentante: Ekaterina Jalomo Khayrova.

Fecha: Abril de 2017.

El presente **Manuscrito de Tesis** fue **Revisado y Aprobado** por un **Comité Académico**, conformado por los profesores:

Marco Antonio Ramos Ibarra, Dr. (Presidente)

Rosa Elena Mares Alejandre, Dra. (Secretaria)

Patricia Lilián Alejandra Muñoz Muñoz, M.C. (Sinodal)

Samuel Guillermo Meléndez López, Dr. (Suplente)

Alexis Zarahy Minchaca Acosta, QFB (Suplente)

Dedicatoria

A Dios, a la vida, a mi familia y amigos.

Apunta a la luna. Incluso si fallas aterrizaras entre las estrellas.

Agradecimientos

Después de un periodo de tanto aprendizaje, experiencias, estrés, alegrías, llantos, emociones y triunfos, quiero agradecer a todas esas personas que estuvieron apoyándome, directa e indirectamente.

Primero a **Dios**, por permitirme llegar hasta esta etapa de mi vida, sosteniéndome y ayudándome a levantarme cada que caía o que sentía que ya no podía más, por darme las herramientas para siempre seguir adelante.

A mi *familia*, a **mi mami**, porque fue la etapa más difícil entre nosotras, muchísimas gracias por estar para mí en todo momento, por madrugar conmigo para mandarme lonche, por apoyarme en todas mis locuras y ayudarme a conseguir financiamiento ;) Te quiero muchísimo. A **mi Papapula** porque a pesar de que tengamos opiniones muy diferentes me apoyas siempre, aunque estés muy lejos siento que te hago sentir orgulloso y eso se siente muy bonito y nunca se me olvida una cosa, y que a ti tampoco se te olvide, y mucho, mucho, mucho. ¡A **Martin**, gracias por también ayudarme a sonsacar a mis papas! ¡Te quiero mucho!

Al **Doctor Marco** por todos los consejos, por todo el apoyo y sobretodo toda la confianza que ha depositado en mí. Por brindar tan grandiosas oportunidades y por hacerme sentir miembro de una gran familia. Por compartir un poco de todo lo que sabe con nosotros y por fomentar desde el comienzo un perfil de investigador. Por compartir su vocación, disciplina y dedicación. A la **Doctora Rosy** por todo el apoyo, por las recomendaciones y las oportunidades de explorar en varios aspectos de esta área.

A mi hermano de otra madre: **Jorge**. Te has ganado un párrafo único. Porque desde inicios de la carrera siempre he sentido tu apoyo, por apostar en mí y siempre echarme porras. Por aprender a conocerme y darte cuenta de todo y actuar de la mejor forma. Eres grande. Algún día quiero saber tanto como tú y cuestionarme tanto como tú. MIL GRACIAS, no tengo otras palabras para describirlo.

A **los 4 fantásticos**, por hacer un súper equipo. **Vale**, por todas las recomendaciones, por escuchar y apoyarme, por dejarme ser parte de tu vida y por compartir la canción del festejo. ¡**Pichón!** Por acompañarme en mis días eternos, por ser demasiado honesto y por ser una gran persona y un súper amigo. **Jorge** ya te mencioné (: Los quiero mucho, hicieron mucho más alegre esta etapa, las crisis existenciales eran más graciosas a su lado.

A todos los miembros de *la familia Biotecnología*: **Dr. Sam, Profe Lilian, Alexis, Izamar, Rick, Álvaro, Celina, Verito, Eliseo**, y todos los que han pasado en este periodo, porque esta gran convivencia hace mucho más ameno el trabajo diario. Les agradezco por compartir sus conocimientos y sus experiencias.

A **Sarahy**, por estar al pendiente de mis avances y motivarme a seguir con sus tantos memes, pero no te preocupes te los guardare. A **Alejandro**, por todo el apoyo, sobretodo emocional, en gran parte de esta etapa.

A mi comité: **Dr. Marco, Dra. Rosy, Dr. Sam, M.C. Lilian y QFB. Alexis** por tomarse el tiempo y la dedicación para revisar este documento y por todas las observaciones y recomendaciones.

Y a todos los que en algún momento les toco ser parte de mis momentos efusivos, estresantes y drásticos, por escucharme una y otra vez sobre el mismo tema durante toda esta bella etapa, por apoyarme y distraerme cuando lo consideraban necesario.

Contenido

Dedicatoria.....	5
Agradecimientos	6
Contenido	7
Índice de figuras y tablas	9
Abreviaturas	10
1. INTRODUCCIÓN	11
1.1. Amibiasis y <i>Entamoeba histolytica</i>	11
1.1.1. Amibiasis como problema de salud pública	11
1.1.2. Amibiasis como patología.....	11
1.1.3. <i>Entamoeba histolytica</i>	12
1.2. Proteasas y sus funciones.....	16
1.2.1. Bioquímica y biofísica	16
1.2.2. Proteasas en patologías de humanos.....	17
1.2.3. Proteasas de parásitos protozoarios	18
1.2.4. Proteasas de parásitos protozoarios como dianas terapéuticas	19
1.3. Cisteína proteasas de <i>Entamoeba histolytica</i>	20
1.3.1. Familia de cisteína proteasas	20
1.3.2. Principales factores de virulencia con actividad cisteína proteasa.....	21
1.4. Cisteína proteasa 1 de <i>E. histolytica</i>.....	21
1.4.1. Bioquímica, genética, biofísica y estructura.....	21
1.4.2. <i>EhCP1</i> como factor de virulencia.....	21
1.4.3. <i>EhCP1</i> como diana terapéutica.....	22
1.5. Plegamiento de proteínas.....	22
1.5.1. Maquinaria de plegamiento en eucariotas	22
1.5.2. Plegamiento de proteínas en bacterias	24
1.5.3. Plegamiento oxidativo de proteínas en el periplasma de <i>E. coli</i>	25
1.5.4. Plegamiento de proteínas en <i>E. histolytica</i>	25
1.6. Plegamiento oxidativo de <i>EhCP1</i> en periplasma de <i>E. coli</i>	26
2. HIPÓTESIS Y OBJETIVO	28
2.1. Hipótesis.....	28
2.2. Objetivo general.....	28
2.3. Objetivos específicos	28
3. MATERIALES Y MÉTODOS	29
3.1. Reactivos biológicos y químicos	29
3.1.1. Reactivos químicos y bioquímicos	29
3.1.2. Enzimas y otros reactivos biológicos	29
3.1.3. Estuches comerciales	29
3.2. Células bacterianas y medios de cultivo.....	30
3.3. Plásmidos	30
3.4. Equipo	31
3.5. Protocolos generales.....	32
3.5.1. Preparación de células competentes para choque térmico	32
3.5.2. Transformación y selección bacteriana	32
3.5.3. Expresión de proteínas (mini-ensayo)	32
3.5.4. Extracción de proteínas totales en condiciones nativas	33

3.5.5.	Fraccionamiento subcelular en condiciones nativas	33
3.5.6.	Cuantificación de proteínas (método de Bradford).....	33
3.5.7.	Separación de proteínas mediante SDS-PAGE	34
3.5.8.	Inmuno-detección tipo western blot	34
3.5.9.	Electroforesis en gel de agarosa	34
3.6.	Construcción de pBPelB-<i>EhCP1</i>-Myc.....	35
3.6.1.	Amplificación de la secuencia codificante para <i>EhCP1</i>	35
3.6.2.	Preparación de componentes para ligación: pBPelB-Myc y <i>EhCP1</i>	35
3.6.3.	Ligación y obtención de pBPelB- <i>EhCP1</i> -Myc.....	35
3.7.	Construcción de pBAD-PelB-<i>EhCP1</i>-Myc	36
3.7.1.	Amplificación de la secuencia codificante para PelB- <i>EhCP1</i> -Myc.....	36
3.7.2.	Preparación de componentes para ligación: pBAD33 y PelB- <i>EhCP1</i> -Myc	36
3.8.	Análisis de la actividad proteolítica de <i>EhCP1</i>.....	36
3.8.1.	Ensayo zimográfico.....	36
3.8.2.	Ensayo fluorogénico.....	37
3.8.3.	Ensayo cromogénico	37
3.9.	Tratamiento de datos y análisis estadístico	37
3.10.	Bioservidores y biocómputo	38
4.	RESULTADOS Y DISCUSIONES	39
4.1.	Obtención de pBPelB- <i>EhCP1</i> -Myc.....	39
4.2.	Obtención de pBAD-PelB- <i>EhCP1</i> -Myc.....	41
4.3.	<i>EhCP1</i> se expresa activamente en el periplasma de <i>E. coli</i>	42
4.4.	La actividad de <i>EhCP1</i> depende de un plegamiento oxidativo correcto	44
4.5.	Aparentemente, <i>EhCP1</i> depende de la actividad oxidorreductasa de DsbC	45
5.	CONCLUSIONES	48
6.	BIBLIOGRAFIA	49

Índice de figuras y tablas

Figura 1-1. Estadios de <i>E. histolytica</i> que habitan el colon en humanos.....	13
Figura 1-2. Ciclo de vida de <i>Entamoeba histolytica</i>	13
Figura 3-1. Representación esquemática del plásmido pBPelB- <i>EhHAP</i> -Myc.	30
Figura 3-2. Representación esquemática del plásmido pQ <i>EhCP1</i>	31
Figura 3-3. Representación esquemática del plásmido pBAD33.	31
Figura 4-1. Representación esquemática del plásmido pBPelB- <i>EhCP1</i> -Myc.	39
Figura 4-2. Análisis del producto de PCR <i>EhCP1</i>	40
Figura 4-3. Análisis molecular del plásmido pBPelB- <i>EhCP1</i> -Myc.	40
Figura 4-4. Representación esquemática del plásmido pBAD-BPelB- <i>EhCP1</i> -Myc.....	41
Figura 4-5. Análisis del producto de amplificación (PCR) de la fusión PelB- <i>EhCP1</i> -Myc.	41
Figura 4-6. Análisis del producto de pBAD-BPelB- <i>EhCP1</i> -Myc digerido con XbaI y HindIII.....	42
Figura 4-7. Análisis de expresión de la proteína <i>EhCP1</i> en la cepa <i>E. coli</i> BW25113.....	43
Figura 4-8. Inmuno-reconocimiento de la proteína <i>EhCP1</i> expresada en la cepa <i>E. coli</i> BW25113.....	43
Figura 4-9. Análisis zimográfico de la actividad y localización subcelular de la proteína <i>EhCP1</i> expresada en la cepa <i>E. coli</i> BW25113.	44
Figura 4-10. Nivel de expresión de <i>EhCP1</i> en un ambiente oxidativo asistido por DsbA o DsbC.....	44
Figura 4-11. Dependencia de la expresión funcional de <i>EhCP1</i> a un plegamiento oxidativo asistido por DsbA o DsbC.	45
Tabla 1-1. Enzimas proteolíticas de protozoarios.....	18
Tabla 1-2. Proteasas utilizadas en el diseño de fármacos basados en la estructura.	20
Tabla 3-1. Genotipos, nomenclatura redox y origen de las cepas de <i>E. coli</i> utilizadas en el estudio.	30

Abreviaturas

°C	Grados Celsius (centígrados)
µm; nm	Micrómetros; Nanómetros
A	Absorbancia
AMC	7-metil-4-aminocumarina
ATP	Trifosfato de adenosina
bCIP	Fosfatasa alcalina
BrEt	Bromuro de etidio
BSA	Albúmina de suero bovino
CP	Cisteína proteasa
DMSO	Dimetilsulfóxido
DO	Densidad óptica
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
FD	Factor de dilución
g; µg; ng	Gramos; Microgramos; Nanogramos
GPI	Glicosilfosfatidilinositol
h; min; s	Horas; Minutos; Segundos
Hsp	Proteínas de choque térmico
IPTG	Isopropil-β-D-tiogalactopiranosido
kDa	Kilodalton
L, mL, µL	Litros; Mililitros; Microlitros
LB	Medio de cultivo Luria-Bertani
M, mM, µM, nM	Molar; Milimolar; Micromolar; Nanomolar
pb/bp	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa de ADN
PDI	Proteína disulfuro isomerasa
pH	Potencial de Hidrogeno
RE	Retículo endoplasmático
Rpm	Revoluciones por minuto
SBME	Sin β-Mercaptoetanol
TBS	Solución amortiguadora tris-salina
TBST	Solución amortiguadora tris-salina con Tween-20
TEMED	N,N,N',N'-tetra-metil-etilenediamina
Trx	Tiorredoxina
UFC	Unidades formadoras de colonia
UV	Ultravioleta
V	Volts

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Amibiasis y *Entamoeba histolytica*

1.1.1. Amibiasis como problema de salud pública

La amibiasis se define, según la Organización Mundial de la Salud (OMS), como cualquier infección del intestino grueso por el parásito protozooario *Entamoeba histolytica*, la cual puede llegar a convertirse en invasiva (extra-intestinal) e implica un importante problema de salud pública en regiones y países de África, Asia, y América, donde las condiciones sanitarias son precarias y existe una alta prevalencia de cepas virulentas [WHO, 1997].

Actualmente, la amibiasis se ubica como la tercera causa de mortalidad mundial por infecciones parasitarias, siendo malaria y esquistosomiasis las primeras dos [Serrano-Luna *et al.*, 2013]. Aproximadamente, se reportan 34-50 millones de infecciones anuales; de las cuales, 40-110 mil personas mueren por complicaciones asociadas a la enfermedad [Wilson *et al.*, 2012]. Cuando la infección no es diagnosticada y tratada a tiempo, más del 70% de los pacientes desarrollan ataques fulminantes de colitis, disentería, o apendicitis amibiana, y alrededor del 10% desarrolla abscesos hepáticos amibianos (principal infección extra-intestinal) [Ximenez *et al.*, 2007].

En México, la incidencia de amibiasis muestra variaciones entre las regiones norte, noroeste, y sureste del país; sin embargo, los reportes de las últimas dos décadas, concuerdan en el grupo poblacional con mayor número de casos: en niños menores a 4 años [Rojas *et al.*, 2016]. Hasta el año 2015, se ubicó en la 15ta. (decimoquinta) posición entre las principales causas de morbilidad nacional, teniendo mayor incidencia en los estados de Nayarit, Guerrero, y Yucatán [SUIVE/DGE/SSA, 2015]. Interesantemente, se reportó que 15% de los casos de diarrea y disentería aguda en pacientes pediátricos hospitalizados estaban asociados a la presencia de *E. histolytica* en muestras clínicas.

1.1.2. Amibiasis como patología

Clínicamente, *E. histolytica* puede causar amibiasis intestinal (no invasiva) o extra-intestinal (invasiva). Por lo general, la infección intestinal es asintomática, pero puede desarrollar lesiones tisulares de diferente grado, las cuales pueden ser de tipo agudas o crónicas [Wiser, 2010].

Las formas agudas se clasifican en: (1) rectocolitis amibiana o disentería amibiana, las lesiones se localizan en la región recto-sigmoidea y se caracteriza por síntomas como pujo, tenesmo, y evacuación de heces con sangre, pus, y mucosidad, además, algunos pacientes pueden presentar fiebre y dolor en las fosas iliacas; (2) colitis fulminante, las ulceraciones pueden encontrarse en todo el colon, e incluso

pueden perforar el intestino, y aunque es poco frecuente, algunos pacientes muestran signos de abdomen agudo y síndrome disentérico; (3) diarrea amibiana, las lesiones no son tan profundas, afectando primordialmente al ciego y el apéndice (simulando una apendicitis aguda); (4) tifloapendicitis amibiana, sintomatología similar a la apendicitis aguda pero generalmente acompañada de diarrea [Baruch, 2013].

Las formas crónicas son atípicas y asintomáticas. Algunos pacientes presentan periodos de diarrea alternados con periodos de normalidad, mientras que otros muestran constipación con meteorismo postprandial, dolores abdominales, y cefalea, entre otros síntomas [Wiser, 2010].

A pesar de lo anterior, la mayoría de los casos de infección intestinal no muestra manifestaciones clínicas; sin embargo, en infecciones recurrentes o relapsos, algunos pacientes pueden evolucionar a amibiasis invasiva, especialmente si el parásito encuentra las condiciones apropiadas para penetrar la mucosa del colon. Las primeras lesiones del tejido extra-intestinal se caracterizan como pequeñas áreas necrosadas o ulceradas [Baruch, 2013].

La infección extra-intestinal más frecuente es la amibiasis hepática, mostrando hepatomegalia como principal signo, acompañada de fiebre y dolor. Además, puede causar ictericia, palidez, anorexia, dolor torácico, menor movilidad del diafragma, y matidez de la base pulmonar, aunado a un malestar general [Baruch, 2013]. Con menor frecuencia, se han reportado otras infecciones invasivas, p. ej., amibiasis pleuropulmonar, peritoneal, cardíaca, y cerebral; sin embargo, éstas generalmente se presentan después de la infección hepática, como consecuencia de la ruptura de un absceso y la migración del parásito a tejidos vecinos (pulmón) o a tejidos distantes (cerebro, a través del torrente sanguíneo). Cuando el daño tisular es severo, las infecciones amibianas extra-intestinales pueden conducir a la muerte [Wiser, 2010].

1.1.3. *Entamoeba histolytica*

E. histolytica es un protozooario unicelular eucariótico causante de la amibiasis en humanos, cuyo nombre científico proviene de cuatro términos griegos, que significan “amiba que destruye el tejido intestinal” [Becerril et al., 2014].

Morfología y ciclo de vida

En su ciclo de vida, *E. histolytica* presenta varios estadios morfológicos; sin embargo, sólo dos han sido caracterizados claramente: trofozoito, o forma invasiva, y quiste, o forma infectiva (Figura 1-1). El trofozoito es mono-nucleado, amorfo, y puede medir entre 10 y 60 μm . En condiciones medioambientales óptimas (pH cercano a 7.0, temperatura de 37 °C), aunado a un abasto suficiente de

nutrientes y a una buena hidratación, pueden proliferar indefinidamente. Con una membrana citoplasmática bastante compleja y un citosol repleto de una amplia variedad de vesículas poco diferenciadas, contiene un citoplasma de dos componentes: un ectoplasma, que participa en funciones tanto de digestión (mediante pinocitosis y fagocitosis) como de locomoción (mediante pseudopodia), y un endoplasma, que rodea a su único núcleo [Wiser, 2010]. A pesar de carecer de mitocondrias típicas, y por ende un metabolismo anaeróbico dependiente de energía vía glucólisis, contiene un mitosoma (remanente mitocondrial) con funciones aun no definidas claramente. Además, contiene un sistema endomembranoso (similar al retículo endoplásmico y el aparato de Golgi) aparentemente subdesarrollado [Baruch, 2013]. Una forma poco diferenciada, observable en heces diarreicas de pacientes con infección activa, es el pre-quiste (también denominado forma quística inmadura), el cual puede medir 5-20 μm y contener 1 o 2 núcleos [Baruch, 2013]. El quiste, la forma completamente diferenciada (madura), es excretado en heces sólidas o líquidas de pacientes infectados, mide de 8 a 14 μm , y contiene 4 núcleos. Este estadio le brinda al parásito capacidad de resistencia a la desecación y a los cambios de temperatura, permitiéndole viabilidad por periodos prolongados fuera del hospedero [Wiser, 2010].

El ciclo de vida del parásito inicia con la ingesta del quiste, generalmente presente en bebidas o alimentos contaminados (Figura 1-2). Cuando pasa por el estómago, las enzimas hidrolíticas erosionan la pared quística, sin afectar el citoplasma, y al llegar

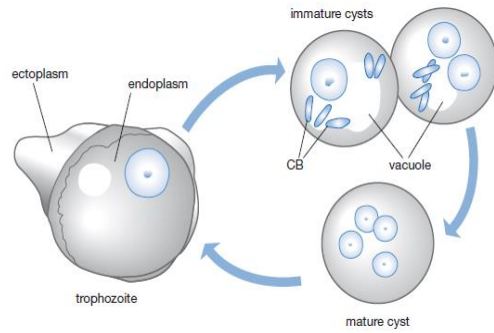


Figura 1-1. Estadios de *E. histolytica* que habitan el colon en humanos.

Quistes inmaduros o prequistes (1-2 núcleos) así como quistes maduros (4 núcleos) son comúnmente encontrados en heces. Cuerpos cromatoides (CB) y vacuolas pueden ser evidentes en el estadio de prequiste. Tomada de Wiser, 2010. La imagen permanece en el lenguaje original.

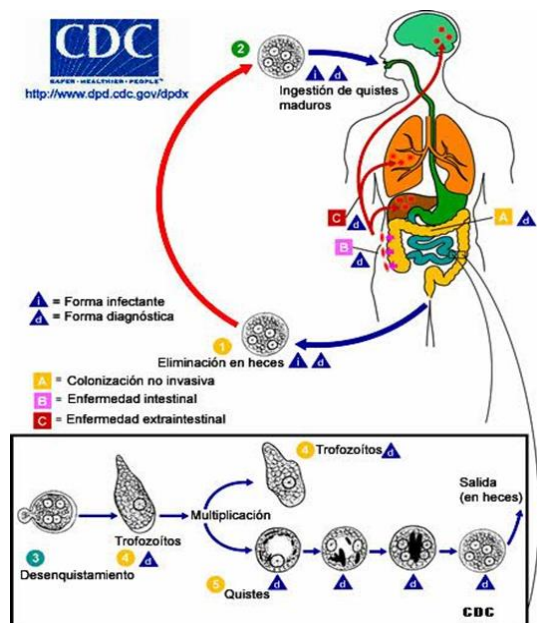


Figura 1-2. Ciclo de vida de *Entamoeba histolytica*.

Tomada del portal del Centro de Control de Enfermedades de E.U.A. (www.cdc.gov)

al íleon, las secreciones intestinales finalizan la degradación de esa pared, provocando el desenquistamiento. En este sitio, tanto el citoplasma como los núcleos se dividen, generando ocho trofozoitos mono-nucleados, los cuales se dividen por fisión binaria y se adhieren a la mucosa intestinal, colonizando el intestino grueso (región íleo-cecal), donde pueden vivir como comensales alimentándose de bacterias y restos celulares.

Cuando el ambiente no es favorable, el trofozoito se desprende de la mucosa intestinal e inicia el proceso de enquistamiento, adquiriendo una forma pre-quística esférica y la aparición de cuerpos cromatoides (CB) en el citoplasma (indicados en la Figura 1-1). La maduración del quiste involucra dos ciclos de replicación nuclear sin división celular y la desaparición de los CB. Los quistes maduros son eliminados en las heces fecales y pueden permanecer viables fuera del hospedero durante semanas o meses, dependiendo de las condiciones medio-ambientales, o pueden ser consumidos, en bebidas o alimentos contaminados, reiniciando su ciclo de vida.

Ocasionalmente, cuando las condiciones de la región íleo-cecal lo favorecen, aunado al estado inmunológico del hospedero y al arsenal de factores de virulencia que porte el parásito, el trofozoito evoluciona hacia una forma invasiva, la cual puede penetrar la mucosa intestinal, originando lesiones e invadiendo los vasos sanguíneos de los tejidos más próximos, y diseminarse hacia otros órganos, como el hígado (principalmente), causando abscesos amibianos [Wiser, 2010].

Patogénesis y virulencia

E. histolytica tiene un conjunto de factores de virulencia que le permiten infectar, sobrevivir, e invadir al hospedero (humano). La totalidad de estos, a nivel tanto de la estructura-función como de su efecto fisiológico, aún no se comprende por completo; además, existen condiciones en el hospedero que pudieran potenciar los efectos deletéreos de la infección. Por lo tanto, se considera que la patogénesis de la amibiasis es el producto de una combinación de factores parásito-hospedero-ambiente que contribuyen al desarrollo y establecimiento de la enfermedad [Wiser, 2010].

El parásito expresa y despliega proteínas en su superficie, como la lectina de unión a galactosa/N-acetilgalactosamina, involucradas en la adhesión a la mucina del colon. Además, secreta amibaporos (péptidos formadores de poros), que desestabilizan membranas de células del hospedero, y cisteína proteasas, que degradan proteínas de la matriz extracelular, inmunoglobulinas, y factores del complemento [Serrano-Luna et al., 2013].

Interesantemente, se ha reportado que la variabilidad fenotípica y el medioambiente contribuyen directamente sobre la virulencia de *E. histolytica*. Esto se ha observado en cultivos de laboratorio, donde aislados clínicos con marcado perfil virulento reducen su capacidad secretora al ser proliferados en medio axénico [Becerril et al., 2014]. Por otro lado, la microbiota intestinal influye directamente sobre el

establecimiento de la infección, ya que representa la principal fuente de alimentación del trofozoito. Aunado a esto, el grado de glicosilación de MUC2 (mucina predominante en la mucosa del colon), que beneficia su adhesión al tejido intestinal, y la competencia del sistema inmune del hospedero, que juega un papel importante en las etapas tempranas de la infección, aceleran el proceso de daño al tejido intestinal [Petri, et al, 2002].

Factores de virulencia

La *lectina de unión a galactosa* y *N-acetilgalactosamina*, principal molécula de adhesión del parásito, se presenta en forma de un complejo de membrana, con peso molecular de 260 kDa [Petri et al., 1989], compuesto por dos subunidades, una pesada (Hgl, 170 kDa) y una ligera (Lgl, 35/31 kDa), conectadas mediante un enlace disulfuro, y unidas no covalentemente a una subunidad intermedia (Igl, 150 kDa). Hgl es una proteína integral de membrana, constituida por un dominio extracelular (rico en cisteínas) y un pequeño fragmento citosólico (responsable de la señalización intracelular); en tanto Igl y Lgl están ancladas vía glicosilfosfatidilinositol (GPI) [Petri, et al, 2002; Ralston & Petri, 2011]. Además de su papel en la adherencia, se ha reportado que también participa en la citotoxicidad y en mecanismos de evasión al sistema inmune, ya que es muy similar a CD59 de humano [Ximenez et al., 2007].

Los *amibaporos*, proteínas parecidas a saponina, son proteínas capaces de formar canales iónicos en membranas lipídicas y de despolarizar las membranas de las células blanco [Bracha et al., 2002]. *E. histolytica* expresa y secreta tres isoformas (A, B, y C) en una proporción 35:10:1. La isoforma A es la más estudiada (debido a su nivel de expresión); sin embargo, la isoforma C (menos abundante) es la que exhibe mayor acción citolítica [Leippe, 1997]. Las tres isoformas despliegan un sitio altamente conservado, conteniendo 6 residuos de cisteínas que conforman 3 enlaces disulfuro, los cuales confieren resistencia a ambientes ácidos y amplia termoestabilidad [Zhai & Saier, 2000]. Su mecanismo de acción consiste en permeabilizar la membrana mediante inserción en la bicapa lipídica de la célula afectada, alterando el flujo de iones y otras moléculas, lo que conduce a un desbalance en el medio intracelular y para ocasionar, finalmente, la muerte [Wilson et al., 2012; Becerril et al., 2014]. También se ha observado que exhiben función bacteriolítica, ya que son capaces de lisar bacterias [Leippe, 1997].

Las *cisteína proteasas* (CP) son enzimas capaces de degradar proteínas [Wiser, 2010]. Durante la invasión, las CP degradan la mucosa intestinal y destruyen la matriz extracelular, causando daño epitelial y ulceraciones. La formación de estas úlceras permite que el parásito transite hacia la mucosa y migre hacia otros tejidos, principalmente al hígado. De acuerdo a la base de datos del genoma amibiano (www.amoebadb.org), existen 50 genes que codifican para CP, la mayoría con alta similitud a proteínas de la superfamilia de papaína CI. Los precursores enzimáticos se expresan como pre-pro-proteínas, conteniendo una secuencia señal de 12-20 residuos, un dominio pro de 55-148 residuos, y un dominio

catalítico de 190-488 residuos de aminoácidos (que contiene tres enlaces disulfuro que estabilizan su estructura terciaria) [He *et al.*, 2010]. En la mayoría, sus sitios activos contienen una triada catalítica conformada por los residuos Cys, His, y Asn. Del conjunto enzimático, *EhCP1*, *EhCP2*, *EhCP3*, y *EhCP5* son las más estudiadas se sabe que participan en la destrucción de la matriz extracelular, degradando fibronectina, laminina, y colágeno; en la fagocitosis de bacterias y células del hospedero, y en la evasión del sistema inmune, degradando inmunoglobulinas, interleucinas, y factores del complemento [Becerril *et al.*, 2014].

Algunos *antioxidantes amibianos*, considerados como factores de virulencia, descomponen aniones peróxidos y superóxidos. Tres enzimas han sido catalogadas como antioxidantes: una superóxido dismutasa que contiene hierro (Fe-SOD), que cataliza la conversión de superóxido a oxígeno (O_2) y peróxido de hidrógeno (H_2O_2); una flavina-reductasa dependiente de NADPH, que es capaz de reducir O_2 a H_2O_2 ; una peroxirredoxina (Prx), que exhibe actividad peroxidasa y antioxidante [Wilson *et al.*, 2010], y depende de la acción del sistema Trx/TrxR (tioredoxina y tioredoxina reductasa) [Pacheco-Yépez *et al.*, 2014]. En la superficie, la Prx interactúa con la lectina de unión a galactosa/N-acetilgalactosamina, probablemente para proteger al trofozoito de las especies reactivas de oxígeno (generadas por células epiteliales y fagocitos del hospedero); además, el sistema Prx-Trx protege a la membrana célula de la peroxidación de lípidos. Ambos sistemas permiten la sobrevivencia y proliferación del trofozoito en ambientes altamente oxigenados [Pacheco-Yépez *et al.*, 2014].

1.2. Proteasas y sus funciones

1.2.1. Bioquímica y biofísica

Las proteasas son enzimas capaces de hidrolizar los enlaces peptídicos, se encuentran ampliamente distribuidas en la naturaleza, y muestran una gran variedad de funciones. En general, son esenciales en cada etapa de vida de una célula, ya que todas las proteínas producidas tienen que ser eventualmente degradadas [Potempa & Pike, 2005]. Habitualmente, se sintetizan como precursores inactivos, conocidos como zimógenos, con la finalidad de prevenir la degradación proteica no deseada. La conversión de un zimógeno a una enzima activa ocurre generalmente por proteólisis limitada de un fragmento, conocido como segmento de activación inhibitorio, que se encuentra en el extremo N-terminal [Khan & James, 1998].

Con respecto al sitio de corte, las proteasas se clasifican en: endopeptidasas, si rompen cualquier enlace peptídico no ubicado en los extremos; y exopeptidasas, si cortan a partir del extremo N- o C-terminal. El término peptidasa se utiliza para enzimas que hidrolizan péptidos pequeños, mientras que proteasa se aplica a (endo/exo) peptidasas capaces de cortar péptidos grandes y proteínas [Potempa &

Pike, 2005]. Sin embargo, la clasificación más utilizada corresponde a su mecanismo catalítico: serina/serín proteasas, cisteína proteasas (tiol-proteasas), aspartato proteasas (proteasas ácidas), y metaloproteinasas [*Hartley, 1960*]. Posteriormente, se añadieron dos grupos más: glutamato proteasas [*Fujinaga et al., 2004*] y treonina/treonín proteasas [*Seemüller et al., 1995*].

Las serina/serín proteasas participan en un gran número de procesos biológicos y son el grupo con mayor proporción (35%) [*Potempa & Pike, 2005*]. Quimiotripsina (primera serina proteasa clasificada), tripsina, elastasa, y catepsina G se ubican dentro de esta clasificación [*Neitzel, 2010*]. Su sitio catalítico está compuesto por residuos de serina, histidina, y aspartato; siendo el residuo de serina (hidroxilo) el que actúa como nucleófilo, en tanto el residuo de histidina actúa como base para potenciar la reacción y el residuo de aspartato como estabilizador [*Khan & James, 1998*]. El pH óptimo de la catálisis es de 7 a 9 [*Neitzel, 2010*].

Las cisteína proteasas son muy similares a las serina/serín proteasas en cuanto a su mecanismo de acción, pero son mejores nucleófilos (debido a la capa extra de electrones presentes en el azufre del grupo tiol), y constituyen el 19.8% del total de proteasas [*Potempa & Pike, 2005*]. La papaína es la principal proteasa que distingue a este grupo [*Sajid & McKerrow, 2002*]. Su sitio catalítico consta de tres residuos: cisteína, histidina, y asparagina, favoreciendo un ataque nucleofílico sobre el enlace escindible por parte del grupo tiol de la cisteína [*Khan & James, 1998*]. El pH óptimo de hidrólisis habitualmente se ubica en el rango de 4 a 7 [*Sajid & McKerrow, 2002*].

Las aspartato proteasas se pueden encontrar en hongos, virus, levaduras, plantas, y mamíferos, y constituyen el 6.3% del total de proteasas. Poseen dos residuos de aspartato altamente conservados en el sitio activo. La proteólisis se lleva a cabo en un solo paso. Las principales proteasas que corresponden a este grupo son renina, pepsina, y catepsina. Un pH por debajo de 5 es el óptimo para que la catálisis se lleve a cabo [*Brik & Wong, 2002*].

Las metaloproteinasas corresponden el segundo grupo con mayor representación (30.2%), después de las serina/serín proteasas. Son hidrolasas donde el ataque nucleofílico se lleva a cabo mediante una molécula de agua activada por un catión metálico, usualmente es zinc (aunque también puede ser cobalto, manganeso o níquel). El ión metálico puede ser inmovilizado por tres ligandos (residuos de aminoácidos): histidina, glutamato, o aspartato. Termolicina, carboxipeptidasas, y aminopeptidasas corresponden a este grupo. El pH óptimo para que se lleve a cabo la hidrólisis es de 7 a 9 [*Potempa & Pike, 2005*].

1.2.2. Proteasas en patologías de humanos

La función celular de las proteasas requiere de una regulación muy estricta, la cual puede ser a nivel transcripcional o mediante modificaciones post-transcripcionales. Una falla en cualquiera de estos

mecanismos puede provocar enfermedades neurológicas (como Alzheimer, meningitis, y esclerosis múltiple, entre otras) o desórdenes cardiovasculares (como infarto, hipertensión, trombosis, y hemorragias, entre otras); además, puede inducir degradación de tejido, y con ello artritis o enfermedades fibróticas, y causar eventos de progresión tumoral (como la angiogénesis, invasión de tejido, y metástasis) [Cerde-Costa & Gomis-Rüth, 2014]. Las proteasas juegan papeles fisiológicos importantes en el ciclo de vida de cualquier organismo, pero las enzimas que son producidas por microorganismos patógenos pueden actuar como factores tóxicos para el hospedero, evadiendo las defensas y degradando tejidos, lo que ocasiona daños severos [Miyoshi & Shinoda, 2000]. Esto es cierto para varias infecciones en humanos; p. ej., tétanos, neumonía, tuberculosis, SIDA, botulismo, gangrena, malaria, leishmaniasis, y amibiasis, entre otras [Cerde-Costa & Gomis-Rüth, 2014].

1.2.3. Proteasas de parásitos protozoarios

Para sobrevivir y propagarse, los parásitos protozoarios requieren infectar a sus hospederos; para ello, tienen proteasas esenciales que participan en diferentes actividades; p. ej., evasión del sistema inmune y degradación de proteínas, entre otras. Además, participan en el procesamiento secundario (activación) de otras proteínas, importantes para su fisiología. Como se puede observar en la Tabla 1-1, expresan una amplia variedad de proteasas [Atkinson et al., 2009; Baruch, 2013; Sibley, 2013].

Tabla 1-1. Enzimas proteolíticas de protozoarios.

Enzima	Parásito	Nombre	Función
Cisteína proteasas	Tripanosomátidos	Cruzipaína, congopaína	Antigénicas
	<i>Plasmodium</i>	Falcipaína	Invasión y ulterior rotura eritrocitaria; digestión de hemoglobina
	<i>E. histolytica</i>	Amoebapaína, histolizaina	Penetración de mucosas
	<i>Faciola hepática</i> <i>Paragonimus westermani</i>		Penetración, degradación de matriz extracelular
Serín proteasas	<i>T. cruzi</i>	Oligopeptidasa B	Penetración de tripomastigotes Hidrolisis de colágeno
	<i>T. cruzi, Plasmodium</i>	Prolil oligopeptidasa	Invasión; formación de vacuola parasitófora; interacciones con receptores
	<i>Schistosoma mansoni</i>		Penetración a piel
Metaloproteasas	Tripanosomátidos	Leishmanolisina	Degradación de componentes de matriz extracelular
	<i>Plasmodium</i>	Falcilisina	Degradación de péptidos en vacuola alimentaria
Aspartato proteasa	<i>Plasmodium</i>	Plasmepsinas	Digestión de hemoglobina
Treonín proteasas	Todos los parásitos	Proteosoma	Recambio proteico en proceso de diferenciación

Tomada de Baruch, 2013.

Plasmodium falciparum, el parásito causante de la malaria, tiene proteasas que pertenecen a diversos grupos. La principal es un aspartato proteasa conocida como *plasmepsina*, ya que es la encargada de la primera fase de digestión de hemoglobina, por ello es considerada como una excelente diana terapéutica [Coombs et al., 2001]. Además, contiene una serina proteasa, unida a la membrana, que está involucrada en la formación de la vacuola parasitófora. Las *falcipainas*, cisteína proteasas, están involucradas en la invasión y son responsables de la digestión de hemoglobina al interior de la vacuola digestiva [Baruch, 2013]. La metaloproteasa *falcilisina* se encarga de la degradación de péptidos pequeños generados por otras proteasas [Coombs et al., 2001].

La *cruzipaina*, una cisteína proteasa de *Trypanosoma cruzi* (agente causal de la enfermedad de Chagas), se expresa en todos los estadios del parásito y es la responsable de la interacción del parásito con el macrófago y de la invasión a células hospederas [McKerrow et al., 1993]. La serina proteasa *oligopeptidasa B* se encarga de la invasión de uno de los estadios infecciosos (tripomastigotes), al inducir un incremento transitorio de calcio citosólico en la célula hospedera. Por otro lado, una *prolil oligopeptidasa* (serina proteasa) se encarga de hidrolizar a fibronectina y colágeno [Baruch, 2013].

Entamoeba histolytica, agente causal de la amibiasis, expresa una amplia familia de *cisteína proteasas* y *metaloproteasas*. Las *cisteína proteasas* tienen diferentes funciones y se ha reportado que durante una infección invasiva los niveles de éstas aumentan. Quizás la función principal a destacar es su efecto citopático, ya que es esencial para la invasión y degradación de tejidos. La *metalocolagenasa*, presente en la membrana del trofozoito, participa en la degradación de colágeno [McKerrow et al., 1993].

1.2.4. Proteasas de parásitos protozoarios como dianas terapéuticas

La búsqueda de nuevas moléculas con actividad terapéutica demanda como insumo esencial la identificación de dianas terapéuticas con potencial de bloquear, inhibir, modular, o regular una función esencial [Robinson & Dalton, 2011]. Para proteasas de protozoarios parásitos, la síntesis química ha rendido moléculas con potencial inhibitorio; sin embargo, en los ensayos pre-clínicos no se han obtenido resultados satisfactorios, ya que muestran una alta reactividad, por lo que resultan poco selectivos y muy tóxicos [Mittl & Grütter, 2006]. La Tabla 1-2 enlista varias proteasas que han sido utilizadas como dianas terapéuticas para el diseño de inhibidores. Independientemente de los resultados negativos, obtenidos con diferentes inhibidores, los datos observados con la vinilsulfona K11777 (N-metilpiperazina-urea-fenilalanil-homofenilalanil-vinilsulfona-benceno), un inhibidor irreversible de cisteína proteasas (p. ej., catepsina y cruzaina), demuestran que las proteasas pueden ser buenas dianas terapéuticas [Jacobsen et al., 2000].

Tabla 1-2. Proteasas utilizadas en el diseño de fármacos basados en la estructura.

Peptidasa	Función biológica	Enfermedad
Cisteína proteasas		
Catepsina B	Procesamiento antigénico	Pancreatitis aguda, cáncer
Catepsina L y S	Proteólisis lisosomal	Inflamación
FP-2	Degradación hemoglobina	Malaria
Caspasa-1	Maduración de la IL 1- β	Choque endotóxico
Serina proteasas		
Trombina	Proteólisis del fibrinógeno	Trombosis
Urokinasa	Activación de plasminógeno	Cáncer
Flavivirus peptidasas	Procesamiento de poliproteína	Infección viral
DPP-4	Procesamiento de precursores de hormonas	Diabetes mellitus tipo 2
Aspartato proteasas		
HIV peptidasa	Procesamiento de pro-proteína viral	Infección VIH
Plasmepsina	Degradación de hemoglobina	Malaria
Memapsina-2	Actividad β -secretasa	Enfermedad de Alzheimer
Metaloproteasas		
FtsH	Eliminación de proteínas no plegadas	Enfermedades neurológicas
Metalopeptidasa-1	Degradación de tejido conectivo	Daño tisular en la invasión tumoral

Tomado de Mittl, 2006.

1.3. Cisteína proteasas de *Entamoeba histolytica*

1.3.1. Familia de cisteína proteasas

Las cisteína proteasas de parásitos pueden clasificarse en dos grupos, conocidos como el clan CA y el clan CD. Por lo general, son asignadas a clanes y familias, dependiendo de la homología en la secuencia de aminoácidos y la especificidad bioquímica a ciertos sustratos.

El clan CA contiene a las familias que muestran una estructura similar a la *papaína*, la primera cisteína proteasa purificada y caracterizada; por tal motivo, son conocidas como *proteasas parecidas a la papaína*. Además de los residuos comprometidos en la catálisis (Cys, His, y Asn [o Asp]), existen otros considerados como importantes para la función: (i) Gln152, que permite la formación de un bolsillo con propiedades de oxianión, y (ii) Asn308 (en algunas familias Asp), que es esencial para orientar el anillo imidazólico del residuo catalítico His. La mayoría de las proteasas de este grupo exhiben actividad endopeptidasa. Además, al igual que *papaína*, muchas se sintetizan como proenzimas inactivas, con el dominio “pro” en el extremo N-terminal. Con respecto a sus propiedades catalíticas, requieren sustratos que contengan un residuo de Arg en la posición P2, y son sensibles al inhibidor E64. El clan CD contiene ocho familias de endonucleasas, donde figuran las subfamilias de proteasas parecidas a: (i) *clostripaina*, (ii) *legumaina*, (iii) *caspasas*, entre otras. En este clan, el orden de los residuos catalíticos es His y Cys. La afinidad al sustrato está definida por la presencia de un residuo de Asn, Asp, Arg, o Lys en la posición

P1. Al igual que otras proteasas, algunas subfamilias se expresan como proenzimas inactivas, las cuales requieren remoción del dominio “pro” (localizados en el extremo N-terminal, para su activación. Además, ciertas pueden ser inhibidas por E64, o leupeptina [Sajid *et al.*, 2001].

1.3.2. Principales factores de virulencia con actividad cisteína proteasa

De la totalidad de cisteína proteasas codificadas en el genoma de *E. histolytica*, cuatro de éstas han sido ampliamente estudiadas: *EhCP1*, *EhCP2*, *EhCP3*, y *EhCP5*. Es de gran interés que el 90% de la actividad proteasa secretada por el trofozoito corresponde a la acción catalítica de *EhCP1*, *EhCP3*, y *EhCP5*.

1.4. Cisteína proteasa 1 de *E. histolytica*

1.4.1. Bioquímica, genética, biofísica y estructura

La cisteína proteasa 1 de *E. histolytica* (*EhCP1*) es una proteína de 315 residuos de aminoácidos, con un peso molecular teórico de 35 kDa (Uniprot No. Q01957). El precursor se expresa como una preproenzima; la cual después de remover la secuencia señal (péptido “pre”, 13 residuos), la proenzima se mantiene en la forma inactiva hasta que se remueve, proteolíticamente, el dominio “pro” (80 residuos, región 14-93), rindiendo la forma activa de la enzima (péptido maduro de 27 kDa, 222 residuos, región 94-315) [Serrano-Luna *et al.*, 2013]. Su triada catalítica corresponde a Cys118, His259, y Asn279. Además, se predice que su estructura está estabilizada por dos enlaces disulfuro: (i) Cys115-Cys161, y (ii) Cys152-Cys193. Como aún no se ha logrado cristalizar la proteína, las características estructurales han sido inferidas en base a estudios de homología de secuencias. Como exhibe preferencia a sustratos específicos de la catépsina B, ha sido ubicada en el clan CA, familia C1, subfamilia A [Meléndez-López *et al.*, 2007].

1.4.2. *EhCP1* como factor de virulencia

La enzima *EhCP1* es considerada como un factor de virulencia importante para el estadio de trofozoito, ya que se ha observado un aumento en sus niveles de expresión usando modelos de amibiasis invasiva. Su función principal es degradar proteínas de la matriz extracelular, como la mucina, para permitir la migración del trofozoito hacia otros tejidos; sin embargo, también ha exhibido un papel fundamental en los mecanismos de evasión del sistema inmune del hospedero, ya que es capaz de: (i) hidrolizar específicamente la cadena alfa de C3, factor del sistema de complemento, produciendo C3a y C3b activas; (ii) degradar a la anafilotoxina C3a, impidiendo la respuesta inflamatoria del hospedero; y (iii) unirse a la pro-IL-18 y a la inmunoglobulina IgG [Meléndez-López, *et al.*, 2007].

1.4.3. *EhCP1* como diana terapéutica

Al ser un factor de virulencia de importancia biológica para el estilo de vida parasitario, *EhCP1* representa una diana terapéutica asequible; ya que es factible suponer que su capacidad de migración y de evasión de la respuesta se verían mermadas al inhibir sus funciones catalíticas. Como ejemplo, se ha utilizado exitosamente el inhibidor K11777, originalmente diseñado para la cisteína proteasa de *T. cruzi*. Sin embargo, al exhibir potencial tóxico *in-vivo*, éste fue descartado como agente con aplicación clínica. Recientemente, se reportó la vinilsulfona WRR483, derivada de K11777, que contiene una Arg en la posición P2, lo cual mostró un aumento en la afinidad por *EhCP1* (hasta 2500 veces) y una significativa disminución de su actividad catalítica [Ta, 2012]. En general, las cisteína proteasas son excelentes dianas terapéuticas, ya que: (i) su mecanismo de acción está bien definido; (ii) son esenciales para el ciclo de vida del parásito; y (iii) se ha demostrado que su inhibición bloquea la infección invasiva (en modelos animales). Además, la enzima amibiana tiene el potencial como modelo, por lo que el desarrollo de un inhibidor efectivo anti-*EhCP1* puede servir como plataforma para el desarrollo de inhibidores dirigidos contra proteasas de otros parásitos [Robinson & Dalton, 2011].

1.5. Plegamiento de proteínas

La función de una proteína depende directamente de su estructura tridimensional. El plegamiento es un proceso termodinámico mediante el cual una proteína adopta su conformación funcional nativa [Hartl, 1996]. Este inicia con la formación de las estructuras secundarias locales; p. ej., α -hélices y β -plegadas, que inmediatamente interactúan entre sí para formar estructuras súper-secundarias más estables, los cuales, a su vez, conforman los dominios funcionales que caracterizarán a la estructura terciaria [Nelson & Cox, 2007]. Dependiendo de las condiciones medioambientales, el plegamiento puede llevarse a cabo mediante diversas rutas termodinámicas; sin embargo, para reducir el gasto energético, habitualmente este es facilitado por una gran maquinaria molecular, conformada por familias de chaperonas y plegasas [Yerbury *et al.*, 2005].

1.5.1. Maquinaria de plegamiento en eucariotas

Muy pocas proteínas logran adoptar su estructura terciaria de manera espontánea (p.ej., ribonucleasa); por lo que la mayoría requiere la asistencia de una maquinaria de plegamiento altamente especializada. Las chaperonas moleculares y plegasas son proteínas que interaccionan con polipéptidos parcial o incorrectamente plegados, facilitando rutas de plegamiento correctas o aportando micro-entornos que favorezcan el plegamiento [Nelson & Cox, 2007].

En muchos organismos, existe una familia de chaperonas moleculares que participa en una amplia variedad de funciones: las proteínas de choque térmico: Hsp (por sus siglas en inglés *Heat shock proteins*), las cuales se encargan de proteger a las proteínas que se han desnaturalizado por acción térmica (u otros tipos de estrés) y a los polipéptidos nacientes (durante su síntesis) [Nelson & Cox., 2007]. Por sus características funcionales, se pueden localizar en diversos compartimientos subcelulares, como citosol y retículo endoplásmico, y hasta en el medio extracelular [Yerbury et al., 2005]. Por sus propiedades estructurales, han sido clasificadas en diferentes subfamilias (nombradas según su peso molecular, kDa): Hsp100, Hsp 90, Hsp70, Hsp40, y sHsp (pequeñas, 10-25 kDa) [Smith et al., 1998]. Interesantemente, la actividad específica de cada una de ellas es independiente; p.ej., miembros de la subfamilia Hsp70 participan en las etapas iniciales de la síntesis y en la translocación a través de membranas [Nelson & Cox, 2007], mientras que miembros de la familia Hsp100 juegan un papel fundamental en la termotolerancia [Smith et al., 1998].

Por otro lado, dos isomerasas representan a las plegasas mayormente estudiadas: proteína disulfuro isomerasa (PDI) y peptidil-prolil (cis/trans)-isomerasa (PPI). La PDI se encarga de la formación de los enlaces disulfuro en el retículo endoplásmico, oxidando e isomerizando, hasta lograr estabilizar la estructura tridimensional del polipéptido. En tanto, la PPI está implicada en el plegamiento específico de ciertas proteínas, aquellas que requieren una conformación estructural de sus residuos de prolina (cis o trans) que mejor favorezca a la función [Gupta & Tuteja, 2011].

En una célula eucariota, cada compartimiento subcelular contiene una maquinaria específica para el plegamiento de proteínas:

El *citosol* provee el ambiente adecuado para que las chaperonas puedan asistir a los polipéptidos en cualquier etapa del plegamiento. En este compartimento se encuentran chaperonas ATP-dependientes, como la Hsp70, que pueden interactuar con una larga fracción de segmentos hidrofóbicos de los polipéptidos; y ATP-independientes, como el complejo Gln1-6, que también reconoce segmentos hidrofóbicos de los polipéptidos, pero principalmente de actina y tubulina. Cuando las proteínas quedan incorrectamente plegadas, e incluso completamente desplegadas, el citosol cuenta con un polipéptido conocido como ubiquitina, el cual se utiliza para etiquetar a esas proteínas y destinarlas a su degradación [Yerbury et al., 2005].

El *retículo endoplásmico* provee un ambiente altamente adecuado para el plegamiento oxidativo, ya que posee una significativa concentración de iones y una amplia capacidad oxidante. En este compartimento, varias son las reacciones que ocurren e influyen en el plegamiento y conformación final de las proteínas; p. ej., N-glicosilación, formación de enlaces disulfuro, y oligomerización, entre otras. Por tal motivo, cuenta con una maquinaria capacitada para detectar a los polipéptidos que no han alcanzado su máximo grado de madurez. Los enlaces disulfuro juegan un papel fundamental en el

plegamiento correcto de proteínas, ya que estabilizan su estructura (reduciendo la entropía del estado no plegado) y facilitan la conformación funcional nativa. Las chaperonas moleculares del retículo endoplásmico reconocen las regiones hidrofóbicas de polipéptidos no plegados, previniendo su agregación y acumulación, y bloqueando su transporte hacia compartimientos posteriores [Feige & Hendershot, 2011]. Los polipéptidos que no adoptan correctamente su conformación nativa son degradados mediante un mecanismo ampliamente conservado, que también utiliza a ubiquitina como etiqueta molecular. Como resultado, los mecanismos de biosíntesis, plegamiento, transporte, y degradación de proteínas que ocurren en este compartimiento deben encontrarse en constante equilibrio; por lo que posee el más riguroso sistema de control de calidad celular [Yerbury *et al.*, 2005].

Para llevar a cabo eficientemente sus funciones, la *mitocondria* requiere de proteínas correctamente plegadas. Por ello, una vez que el citosol sintetiza los precursores de proteínas mitocondriales, estos son transportados y translocados hasta el sitio donde ejercen su función. En la matriz mitocondrial se encuentran miembros de diferentes familias de chaperonas moleculares. En ésta, la más abundante es mtHsp70, la cual, en conjunto con sus reguladores (co-chaperonas Mdj1 y Mge1) y en cooperación con Hsp78, asiste el plegamiento de proteínas desnaturalizadas bajo condiciones de estrés, solubiliza pequeñas agregaciones proteicas, y promueve la degradación de polipéptidos mal plegados. Además, contiene el sistema Hsp60-Hsp10, el cual asiste el plegamiento de una manera ATP-dependiente. En el espacio inter-membrana no se han identificado chaperonas moleculares que asistan el plegamiento, pero contiene el sistema Mia40-Erv1, que participa en la formación de enlaces disulfuro: Mia40_{oxidada} reconoce e introduce enlaces disulfuro en proteínas que los requieran y Erv1 se encarga de mantener la forma oxidada de Mia40 [Schreiner *et al.*, 2012].

1.5.2. Plegamiento de proteínas en bacterias

Tal como en células eucariotas, las proteínas bacterianas dependen de un correcto plegamiento para que lleven a cabo su función. Cada proteína tiene una localización final a la que deben llegar; por ello, transitan a través de diversos compartimientos para obtener su maduración y plegamiento, cada uno de éstos con su propia maquinaria de plegamiento de proteínas [Rizzitello *et al.*, 2001].

El principal compartimiento bacteriano es el *citosol*, el cual contiene una gran cantidad de chaperonas moleculares que asisten al plegamiento de proteínas. Los complejos citosólicos más abundantes son GroEL/GroES y DnaK/DnaJ [Agashe *et al.*, 2004]. El complejo GroEL/GroES actúa como una jaula para plegar proteínas, ya que conforman una estructura parecida a un barril que atrapa a los polipéptidos no plegados y los libera correctamente plegados. GroEL puede interactuar con proteínas de manera independiente de GroES; sin embargo, el complejo estable requiere de la participación de GroES, ya que éste induce cambios conformacionales en GroEL requeridos para el

contacto con los polipéptidos [Hartl, 1996]. DnaK se une a cadenas más largas y, junto a DnaJ y GrpE, previenen la agregación de polipéptidos nacientes, aún en condiciones de estrés [Hartl, 1996].

Las proteínas citosólicas permanecen en ese compartimiento hasta completar su función. Sin embargo, las proteínas que siguen la vía de secreción deberán ser dirigidas hacia el periplasma, donde serán translocadas de manera co- o post-traduccional. El *periplasma* es un compartimiento que tiene un medio ambiente altamente oxidante y posee una maquinaria especializada que favorecen el plegamiento. Algunas plegasas catalizan la formación correcta de enlaces disulfuro (p.ej., Dsb), en tanto otras la isomerización cis/trans de residuos de prolina (p.ej., PPI). Además, chaperonas moleculares, como DegP (la más abundante), facilitan el plegamiento [Rizzitello et al., 2001].

1.5.3. Plegamiento oxidativo de proteínas en el periplasma de *E. coli*

En la bacteria Gram-negativa *E. coli*, la formación correcta de enlaces disulfuro se lleva a cabo en el periplasma, compartimiento subcelular que alberga una maquinaria especializada de plegasas denominadas en conjunto Dsb (del inglés *disulfide bond*), las que se agrupan en dos complejos: DsbA/DsbB y DsbC/DsbD [Berkmen et al., 2005; Ke & Berkmen, 2014]. DsbA se encarga de la oxidación de dos cisteínas adyacentes, formando enlaces disulfuro consecutivos; después de esta acción, DsbA es reoxidada por DsbB. Sin embargo, el complejo DsbA/DsbB es incapaz de corregir los enlaces disulfuro mal formados; para esto, DsbC ejerce una actividad reductasa/isomerasa, reduciendo el enlace incorrecto y promoviendo la acción de DsbA, o corrigiéndolo ella misma [Ren & Bardwell, 2001]. Para ejercer su actividad, DsbC requiere mantenerse en su estado reducido, el cual es catalizado por DsbD. Se ha reportado que DsbC exhibe actividad chaperona y que muchas proteínas que tienen enlaces disulfuro no consecutivos son dependientes de DsbC [Berkmen et al., 2005]. Se ha sugerido que DsbG (una proteína paróloga a DsbC) puede asistir la isomerización; sin embargo, esa actividad no ha sido demostrada [Ren & Bardwell, 2001].

1.5.4. Plegamiento de proteínas en *E. histolytica*

Al igual que otras, las proteínas amibianas también dependen de un correcto plegamiento para adoptar su conformación funcional nativa. Aún más, este proceso es altamente necesario para el estilo de vida del patógeno, en especial para el ejercicio eficiente de muchos factores de virulencia. Muy pocas chaperonas moleculares y plegasas han sido descritas a la fecha; sin embargo, se han identificado algunas consideradas como esenciales en la maquinaria de plegamiento de células eucariotas. Por ejemplo, la chaperona *EhHsp90*, la cual se une *EhAha1* (una co-chaperona que acelera el ciclo de la ATPasa), es necesaria para el crecimiento y sobrevivencia del parásito. Otras co-chaperonas, como Cdc37, P23, y cyp40, también han sido identificadas [Singh et al., 2014]. En tanto, la formación de enlaces disulfuro es catalizada por homólogos de la proteína PDI. Interesantemente, el genoma de *E. histolytica* contiene

11 genes codificantes para proteínas ortólogas [Ramos *et al.*, 2008]; de los cuales, el más estudiado codifica para una proteína de 38 kDa, denominada *EhPDI*. Esta plegasa contiene dos dominios tiorredoxina activos (que incluyen el sitio activo CXXC), exhibe las actividades típicas de una disulfuro oxidoreductasa y chaperona, y es capaz de complementar las funciones de una oxidasa y reductasa/isomerasa *in vivo*, usando modelos en bacteria y en levadura [Ramos *et al.*, 2005; Mares *et al.*, 2009; Ramos *et al.*, 2011; Mares *et al.*, 2015]. Además, recientemente se reportó que es capaz de asistir el plegamiento oxidativo de la quitinasa amibiana [Muñoz *et al.*, 2015].

1.6. Plegamiento oxidativo de *EhCP1* en periplasma de *E. coli*

El plegamiento correcto de algunos factores de virulencia amibianos, como las cisteína proteasas, depende de una oxidación apropiada de sus enlaces disulfuro, que son esenciales para su estructura y función. Para comprender adecuadamente los procesos bioquímicos asociados al plegamiento oxidativo de proteínas, es importante realizar los estudios funcionales en el sistema biológico homólogo, ya que el ambiente fisiológico nativo ofrece las condiciones celulares requeridas para un máximo desempeño operacional. Habitualmente, las mutantes condicionales o letales ofrecen una plataforma adecuada para ese fin. Desafortunadamente, a la fecha no es posible realizar estudios operacionales clásicos en la amiba; p. ej., complementación funcional, ya que la carencia de un mecanismo evidente de recombinación homóloga dificulta la generación de mutantes nulas (*knock-out*), mediante métodos genéticos tradicionales. Por otro lado, las nuevas tecnologías de silenciamiento génico han ofrecido alternativas metodológicas viables; sin embargo, la variabilidad observada en estudios comparativos ha demostrado que aún se requiere estandarizar procedimientos.

Afortunadamente, el desarrollo de mutantes en la bacteria *E. coli* o la levadura *S. cerevisiae* ha favorecido el diseño de estrategias experimentales basadas en sistemas biológicos bien caracterizados, los cuales, además, ofrecen las bondades funcionales de un célula procariota o eucariota modelo, respectivamente. Considerando la premisa que establece: todas funciones biológicas esenciales, en lo general, están conservadas a través de la escala evolutiva, es posible suponer que cualquier proteína heteróloga capaz de complementar la función perdida en una mutante de bacteria o de levadura debe ser funcionalmente equivalente a la proteína ausente en tal sistema biológico. Por otro lado, el medio ambiente prevalente en los compartimientos subcelulares de las cepas silvestres y mutantes también brinda condiciones fisiológicas únicas, que pueden ser aprovechadas como plataformas biológicas específicas; por ejemplo, las condiciones oxidantes del periplasma (en bacterias) o el retículo endoplásmico (en eucariotas).

En este sentido, el periplasma de *E. coli* alberga una maquinaria específica de oxidorreductasas que cataliza la formación y rearrreglo de enlaces disulfuro; p.ej., DsbA (oxidasa) y DsbC (reductasa e isomerasa). Por tal motivo, se considera un compartimiento subcelular con un ambiente óptimo para la expresión y análisis de la relación estructura-función de *EhCP1*; específicamente, su dependencia a un plegamiento oxidativo correcto.

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVO

2.1. Hipótesis

La actividad proteolítica de *EhCP1* es dependiente del estado redox de los enlaces disulfuro que estabilizan su estructura.

2.2. Objetivo general

Establecer el efecto del estado redox sobre la función de *EhCP1* mediante ensayos genéticos y bioquímicos para determinar el papel de la estructura sobre la función *in vivo* de la proteína *EhCP1*

2.3. Objetivos específicos

- Obtener la secuencia codificante para el pro-péptido *EhCP1* en fase con la señal PelB (N-terminal) y la etiqueta Myc (C-terminal), mediante una estrategia de sub-clonación por sustitución en el plásmido pBPelB-*EhHAP*-Myc y producción del vector pBPelB-*EhCP1*-Myc.
- Obtener la secuencia de fusión PelB-*EhCP1*-Myc bajo el control del promotor de arabinosa (PBAD), mediante una estrategia de sub-clonación por inserción en el plásmido pBAD33 y producción del plásmido pBAD-PelB-*EhCP1*-Myc.
- Analizar la expresión funcional y localización intracelular de la enzima *EhCP1* en la cepa silvestre de *E. coli* BW25113 mediante ensayos de actividad proteolítica y fraccionamiento subcelular para verificar su expresión activa en el periplasma bacteriano.
- Analizar la expresión de la enzima *EhCP1* en el periplasma de las cepas mutantes de *E. coli* MRB10 (Δ DsbA) y MRB20 (Δ DsbC) mediante ensayos de actividad proteolítica para establecer la dependencia de su estructura y función a un plegamiento oxidativo asistido por plegasas.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Reactivos biológicos y químicos

3.1.1. Reactivos químicos y bioquímicos

Amresco: cloruro de sodio (NaCl). *Becton Dickinson (BD)*: agar bacteriológico; extracto de levadura; triptona. *Bio-Rad*: agarosa; azul brillante de *Coomassie* R-250; solución de acrilamida al 30%. *Fermont*: etanol. *FM Science*: 2-mercaptoetanol. *MP Biomedicals*: glicina. *Nestlé*: leche en polvo *Svelty*TM. *Productos Químicos de Monterrey*: cloruro de calcio (CaCl₂); isopropanol. *Roche*: fosfatasa alcalina (*bCIP*). *Scientific Industries*: perlas de vidrio 0.1 mm. *Shelton Scientific (IBI)*: ácido etilendiamino-tetra-acético (EDTA); ditiotreitól (DTT); dodecil sulfato de sodio (SDS); glicerol; isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido (IPTG); Tris (tris[hidroximetil]aminometano); Tritón X-100. *Sigma*: acetona; ácido acético glacial; arabinosa; azul de bromofenol; azul de xilencianol; bromuro de etidio (BrEt); reactivo *CellLytic*TM B; cloroformo; dimetilsulfóxido (DMSO); gelatina de porcino; N,N,N',N'-tetra-metil-etilenediamina (TEMED); reactivo de *Bradford*; *Tween*[®]-20. *Spectrum*: metanol.

3.1.2. Enzimas y otros reactivos biológicos

Agilent: ADN-polimerasa de *Pyrococcus furiosus* (*Pfu* ADN-pol) y su solución amortiguadora 10X. *New England Biolabs*: endonucleasas (BamHI, HindIII, XbaI, XhoI) y sus soluciones amortiguadoras 10X; solución de albúmina sérica bovina (BSA) a 10 mg/mL; ADN-ligasa del bacteriófago T4 (T4 ADN-lig) y su solución amortiguadora 10X; estuche comercial *Quick ligation*TM; solución de deoxirribonucleótidos trifosfatados (dNTPs) a 10 mM; marcador de peso molecular para proteínas (*Blue Protein Standard, Broad Range, 11-190 kDa*); marcadores de peso molecular para ADN (*100-bp ladder* y λ DNA-HindIII), *Qiagen*: mezcla 2X de ADN-pol de *Thermus aquaticus* (2X *Taq Mix*). *Rockland*: anticuerpo policlonal anti-IgG de ratón acoplado a fosfatasa alcalina; anticuerpo monoclonal anti-IgG de conejo acoplado a fosfatasa alcalina. *Sigma*: anticuerpo monoclonal anti-Myc. *UCSD*: anticuerpo policlonal anti-*EhCP1* (proporcionado por la Dra. Sharon Reed, Escuela de Medicina).

3.1.3. Estuches comerciales

Los productos de *PCR* fueron purificados usando el *QIAquick PCR Purification Kit*, los fragmentos de ADN fueron extraídos a partir de gel utilizando el *QIAquick Gel Extraction Kit*; y el ADN plasmídico fue purificado con el *QIAprep Spin Miniprep Kit*; todos de *Qiagen*. El revelado de la inmunodetección se llevó a cabo utilizando el estuche comercial *AP Conjugate Substrate Kit* de *Bio-Rad*.

Tabla 3-1. Genotipos, nomenclatura redox y origen de las cepas de *E. coli* utilizadas en el estudio.

Cepa	Genotipo	Nomenclatura	Fuente
ER2738	F' proA ⁺ B ⁺ lacI ^q Δ(lacZ)M15 zzf::Tn10 (Tet ^R) / fhuA2 glnV Δ(lac-proAB) thi-1 Δ(hsdS-mcrB)5	dsbA ⁺ dsbC ⁺	NEB
BW25113	Δ(araD-araB)567 ΔlacZ4787(::rrnB-3) λ- rph-1 Δ(rhaD-rhaB)568, hsdR514	dsbA ⁺ dsbC ⁺	CGSC [Baba, 2006]
MRB10	BW25113 ΔdsbA723::frt	dsbA ⁻ dsbC ⁺	LB-FCQI [Muñoz, 2015]
MRB20	BW25113 ΔdsbC744::frt	dsbA ⁺ dsbC ⁻	LB-FCQI [Muñoz, 2015]

NEB, *New England Biolabs*; CGSC, *Coli Genetic Stock Center* (Universidad de Yale, EUA); LB-FCQI, Laboratorio de Biotecnología- Facultad de Ciencias Químicas e Ingeniería (UABC).

3.2. Células bacterianas y medios de cultivo

Las cepas de *E. coli* utilizadas en el estudio se enlistan en la Tabla 3-1. La cepa ER2738 fue utilizada como hospedera en protocolos de clonación molecular, en tanto las cepas BW25113, MRB10, y MRB20 fueron usadas como plataformas celulares en los ensayos de expresión de proteína y análisis de la actividad enzimática.

Las bacterias fueron cultivadas en medio LB líquido (1% de triptona; 0.5% de extracto de levadura; 1% de NaCl), o sólido (LB más 1.7% de agar bacteriológico). Las transformantes estables fueron seleccionadas en medio LB con el antibiótico requerido: ampicilina (0.15 mg/mL); cloramfenicol (0.015 mg/mL); tetraciclina (0.0125 mg/mL). El medio 2XYT (1.6% de triptona; 1% de extracto de levadura; 0.5% de cloruro de sodio) se utilizó como medio de recuperación bacteriana.

3.3. Plásmidos

El plásmido recombinante pBPelB-EhHAP-Myc (Figura 3-1), derivado de pBluescript SK- (*Stratagene*), contiene la secuencia codificante para el péptido maduro de la fosfatasa ácida HAP de *E. histolytica*, en fase con la secuencia señal de la proteína bacteriana PelB (en el extremo N-terminal) y el epítipo de la proteína Myc de humano (en el extremo C-terminal), bajo el control del promotor PLac (inducible por IPTG). Interesantemente, la secuencia EhHAP puede ser removida mediante

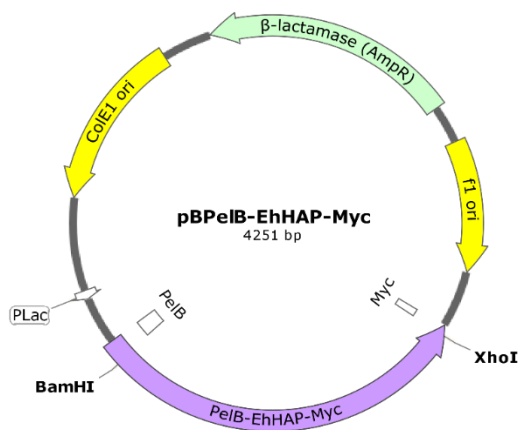


Figura 3-1. Representación esquemática del plásmido pBPelB-EhHAP-Myc.

cortes endo-nucleolíticos (con las enzimas BamHI y XhoI), por lo que el fragmento plasmídico remanente fue utilizado como receptor para la inserción en fase y direccional de la secuencia codificante de interés.

El plásmido recombinante pQEhCP1 (Figura 3-2), derivado de pQE30 (Qiagen), contiene la secuencia codificante para el pro-péptido de la enzima CP1 de *E. histolytica*, en fase con los codones codificantes para un hexámero de histidinas (6xHis, en el extremo N-terminal), bajo el control del promotor PT5 (inducible por IPTG).

El vector comercial pBAD33 (Figura 3-3) [Guzmán *et al.*, 1995], de la colección ATCC, fue utilizado como plásmido receptor para la construcción de pBAD-PelB-EhCP1-Myc. Ese plásmido comercial posee tres características moleculares que son de particular interés para la co-expresión de proteínas en *E. coli*: (i) el promotor PBAD, que es altamente regulable e inducible por arabinosa; (ii) el gen codificante para la enzima CAT (cloramfenicol acetiltransferasa), que confiere resistencia al antibiótico cloramfenicol; y (iii) el origen de replicación p15A, que es compatible con plásmidos de la familia pUC (origen ColE1).

3.4. Equipo

Las amplificaciones (mediante PCR) fueron realizadas usando un termociclador *Gradient Thermal Cycler Multigene* (Labnet International, Inc.). Los fragmentos de ADN, separados mediante electroforesis en gel de agarosa y teñidos con bromuro de etidio, fueron visualizados usando un fotodocumentador *Gel Doc™ EZ Imager* (Bio-Rad). Los cultivos líquidos fueron proliferados en una incubadora con agitación y ambiente controlado *Incubator Shaker Series 25* (New Brunswick Scientific Co.). Las incubaciones en microtubo o microplaca fueron llevadas a cabo en termobloques *Dry Block*

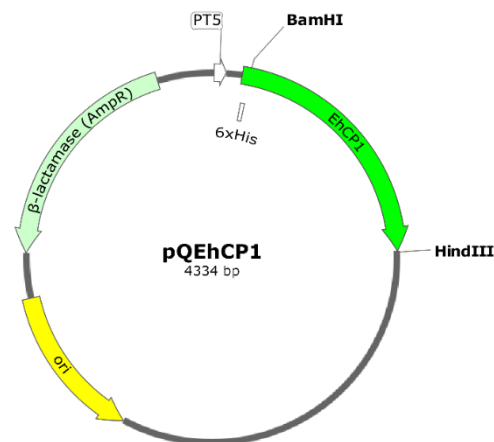


Figura 3-2. Representación esquemática del plásmido pQEhCP1.

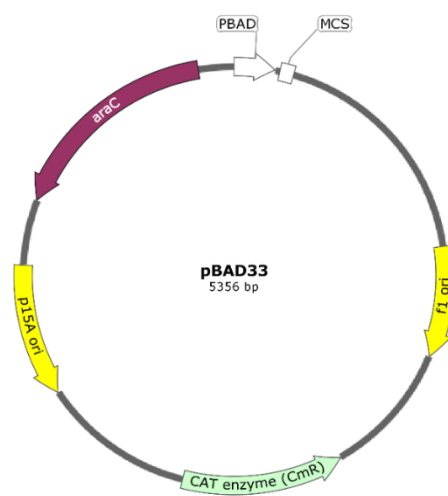


Figura 3-3. Representación esquemática del plásmido pBAD33.

Heater (VWR). Las fracciones celulares fueron separadas usando una microcentrífuga *Biocentrifuge Fresco* (Heraeus) y una *MiniSpin® Plus* (Eppendorf). Los lisados bacterianos fueron realizados utilizando el homogenizador *Disruptor Genie* (Scientific Industries Inc). Las lecturas de absorbancia en microplaca fueron obtenidas usando un espectrofotómetro *Microplate Reader 680* (Bio-Rad).

3.5. Protocolos generales

3.5.1. Preparación de células competentes para choque térmico

Las células competentes fueron preparadas siguiendo un protocolo estándar de laboratorio [Sambrook *et al.*, 2001]. Brevemente, la fracción celular de una suspensión bacteriana (1 mL a 0.4-0.6 UDO₆₀₀) fue separada mediante centrifugación (12,000 rpm; 2 min). Enseguida, la pastilla celular fue lavada en dos ocasiones (mediante resuspensión): primeramente, en 0.5 mL de agua destilada estéril (fría) y, posteriormente, en 0.5 mL de CaCl₂ a 100 mM estéril (frío). Después de cada resuspensión, la fracción celular fue mantenida en hielo durante 5 min y separada mediante centrifugación (5,000 rpm; 5 min; 10 °C). Finalmente, la pastilla fue resuspendida en 0.05 mL de CaCl₂ a 100 mM estéril (frío) y mantenida durante 5 min en hielo.

3.5.2. Transformación y selección bacteriana

A un microtubo conteniendo células competentes recién preparadas, una muestra (1-2 µL) de ADN plasmídico fue añadida, mezclada perfectamente, e incubada en hielo durante 30 min. Enseguida, el choque térmico fue realizado de la siguiente manera: 1.5 min a 42 °C seguidos de 5 min en hielo. Inmediatamente, las células fueron recuperadas en medio rico (1 mL de 2X YT) e incubadas a 37 °C durante 1 h. Las transformantes estables fueron proliferadas en medio LB sólido, suplementado con el antibiótico de selección, mediante incubación a 37 °C durante 14-16 h.

3.5.3. Expresión de proteínas (mini-ensayo)

La valoración de expresión proteica se llevó a cabo utilizando un sub-cultivo de células bacterianas portadoras del plásmido de interés. Inicialmente, un cultivo joven fue preparado mediante incubación durante la noche en medio LB, suplementado con el antibiótico apropiado. A la mañana siguiente, un sub-cultivo fue preparado (2-5 mL) mediante una dilución 1:100 en el mismo medio de proliferación. El sub-cultivo fue incubado a 37 °C durante 3 h (fase de pre-inducción), con agitación constante (300 rpm). La inducción de la expresión fue realizada mediante la adición de: (1) IPTG a una concentración final de 1 mM, para plásmidos con PLac; o (2) arabinosa a una concentración final de 0.2%, para plásmidos con PBAD. La expresión fue favorecida mediante incubación a 37 °C durante 4 h

(fase de sobre-expresión), con agitación constante (300 rpm). Las células, provenientes de 1-5 mL de cultivo, fueron separadas mediante centrifugación (12,000 rpm; 2 min). El paquete celular fue conservado en congelación hasta su análisis.

3.5.4. Extracción de proteínas totales en condiciones nativas

La pastilla celular fue descongelada (a temperatura ambiente) y resuspendida en 0.2 mL del reactivo *CellLytic*TM B. La lisis fue favorecida mediante agitación mecánica durante 5 min, usando un disruptor celular (3,000 rpm), en presencia de perlas de vidrio (0.1 mm). Posteriormente, la muestra fue agitada (*rocking*) durante 10 min. Finalmente, la fracción soluble fue separada mediante centrifugación (14,500 rpm; 15 min). El sobrenadante (fracción de proteínas solubles totales) fue transferido a un microtubo nuevo (estéril) y conservado en refrigeración hasta su análisis.

3.5.5. Fraccionamiento subcelular en condiciones nativas

La pastilla fue descongelada (a temperatura ambiente) y resuspendida en 0.4 mL de solución amortiguadora TEX (50 mM de Tris-HCl, pH 8.0; 3 mM de EDTA pH 8.0; 0.1% de Tritón X-100) con agitación suave (2 min en disruptor celular a 1,500 rpm). La suspensión celular fue incubada en hielo durante 30 min y la fracción soluble fue separada mediante centrifugación (13,000 rpm; 15 min; 10 °C). El sobrenadante fue transferido a un microtubo nuevo (estéril) y rotulado como fracción periplásmica (FPP). El precipitado fue resuspendido en 0.4 mL de solución amortiguadora TEX y lisado mediante agitación mecánica durante 5 min, usando un disruptor celular a 3000 rpm, en presencia de perlas de vidrio (0.1 mm). La fracción soluble fue separada mediante centrifugación (13,000 rpm; 15 min; 10 °C). El sobrenadante fue transferido a un microtubo nuevo (estéril) y rotulado como fracción citosólica (FCY). Las fracciones FPP y FCY fueron almacenadas en refrigeración hasta su análisis.

3.5.6. Cuantificación de proteínas (método de *Bradford*)

En pocillos de una microplaca de titulación, se prepararon diluciones de concentración conocida de BSA (0, 10, 20, 30, 40, y 50 µg/mL), a partir de una solución a 50 µg/mL, en un volumen final de 0.05 mL (usando agua como diluyente). Paralelamente, se prepararon diluciones (por duplicado) de cada muestra de proteína, ubicadas en el rango de 0 – 50 µg/mL (p. ej., 1:25, 1:50, 1:100, 1:200). Posteriormente, a cada pocillo, se agregaron 0.1 mL del reactivo de *Bradford*, se mezcló perfectamente, y se incubó a temperatura ambiente durante 5 min. Inmediatamente, las absorbancias a 450 y 595 nm (A_{450} y A_{595}) de cada pocillo fueron registradas usando un espectrofotómetro de microplaca. Una curva estándar de BSA fue preparada graficando la concentración (en µg/mL) de cada dilución contra la relación A_{595}/A_{450} correspondiente, obteniéndose valores típicos de coeficiente de correlación (r^2) de

0.99. La concentración de proteínas fue determinada extrapolando el promedio de la relación A_{595}/A_{450} de cada muestra analizada y multiplicando por el factor de dilución.

3.5.7. Separación de proteínas mediante SDS-PAGE

Las muestras analíticas fueron preparadas mezclando 1 volumen de solución de proteínas con 1 volumen de solución amortiguadora 2X para cargado en condiciones reductoras (10% de glicerol; 2.5% de SDS; 5% de 2-mercaptoetanol; 0.002% de azul de bromofenol; 50 mM de Tris-HCl, pH 6.8). Enseguida, las proteínas fueron desnaturalizadas durante 10 min a temperatura de 95-100 °C. Una alícuota (10-15 μ L) de cada muestra fue cargada en un gel de SDS-poliacrilamida al 13.5% [Laemmli *et al.*, 1970]. La separación de proteínas (en base a su talla molecular) fue realizada inicialmente a 80 V, durante su paso por el gel concentrador (15-30 min), y enseguida a 120 V, durante su paso por el gel separador (60-90 min). Una vez concluida la separación electroforética, el gel fue teñido durante 1-4 h con una solución CBB-alcohol-ácido (25% de isopropanol; 10% de ácido acético; 0.2% de azul brillante de Coomassie R250) y desteñido durante 12-18 h con una solución alcohol-ácido (10% de isopropanol; 10% de ácido acético).

3.5.8. Inmuno-detección tipo western blot

Las muestras proteicas para inmuno-detección fueron inicialmente separadas mediante SDS-PAGE. Posteriormente, las proteínas fueron electro-transferidas a una membrana de nitrocelulosa, usando un sistema *Criterion™ Blotter* (Bio-Rad) y siguiendo el protocolo recomendado por el fabricante. Enseguida, la membrana fue bloqueada durante la noche con una solución de leche *Svelty™* al 5% (en TBST). Previo a cada reconocimiento, la membrana fue lavada 3 veces (10 min cada vez) con solución amortiguadora TBST (0.1 M de Tris-HCl pH 8.0; 0.15 M de NaCl; 0.05% de *Tween®*-20). El reconocimiento primario fue realizado durante 1 h, usando el anticuerpo monoclonal de ratón anti-Myc (1:5,000 en TBST) o el anticuerpo policlonal de ratón anti-EhCP1 (1:2,000 en TBST). El reconocimiento secundario fue realizado durante 1 h, usando los respectivos anticuerpos anti-IgG acoplados a fosfatasa alcalina (1:5,000 en TBST). Finalmente, la membrana fue lavada como antes y el reconocimiento indirecto fue revelado usando el estuche comercial *AP Conjugate Substrate Kit*, siguiendo las recomendaciones del proveedor.

3.5.9. Electroforesis en gel de agarosa

Las muestras analíticas fueron preparadas mezclando 10 volúmenes de solución de ADN con 1 volumen de solución 10X para cargado (0.25% de azul de bromofenol; 0.25% de azul de xilencianol; 30% de glicerol). Enseguida, una alícuota (10 μ L) de cada muestra fue cargada en un gel al 1% de

agarosa, suplementado con 0.5 µg/mL de bromuro de etidio. La separación electroforética de fragmentos de ADN (en base a su talla molecular) fue realizada a 100 V (30-45 min). Una vez concluida, el gel fue revelado usando el filtro UV para BrEt en el fotodocumentador.

3.6. Construcción de pBPelB-*EhCP1*-Myc

3.6.1. Amplificación de la secuencia codificante para *EhCP1*

La secuencia codificante para el pro-péptido de la enzima *EhCP1* fue amplificada mediante *PCR*, usando los oligonucleótidos sintéticos QE6HISF (5´- gga tgc cat cac cat cac cat ca -3´) y EHCP1R22 (5´- tta ctc gag ata ttc aac acc agt tgg ata aag tgg atc -3´) como iniciadores sentido y anti-sentido, respectivamente, y el plásmido pQE*hCP1* como molde. La mezcla de reacción (0.05 mL) fue preparada conteniendo 0.2 mM de dNTPs, 20 picomoles de cada oligonucleótido, 2% de DMSO, 1-2 ng de pQE*hCP1*, y 2.5 U *Pfu* ADN-pol, en solución amortiguadora 1X para *Pfu* ADN-pol. Las condiciones de termociclado fueron: 1 ciclo de desnaturalización inicial (94 °C durante 2 min); 10 ciclos de amplificación exponencial (94°C durante 20 seg, 58 °C durante 20 seg, 72 °C durante 90 seg); 35 ciclos de amplificación exponencial (94 °C durante 20 seg, 62 °C durante 20 seg, 72 °C durante 90 seg); 1 ciclo de extensión final (72 °C durante 7 min). Al finalizar, el producto fue mantenido a 12 °C hasta retirarlo del equipo. La amplificación fue verificada mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%.

3.6.2. Preparación de componentes para ligación: pBPelB-Myc y *EhCP1*

Inicialmente, el plásmido (pBPelB-*EhHAP*-Myc) y el inserto (producto de *PCR EhCP1*) fueron purificados usando estuches comerciales. Posteriormente, ambos fueron digeridos con las endonucleasas BamHI y XhoI durante 2 h, utilizando el procedimiento recomendado por el proveedor (solución amortiguadora 1X de NEB2/BSA, 37 °C). 30 min antes de cumplir el tiempo de digestión, el plásmido fue defosforilado, suplementando 1 µL fosfatasa alcalina (*bcIP*). Enseguida, ambos productos de digestión fueron purificados (inserto, a partir de solución; plásmido, a partir de gel) y analizados mediante electroforesis en gel de agarosa (para verificar la integridad de los fragmentos obtenidos).

3.6.3. Ligación y obtención de pBPelB-*EhCP1*-Myc

La ligación de los productos de digestión, vector [pBPelB-Myc/BamHI-XhoI-defosforilado] e inserto [producto de *PCR EhCP1*/BamHI-XhoI], fue realizada usando el estuche comercial *Quick*TM *ligation* y siguiendo el protocolo recomendado por el proveedor. La reacción fue permitida mediante incubación a temperatura ambiente durante 5 min. El producto de la ligación fue transfectado en la cepa ER2738 de *E. coli* y varias transformantes estables fueron seleccionadas para análisis de plásmidos

(liberación de inserto). Las transformantes portadoras de plásmidos recombinantes fueron utilizadas para caracterización molecular y extracción de ADN plasmídico de alta pureza. Un plásmido con el patrón de restricción esperado fue seleccionado para secuenciación de ADN. Una vez verificada la integridad de la secuencia nucleotídica, el plásmido fue denominado pBPelB-*EhCP1*-Myc (3,942 pb).

3.7. Construcción de pBAD-PelB-*EhCP1*-Myc

3.7.1. Amplificación de la secuencia codificante para PelB-*EhCP1*-Myc

La secuencia codificante para el pro-péptido de la enzima *EhCP1* fue amplificada mediante *PCR*, usando los oligonucleótidos sintéticos T3 (5´- aat taa ccc tca cta aag gg -3´) y H3MYCR (5´- cat aag gtt tta cag atc ctc ttc aga gat gag t- 3´) como iniciadores sentido y anti-sentido, respectivamente, y el plásmido pBPelB-*EhCP1*-Myc como molde. La mezcla de reacción (0.05 mL) fue preparada conteniendo 0.2 mM de dNTPs, 20 picomoles de cada oligonucleótido, 2% de DMSO, 1-2 ng de pBPleB-*EhCP1*-Myc, y 2.5 U *Pfu* ADN-pol, en solución amortiguadora 1X para *Pfu* ADN-pol. Las condiciones de termociclado fueron: 1 ciclo de desnaturalización inicial (94 °C durante 2 min); 45 ciclos de amplificación exponencial (94°C durante 20 seg, 50 °C durante 20 seg, 72 °C durante 90 seg); 1 ciclo de extensión final (72 °C durante 7 min). Al finalizar, el producto fue mantenido a 12 °C hasta retirarlo del equipo. La amplificación fue verificada mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%.

3.7.2. Preparación de componentes para ligación: pBAD33 y PelB-*EhCP1*-Myc

Inicialmente, el plásmido (pBAD33) y el inserto (producto de *PCR* PelB-*EhCP1*-Myc) fueron purificados usando estuches comerciales. Posteriormente, ambos fueron digeridos con las endonucleasas HindIII y XbaI durante 2 h, utilizando el procedimiento recomendado por el proveedor (solución amortiguadora 1X de NEB2/BSA, 37 °C). 30 min antes de cumplir el tiempo de digestión, el plásmido fue defosforilado, suplementando 1 µL fosfatasa alcalina (*bCIP*). Enseguida, ambos productos de digestión fueron purificados, a partir de solución, y analizados mediante electroforesis en gel de agarosa (para verificar la integridad de los fragmentos obtenidos).

3.8. Análisis de la actividad proteolítica de *EhCP1*

3.8.1. Ensayo zimográfico

Las muestras analíticas fueron preparadas mezclando 1 volumen de solución de proteínas con 1 volumen de solución amortiguadora 2X para cargado en condiciones no reductoras (10% de glicerol; 2.5% de SDS; 0.002% de azul de bromofenol; 50 mM de Tris-HCl, pH 6.8). Enseguida, una alícuota

(10-15 μ L) de cada muestra fue cargada en un gel de SDS-poliacrilamida al 13.5% [Laemmli *et al.*, 1970], suplementado con gelatina al 0.1%. La separación de proteínas (en base a su talla molecular) fue realizada a 80 V (constante). Una vez concluida la separación electroforética, el gel fue tratado con una solución amortiguadora TBS-Tritón (10 mM de Tris-HCl pH 8.0; 150 mM de NaCl; 2.5% de Tritón X-100) durante 30 min, a temperatura ambiente y agitación (*rocking*). Inmediatamente, el gel fue lavado 3 veces (10 min cada vez) con una solución amortiguadora TBS (10 mM Tris-HCl, pH 8.0; 150 mM de NaCl). Enseguida, la actividad proteolítica fue activada con DTT y favorecida a 37 °C durante 12-14 h, mediante tratamiento con una solución amortiguadora TE-DTT (25 mM de Tris-HCl, pH 8.0; 2 mM de EDTA; 5mM de DTT). Finalmente, el gel fue teñido durante 4 h con una solución CBB (25% de isopropanol; 10% de ácido acético; 0.2% de azul brillante de *Coomassie* R250) y desteñido durante 12-18 h con una solución alcohol-ácido (10% de isopropanol; 10% de ácido acético).

3.8.2. Ensayo fluorogénico

Las mezclas de reacción (0.1 mL) fueron preparadas conteniendo 10-25 μ g de proteína total, 5 mM de DTT, y 5 μ M de Z-Arg-Arg-AMC (sustrato fluorogénico) en 50 mM de solución amortiguadora universal (citratos-fosfatos-tris-boratos), pH 6.5. Inicialmente, la mezcla proteína-DTT fue incubada a temperatura ambiente durante 10 min. Enseguida, el sustrato fue añadido y la fluorescencia emitida, por el grupo saliente (AMC, 7-amino-4-metilcumarina), fue verificada cada 5 min, mediante excitación con lámpara UV, durante un periodo de 30 min. Al finalizar, la emisión total fue registrada mediante fotodocumentación.

3.8.3. Ensayo cromogénico

Las mezclas de reacción (0.1 mL) fueron preparadas conteniendo 50 μ g de proteína total, 2.5 mM de DTT, y 0.1 mM de Z-Arg-Arg-pNA (sustrato cromogénico) en 50 mM de solución amortiguadora universal, pH 6.5. Inicialmente, la mezcla proteína-DTT fue incubada a 37 °C durante 15 min. Enseguida, el sustrato fue añadido y se mantuvo a 37 °C durante 120 min. El color generado por el grupo saliente (pNA, p-nitroanilina) fue registrado mediante absorbancia a 415 nm (A_{415}) a los 0, 15, 30, 60, y 120 min.

3.9. Tratamiento de datos y análisis estadístico

Todos los experimentos fueron reproducidos al menos tres veces. Los datos o resultados que mostraron evidencias de un sesgo no asociado a la hipótesis; p. ej. error experimental, técnico, o humano, fueron eliminados sin consideración alguna. Los resultados de cada experimento fueron expresados como media \pm error estándar y su significancia fue analizada mediante ANOVA y, de ser necesario, con

una prueba t. La significancia estadística fue considerada cuando $p < 0.05$. Todos los análisis estadísticos fueron realizados utilizando el paquete computacional *GraphPad™ Prism®* v 4.0.

3.10. Bioservidores y biocómputo

El servidor del Centro Nacional de Información en Biotecnología (*NCBI*, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) de los Estados Unidos de Norteamérica fue consultado periódicamente para el análisis de secuencias nucleotídicas y polipeptídicas deducidas. Adicionalmente, algunos análisis proteómicos fueron realizados usando los bioservidores del portal de recursos bioinformáticos *ExpASY* (<https://www.expasy.org>). Los plásmidos fueron construidos *in-silico* usando los paquetes computacionales del dominio público *Serial Cloner* (<http://serialbasics.free.fr>) y *SnapGene® Viewer* (<http://www.snapgene.com>).

4. RESULTADOS Y DISCUSIONES

En consideración a la premisa que infiere una dependencia de las proteínas secretadas al plegamiento oxidativo correcto, dentro de un ambiente redox apropiado, se propuso expresar la enzima *EhCP1* en el periplasma de la bacteria *E. coli*, ya que ese compartimiento hospeda una maquinaria celular que asiste al plegamiento y exhibe un estado redox altamente oxidante.

4.1. Obtención de pBPelB-*EhCP1*-Myc

Inicialmente, se propuso construir un plásmido que favoreciera la expresión de *EhCP1* y su translocación hacia el periplasma bacteriano y, además, que permitiera la verificación de su localización subcelular. Para esto, se utilizó la secuencia señal de la proteína bacteriana PelB (Pectato liasa B de *Erwinia carotovora*), la cual ha sido ampliamente utilizada en *E. coli* (ya que dirige proteínas hacia el periplasma vía *Sec* y *SRP*), y la secuencia del epítipo Myc, que ha funcionado exitosamente como etiqueta molecular. Con ese objetivo, se diseñó el plásmido pBPelB-*EhCP1*-Myc (Figura 4-1).

La secuencia codificante para el péptido *EhCP1* fue amplificada usando dos oligonucleótidos sintéticos como iniciadores y el plásmido pQ*EhCP1* como molde. Para asegurar la fidelidad de la replicación molecular, se utilizó la enzima *Pfu* ADN-pol. Como se observa en la Figura 4-2, un producto de aprox. 1,000 pb fue amplificado, concordante con el peso molecular esperado (921 pb), indicativo de una reacción exitosa. Posteriormente, el producto de *PCR EhCP1* y el plásmido pBPelB-*EhHAP*-Myc fueron digeridos y ligados. En esta punto, cabe destacar tres aspectos clave la estrategia de clonación molecular: (1) El producto de *PCR* incorporó las secuencias de reconocimiento para las endonucleasas BamHI y XhoI, cada una flanqueando un extremo de la secuencia *EhCP1*; (2) el plásmido contiene como relleno (*stuffer*) a la secuencia codificante para la proteína HAP de amiba (*EhHAP*), la cual puede removerse mediante restricción con

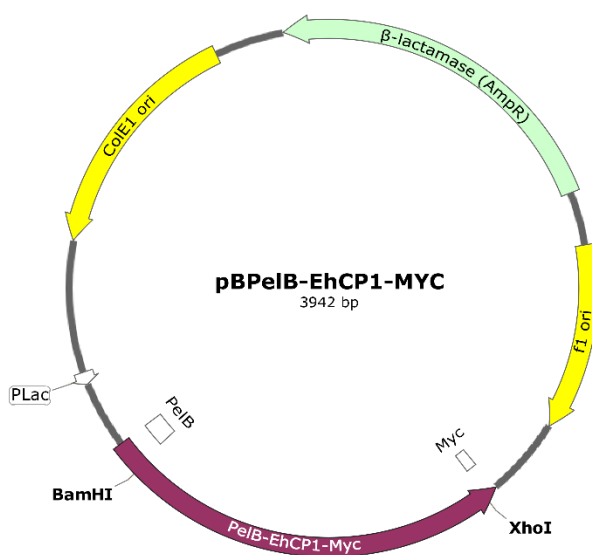


Figura 4-1. Representación esquemática del plásmido pBPelB-*EhCP1*-Myc.

las endonucleasas BamHI y XhoI; y (3) la ligación de los fragmentos de digestión permite la inserción de *EhCP1* en fase, con respecto a las secuencias PelB y Myc, y direccional, en relación al promotor PLac. Enseguida, el producto de la ligación fue transfectado en la cepa ER2738 de *E. coli* y las células transformantes estables fueron seleccionadas por su habilidad de crecer en presencia de ampicilina. Como escrutinio preliminar, 10 unidades formadoras de colonia (ufc) fueron proliferadas en medio con antibiótico y analizadas mediante *PCR* de cultivo (para identificar ufc portadoras de plásmidos recombinantes). Los resultados indicaron que sólo 4 ufc hospedaban el plásmido de interés, ya que rindieron un producto del tamaño esperado (datos no mostrados). A partir de cultivos independientes, se purificó el plásmido de las 4 ufc (clonas supuestamente positivas), el cual fue analizado mediante un ensayo de restricción endonucleolítica con las enzimas BamHI y XhoI (liberación de inserto). Como se muestra en la Figura 4-3, sólo las clonas identificadas como 4 y 7 mostraron los productos de digestión esperados: uno correspondiente al inserto (912 pb) y otro al plásmido (3,030 pb). La autenticidad del fragmento clonado (clona C4) y la inserción apropiada fueron verificados mediante secuenciación automática de ADN. La Figura 4-1 despliega una representación esquemática del plásmido pBPelB-*EhCP1*-Myc (3,942 pb).

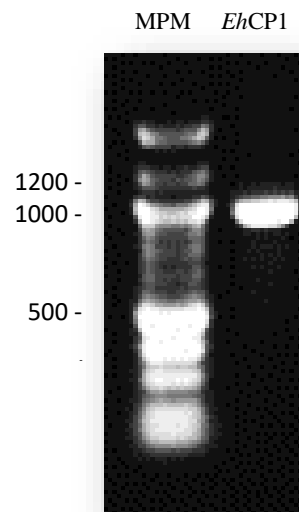


Figura 4-2. Análisis del producto de *PCR EhCP1*.

Gel de agarosa al 1%, teñido con BrEt. MPM: Marcador de peso molecular *Ladder 100-bp*. PM en pares de bases.

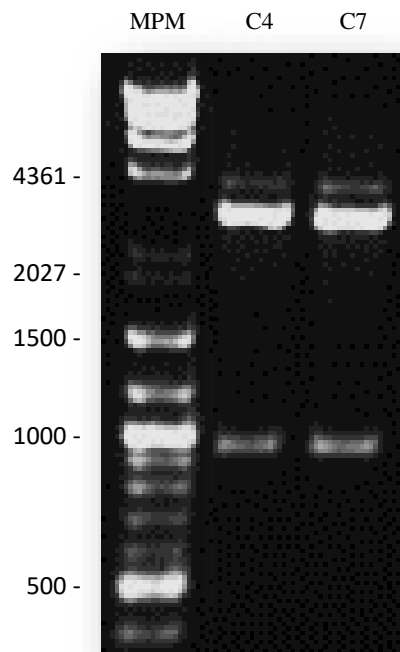


Figura 4-3. Análisis molecular del plásmido pBPelB-*EhCP1*-Myc.

Digestión de las clonas C4 y C7 con las endonucleasas BamHI y XhoI. Gel de agarosa al 1% teñido con BrEt. MPM: Marcadores de peso molecular (*Ladder 100-bp* y λ DNA-HindIII). PM en pares de bases.

4.2. Obtención de pBAD-PelB-EhCP1-Myc

Como siguiente fase, se propuso construir un plásmido que permitiera una regulación más estricta de la expresión de la fusión PelB-EhCP1-Myc y soportara la co-expresión episomal de otras proteínas. Para esto, se preparó el plásmido pBAD-PelB-EhCP1-Myc (Figura 4-4).

La secuencia codificante para la fusión PelB-EhCP1-Myc fue amplificada usando dos oligonucleótidos sintéticos como iniciadores y el plásmido pBPelB-EhCP1-Myc como molde. La enzima *Pfu* DNA-pol fue utilizada para favorecer la fidelidad de la replicación molecular. Como se observa en la Figura 4-5, un producto cercano a 1,200 pb fue amplificado, concordante con el peso molecular esperado (1,117 pb), indicativo de una reacción exitosa. Enseguida, el producto de *PCR* PelBEhCP1-Myc y el plásmido pBAD33 fueron digeridos y ligados. Cabe destacar tres aspectos clave la estrategia de clonación molecular: (1) El producto de *PCR* incluyó las secuencias de reconocimiento para las endonucleasas HindIII y XbaI, cada una flanqueando un extremo de la secuencia PelB-EhCP1-Myc; (2) el plásmido contiene un sitio de clonación múltiple que comprende los sitios de reconocimiento para HindIII y XbaI; y (3) la ligación de los fragmentos de digestión permite la inserción direccional de PelB-EhCP1-Myc, con respecto al promotor PBAD. Además, pBAD33 porta el gen CAT,

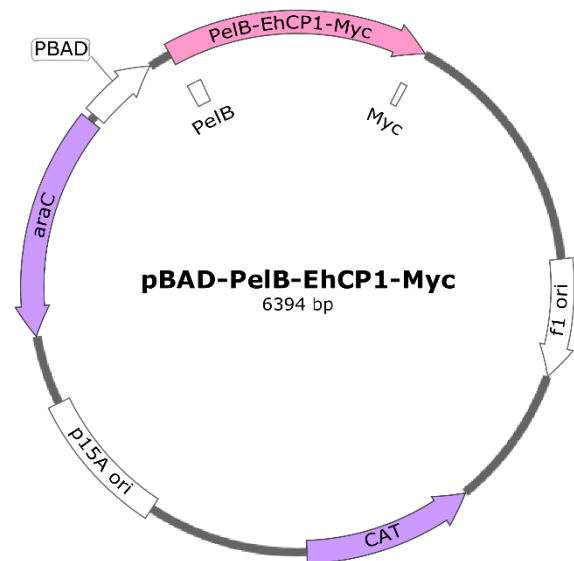


Figura 4-4. Representación esquemática del plásmido pBAD-BPelB-EhCP1-Myc.

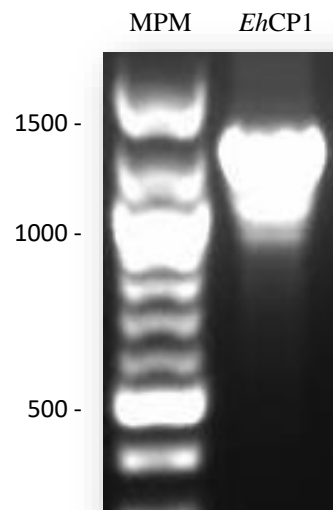


Figura 4-5. Análisis del producto de amplificación (*PCR*) de la fusión PelB-EhCP1-Myc.

Electroforesis en gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio. MPM: Marcador de peso molecular *Ladder 100-bp*. PM en pares de bases.

el cual confiere resistencia a cloramfenicol, y el origen de replicación p15A, que es compatible con el origen ColE1 (presente en plásmidos derivados de pUC). Posteriormente, el producto de la ligación fue transfectedo en la cepa ER2738 de *E. coli* y las células transformantes estables fueron seleccionadas por su habilidad de proliferar en presencia de cloramfenicol. Como escrutinio preliminar, 10 ufc fueron crecidas en medio con antibiótico y analizadas mediante *PCR* de cultivo (para identificar ufc portadoras de plásmidos recombinantes). Los resultados mostraron 9 ufc hospedaban el plásmido de interés, ya que rindieron un producto del tamaño esperado (datos no mostrados). A partir de cultivos independientes, se purificó el plásmido de 3 ufc (clonas supuestamente positivas), el cual fue analizado mediante un ensayo de restricción endonucleolítica con las enzimas HindIII y XbaI (liberación de inserto). Como se observa en la Figura 4-6, las clonas analizadas (denotadas como clona-1 a -3) mostraron los productos digestión esperados: uno correspondiente al inserto (1,062 pb) y otro al plásmido (5,332 pb). La autenticidad del fragmento clonado (clona-1) y la inserción apropiada fueron verificados mediante secuenciación automática de ADN. La Figura 4-4 muestra una representación esquemática del plásmido pBAD-PelB-*EhCP1*-Myc (6,394 pb).

4.3. *EhCP1* se expresa activamente en el periplasma de *E. coli*

Una vez obtenida y comprobada la construcción pBAD-PelB-*EhCP1*-Myc, se procedió a transformar las cepas de *E. coli* BW25113 (silvestre: *dsbA*⁺ *dsbC*⁺), MRB10 (Δ DsbA: *dsbA*⁻ *dsbC*⁺), y

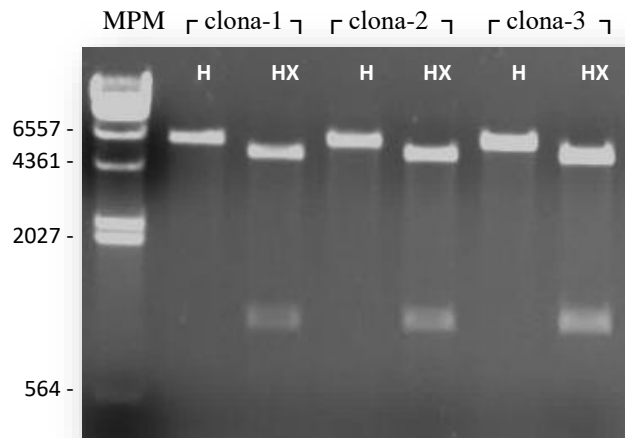


Figura 4-6. Análisis del producto de pBAD-BPelB-*EhCP1*-Myc digerido con XbaI y HindIII.

Electroforesis en gel de agarosa al 1% teñido con BrET. MPM: λ DNA-HindIII. PM en pares de bases. Digestión con las endonucleasas HindIII (H) o HindIII-XbaI (HX).

MRB20 ($\Delta dsbC$: $dsbA^+ dsbC^-$) para analizar su expresión y actividad. Además, BW25113 fue transformada con el plásmido pBAD33, que fue utilizada como control negativo. Todos los ensayos partieron de pastillas bacterianas obtenidas mediante el siguiente protocolo de cultivo (estándar): 3 h de pre-inducción, inducción con 0.2% de arabinosa, y 4 h de sobre-expresión (todo el tiempo a 37 °C y 300 rpm).

Como ensayo inicial, se analizó la expresión de *EhCP1* en la cepa silvestre, con el fin de corroborar las condiciones experimentales y verificar el grado de sobre-expresión. Los lisados bacterianos totales fueron preparados en condiciones reductoras-desnaturalizantes y separados mediante electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida. Como se indica en la Figura 4-7, una banda del tamaño esperado (35 kDa) fue observada sólo en el carril correspondiente al cultivo que porta el plásmido pBAD-PelB-*EhCP1*-Myc (e inducido), lo que sugiere una sobre-expresión específica de la proteína *EhCP1*. Lo anterior fue ratificado mediante ensayos de inmuno-reconocimiento con anticuerpos anti-*EhCP1* (específicos) y anti-Myc (anti-etiqueta), como se puede observar en la Figura 4-8.

Adicionalmente, para comprobar la expresión periplásmica, se realizó un ensayo de fraccionamiento subcelular usando un protocolo estándar de permeabilización de la membrana externa con el detergente Tritón X-100. Desafortunadamente, la escala de cultivo no fue suficiente para obtener fracciones proteicas evidentes con azul brillante de *Coomassie* (datos no mostrados). Por tal motivo, se realizó el análisis de localización

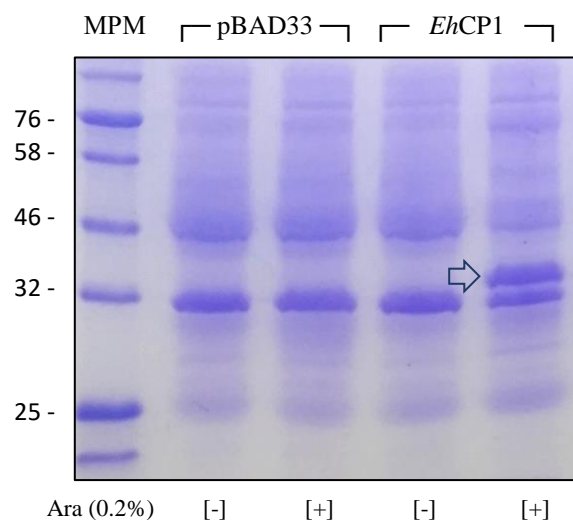


Figura 4-7. Análisis de expresión de la proteína *EhCP1* en la cepa *E. coli* BW25113.

Gel de SDS-poliacrilamida al 15% teñido con azul brillante de *Coomassie*. MPM: *Blue Protein Standard, Broad Range, 11-190 kDa*. Ara: arabinosa. *EhCP1*: pBAD-PelB-*EhCP1*-Myc.

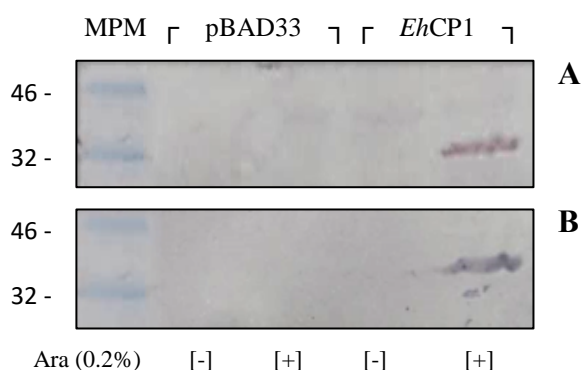


Figura 4-8. Inmuno-reconocimiento de la proteína *EhCP1* expresada en la cepa *E. coli* BW25113.

Detección de *EhCP1* mediante reconocimiento con anticuerpos. A: policlonal anti *EhCP1*. B: monoclonal anti Myc. Electro-transferencia de lisados proteicos bacterianos totales (como en la Figura 4-7).

subcelular mediante un ensayo zimográfico (usando gelatina como sustrato). En consideración a que no se tenía evidencia de que *EhCP1* fuera proteolíticamente activa, en las condiciones ensayadas (hasta esa etapa del estudio), se preparó un lisado total en condiciones nativas (usando el reactivo *CellLytic*TM B como agente de extracción). Como se indica en la Figura 4-9, una zona de degradación proteolítica fue observada en el rango de 25-32 kDa, concordante con el tamaño esperado para la enzima madura (27 kDa). Interessantemente, esta actividad fue obtenida tanto en el lisado total como en ambas fracciones subcelulares, lo que sugiere que *EhCP1* se expresa activamente y se localiza, como destino intracelular, en el periplasma.

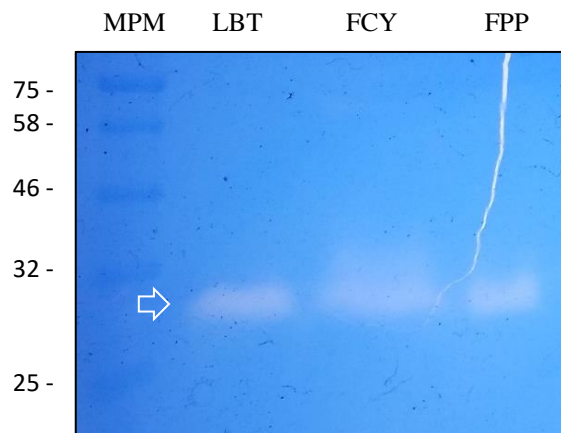


Figura 4-9. Análisis zimográfico de la actividad y localización subcelular de la proteína *EhCP1* expresada en la cepa *E. coli* BW25113.

Gel de SDS-poliacrilamida al 15%, suplementado con gelatina (0.1%), teñido con azul brillante de *Coomassie*. MPM: *Blue Protein Standard, Broad Range, 11-190 kDa*. Fracciones subcelulares: LBT, lisado bacteriano total; FCY, fracción citosólica; FPP: fracción periplásmica.

4.4. La actividad de *EhCP1* depende de un plegamiento oxidativo correcto

Teniendo como antecedente los ensayos previos, se procedió a analizar la expresión de *EhCP1* en las cepas de *E. coli* MRB10 y MRB20, con el fin de evaluar su dependencia a un plegamiento oxidativo dependiente de DsbA o DsbC. Los lisados totales y la separación proteica fueron realizados usando los procedimientos antes mencionados. Como se señala en la Figura 4-10, la proteína correspondiente a *EhCP1* fue sobre-expresada solamente en los tres cultivos que portan el plásmido pBAD-PelB-*EhCP1*-Myc; sin embargo, como es evidente, el nivel

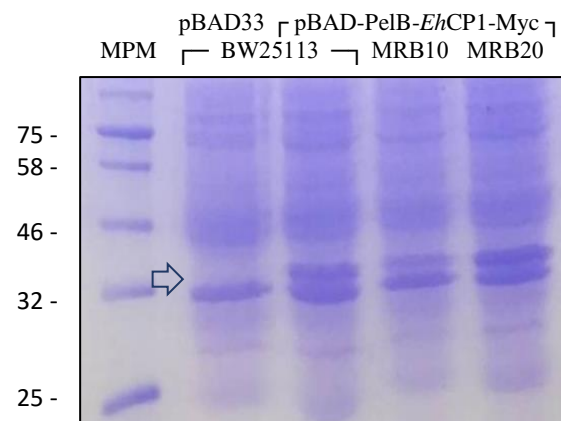


Figura 4-10. Nivel de expresión de *EhCP1* en un ambiente oxidativo asistido por DsbA o DsbC.

Gel de SDS-poliacrilamida al 15% teñido con azul brillante de *Coomassie*. MPM: *Blue Protein Standard, Broad Range, 11-190 kDa*. Lisados preparados como en la Figura 4-7.

de expresión difiere ligeramente entre ellas; específicamente, en el cultivo de la cepa MRB10 (Δ DsbA). Cabe mencionar que esta cepa es de crecimiento lento (dato no mostrado) y las condiciones ensayadas fueron semi-cuantitativas; por lo tanto, ese resultado era predecible. Ante esto, es recomendable realizar los ensayos futuros normalizando el número de células a un valor constante (p. ej. 0.1 UDO₆₀₀).

Independiente a las consideraciones antes mencionadas, se procedió a comprobar la actividad proteolítica de la proteína *EhCP1* en el periplasma de cepas con deficiencias en la maquinaria molecular de asistencia al plegamiento oxidativo. Es decir, en ausencia de DsbA (oxidasa) o DsbC (reductasa e isomerasa). Para este fin, un ensayo zimográfico fue realizado usando lisados proteicos totales obtenidos en condiciones nativas. Como se muestra en la Figura 4-11, la mayor actividad proteolítica se observó en la cepa silvestre (BW25113) y en la mutante Δ DsbC (MRB20), y una actividad mínima en la mutante Δ DsbA (MRB10), cabe destacar que la concentración de proteína no fue estandarizada para este ensayo lo que pudo causar la gran diferencia de degradación entre las cepas utilizadas. Interesantemente, este resultado confirma que la enzima *EhCP1* depende (estructuralmente) de un plegamiento oxidativo asistido por disulfuro oxidorreductasas, lo que a su vez condiciona (funcionalmente) su actividad catalítica. Sin embargo, la dependencia específica a una plegasa (oxidasa o reductasa-isomerasa) todavía no estaba claramente definida.

4.5. Aparentemente, *EhCP1* depende de la actividad oxidorreductasa de DsbC

Para precisar la dependencia de la proteína *EhCP1* a un plegamiento oxidativo asistido por una plegasa con actividad disulfuro oxidorreductasa específica, se realizó un micro-ensayo cuantitativo de actividad proteasa usando el péptido sintético Z-Arg-Arg-pNA como sustrato cromogénico. En consideración a que la actividad catalítica de *EhCP1* exhibe una mayor preferencia por sustratos con residuos de arginina en la posición 2, la función enzimática puede ser valorada mediante la cuantificación de la p-nitroanilina (pNA) liberada, la cual es detectable mediante espectrofotometría a una absorbancia de 415 nm (A_{415}). Para este análisis, los extractos totales preparados en condiciones nativas fueron

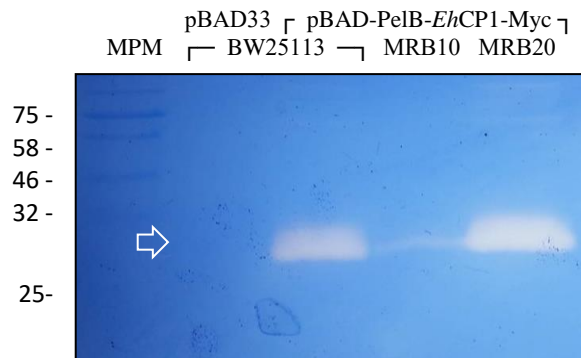


Figura 4-11. Dependencia de la expresión funcional de *EhCP1* a un plegamiento oxidativo asistido por DsbA o DsbC.

Gel de SDS-poliacrilamida al 15% teñido con azul brillante de Coomassie. MPM: Blue Protein Standard, Broad Range, 11-190 kDa. Lisados preparados como en la Figura 4-9.

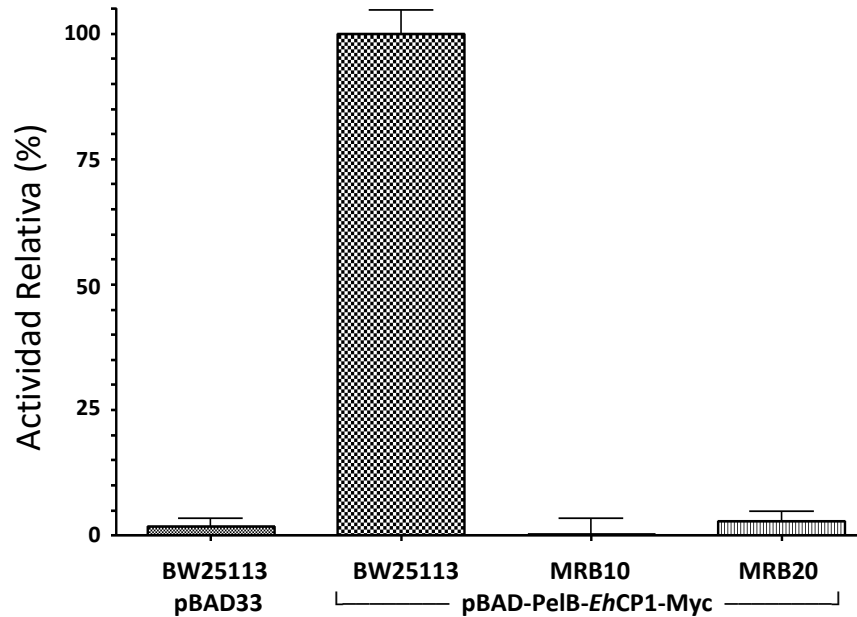


Figura 4.12. Actividad proteasa relativa de la enzima *EhCP1* expresada en diferentes condiciones de repliegamiento oxidativo *in-vivo*.

Resultados de un ensayo de degradación proteolítica de un sustrato cromogénico, Z-Arg-Arg-pNA, utilizando los extractos totales de las cepas BW25113/pBAD33, BW25113/*EhCP1*⁺, MRB10/*EhCP1*⁺, y MRB20/*EhCP1*⁺ como fuente de actividad proteasa.

cuantificados (mediante un ensayo de *Bradford*) y verificados (mediante un ensayo fluorogénico cualitativo). La actividad proteasa fue valorada considerando el incremento de A_{415} por hora de hidrólisis por mg de proteína total ($\Delta A_{415} \text{ h}^{-1} \text{ mg}^{-1}$). Para fines ilustrativos, estos valores fueron normalizados considerando a la actividad proteasa del extracto de la cepa BW25113/pBAD-PelB-*EhCP1*-Myc como máxima (100%). Sorpresivamente, ninguno de los extractos de las cepas mutantes (ΔDsbA o ΔDsbC) mostró actividad proteasa significativa ($p < 0.001$), como se distingue en la Figura 4-12, lo que confirma los resultados previamente descritos (esto es, *EhCP1* depende de un plegamiento oxidativo correcto).

A la luz del resultado obtenido, es posible suponer que: (1) las condiciones en el periplasma de la mutante MRB10 (ΔDsbA) condicionan una concentración limitada de *EhCP1* correctamente oxidada en un ambiente con una actividad correctora sobrada, y (2) las condiciones en el periplasma de la mutante MRB20 (ΔDsbC) promueven una alta concentración de *EhCP1* incorrectamente oxidada en un ambiente con una actividad correctora deficiente. Ambas consideraciones explican de manera transversal la baja actividad proteolítica detectada.

Por otro lado, considerando que: (1) la estructura nativa de *EhCP1* infiere la formación de dos enlaces disulfuro no consecutivos, y (2) la actividad de DsbA está limitada a enlaces disulfuro consecutivos, es factible suponer que la estructura y la función de la enzima *EhCP1* dependen de un correcto plegamiento oxidativo asistido por una plegasa con actividad disulfuro reductasa-isomerasa (p.ej. DsbC) y la participación acoplada de una disulfuro oxidasa (p.ej. DsbA).

Finalmente, para demostrar la hipótesis anterior, se sugiere lo siguiente: (1) determinar el estado redox *in-vivo* de la proteína *EhCP1*, mediante ensayos de modificación química de grupos tiol libres, y (2) establecer el papel funcional de las oxidorreductasas bacterianas sobre la actividad proteolítica de *EhCP1*, mediante ensayos de complementación homóloga y análisis del fenotipo resultante. Además, con el fin de integrar la relación enzima-sustrato, se aconseja analizar el papel funcional de la plegasa *EhPDI* sobre la estructura y función de *EhCP1*, utilizando como plataforma celular el periplasma bacteriano (*E. coli*).

5. CONCLUSIONES

El plásmido pBPelB-*EhCP1*-Myc, que porta la secuencia codificante para el pro-péptido *EhCP1* fusionado en fase con la secuencia señal PelB (en el N-terminal) y la etiqueta molecular C-Myc (en el C-terminal), fue obtenido satisfactoriamente mediante una estrategia de sub-clonación molecular por sustitución usando el plásmido pBPelB-*EhHAP*-Myc como parental. Cabe mencionar que este vector brinda tres ventajas funcionales de utilidad para futuros proyectos: (1) control relajado de la expresión mediante la adición de IPTG (análogo de lactosa); (2) origen de replicación ColE1, compatible con plásmidos que portan el origen de replicación p15A (p.ej., pBAD y pACYC); y (3) resistencia a ampicilina, que permite doble o triple selección en conjunto con otros antibióticos (p.ej., cloramfenicol, kanamicina, o tetraciclina).

El plásmido pBAD-PelB-*EhCP1*-Myc, que contiene la secuencia codificante para la fusión PelB-*EhCP1*-Myc bajo en control del promotor de arabinosa (PBAD), fue obtenido favorablemente mediante una estrategia de sub-clonación molecular por inserción usando el plásmido pBAD33 como parental. Es importante destacar que este vector ofrece tres ventajas importantes a nivel funcional para futuros proyectos: (1) control estricto de la expresión mediante la adición de arabinosa; (2) origen de replicación p15A, compatible con plásmidos que portan el origen de replicación ColE1 (p.ej., pBS, pET, pGEX, pMAL, y pUC); y (3) resistencia a cloramfenicol, que permite doble o triple selección en conjunto con otros antibióticos (p.ej., ampicilina, kanamicina, o tetraciclina).

La función de la enzima *EhCP1* depende tanto de un medio ambiente altamente oxidante (p.ej., el periplasma bacteriano), como de una eficiente maquinaria de plegamiento oxidativo de proteínas (p.ej., la familia de oxidorreductasas bacterianas Dsb), que favorezcan una estructura terciaria con enlaces disulfuro correctamente oxidados. Además, aparentemente, la conformación funcional depende específicamente de la asistencia de una plegasa con actividad reductasa-isomerasa, como la DsbC bacteriana, que catalice el rearrreglo de enlaces disulfuro incorrectamente formados por la acción primaria de una plegasa con actividad oxidasa, como la DsbA bacteriana.

6. BIBLIOGRAFIA

- Agashe, V.R., Guha, S., Chang, H.C., et al. (2004). Function of trigger factor and DnaK in multidomain protein folding: increase in yield at the expense of folding speed. *Cell*, 117(2), 199-209.
- Atkinson, H.J., Babbitt, P.C., & Sajid, M. (2009). The global cysteine peptidase landscape in parasites. *Trends in Parasitology*, 25(12), 573-581.
- Baruch, W.L.A. (2013). *Parasitología Humana*. México: McGraw-Hill.
- Becerril, M.A., Pérez, H.L. & Salas, A. (2014). Amibiasis. En Flores M.A. (Ed). *Parasitología Médica*. McGraw-Hill/Interamericana,
- Berkmen, M., Boyd, D., & Beckwith, J. (2005). The nonconsecutive disulfide bond of *Escherichia coli* phytase (AppA) renders it dependent on the protein-disulfide isomerase, DsbC. *Journal of Biological Chemistry*, 280(12), 11387-11394.
- Bracha, R., Nuchamowitz, Y., & Mirelman, D. (2002). Amoebapore is an important virulence factor of *Entamoeba histolytica*. *Journal of Biosciences*, 27(6), 579-587.
- Brik, A., & Wong, C.H. (2003). HIV-1 protease: mechanism and drug discovery. *Organic & Biomolecular Chemistry*, 1(1), 5-14.
- Cerdà-Costa, N., & Gomis-Rüth, F.X. (2013). Architecture and function of metallopeptidase catalytic domains. *Protein Science*, 23(2), 123-144.
- Coombs, G.H., Goldberg, D.E., Klemba, M., et al. (2001). Aspartic proteases of *Plasmodium falciparum* and other parasitic protozoa as drug targets. *Trends in Parasitology*, 17(11), 532-537.
- Feige, M. J., & Hendershot, L. M. (2011). Disulfide bonds in ER protein folding and homeostasis. *Current Opinion in Cell Biology*, 23(2), 167-175.
- Fujinaga, M., Cherney, M.M., Oyama, H., et al. (2004). The molecular structure and catalytic mechanism of a novel carboxyl peptidase from *Scytalidium lignicolum*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(10), 3364-3369.
- Gupta, D., & Tuteja, N. (2011). Chaperones and foldases in endoplasmic reticulum stress signaling in plants. *Plant Signaling & Behavior*, 6(2), 232-236.
- Guzman, L.M., Belin, D., Carson, M.J., & Beckwith, J.O. N. (1995). Tight regulation, modulation, and high-level expression by vectors containing the arabinose PBAD promoter. *Journal of Bacteriology*, 177(14), 4121-4130.
- Hartl, F.U. (1996). Molecular chaperones in cellular protein folding. *Nature*, 381(6583), 571.
- Hartley, B.S. (1960). Proteolytic enzymes. *Annual Review of Biochemistry*, 29(1), 45-72.
- He, C., Nora, G.P., Schneider, E.L., et al. (2010). A novel *Entamoeba histolytica* cysteine proteinase, EhCP4, is key for invasive amebiasis and a therapeutic target. *Journal of Biological Chemistry*, 285(24), 18516-18527.
- Jacobsen, W., Christians, U., & Benet, L.Z. (2000). *In vitro* evaluation of the disposition of a novel cysteine protease inhibitor. *Drug Metabolism and Disposition*, 28(11), 1343-1351.
- Ke, N., & Berkmen, M. (2014). Production of disulfide-bonded proteins in *Escherichia coli*. *Current Protocols in Molecular Biology*, 16.1B.1-16.1B.21.
- Khan, A.R., & James, M.N. (1998). Molecular mechanisms for the conversion of zymogens to active proteolytic enzymes. *Protein Science*, 7(4), 815-836.
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259), 680-685.
- Leippe, M. (1997). Amoebapores. *Parasitology Today*, 13(5), 178-183.
- Mares, R.E., Magaña, P.D., Meléndez-López, S.G., et al. (2009). Oxidative folding and reductive activities of EhPDI, a protein disulfide isomerase from *Entamoeba histolytica*. *Parasitology International*, 58(3), 311-313.
- Mares, R.E., Minchaca, A.Z., Villagrana, S., et al. (2015). Analysis of the isomerase and chaperone-like activities of an amebic PDI (EhPDI). *BioMed Research International*, 2015, 1-8.
- McKerrow, J.H., Sun, E., Rosenthal, P.J., & Bouvier, J. (1993). The proteases and pathogenicity of parasitic protozoa. *Annual Reviews in Microbiology*, 47(1), 821-853.
- Meléndez-López, S.G., Herdman, S., Hirata, K., et al. (2007). Use of recombinant *Entamoeba histolytica* cysteine proteinase 1 to identify a potent inhibitor of amebic invasion in a human colonic model. *Eukaryotic Cell*, 6(7), 1130-1136.
- Mittl, P.R., & Grütter, M.G. (2006). Opportunities for structure-based design of protease-directed drugs. *Current Opinion in Structural Biology*, 16(6), 769-775.

- Miyoshi, S.I., & Shinoda, S. (2000). Microbial metalloproteases and pathogenesis. *Microbes and Infection*, 2(1), 91-98.
- Muñoz, P.L., Minchaca, A.Z., Mares, R.E., & Ramos, M.A. (2016). Activity, stability and folding analysis of the chitinase from *Entamoeba histolytica*. *Parasitology International*, 65(1), 70-77.
- Muñoz, P.L.A., Minchaca A.Z., Mares R.E., & Ramos M.A. (2015). Protein folding and molecular chaperones of protozoa. En Wyatt J. (Ed) *New Research on Molecular Chaperones*. Nova Science.
- Neitzel, J.J. (2010). Enzyme catalysis: the serine proteases. *Nature Education*, 3(9), 21.
- Nelson, D.L., & Cox, M.M. (2007). *Lehninger: Principios de Bioquímica*. Omega.
- Pacheco-Yepez, J., Jarillo-Luna, R.A., Gutierrez-Meza, M., et al. (2014). Peroxynitrite and peroxiredoxin in the pathogenesis of experimental amebic liver abscess. *BioMed Research International*, 2014, 1-17.
- Petri, W.A., Chapman, M.D., Snodgrass, T., et al. (1989). Subunit structure of the galactose and N-acetyl-D-galactosamine-inhibitable adherence lectin of *Entamoeba histolytica*. *Journal of Biological Chemistry*, 264(5), 3007-3012.
- Petri Jr, W.A., Haque, R., & Mann, B.J. (2002). The bittersweet interface of parasite and host: lectin-carbohydrate interactions during human invasion by the parasite *Entamoeba histolytica*. *Annual Reviews in Microbiology*, 56(1), 39-64.
- Potempa, J., & Pike, R.N. (2005). Bacterial peptidases. In *Concepts in Bacterial Virulence*, 12, 132-180. Karger Publishers.
- Ralston, K.S., & Petri, W.A. (2011). The ways of a killer: How does *Entamoeba histolytica* elicit host cell death? *Essays in Biochemistry*, 51, 193-210.
- Ramos, M.A., Sanchez-Lopez, R., Mares, R.E., et al. (2005). Identification of an *Entamoeba histolytica* gene encoding a protein disulfide isomerase that functionally complements the *dsbA* mutation in *Escherichia coli*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 143(2), 236-240.
- Ramos, M.A., Mares, R.E., Magaña, P.D., et al. (2008). *In silico* identification of the protein disulfide isomerase family from a protozoan parasite. *Computational Biology and Chemistry*, 32(1), 67-71.
- Ramos, M.A., Mares, R.E., Magaña, P.D., et al. (2011). *Entamoeba histolytica*: biochemical characterization of a protein disulfide isomerase. *Experimental Parasitology*, 128(1), 76-81.
- Ren, G., & Bardwell, J.C. (2011). Engineered pathways for correct disulfide bond oxidation. *Antioxidants & Redox Signaling*, 14(12), 2399-2412.
- Rizzitello, A.E., Harper, J.R., & Silhavy, T.J. (2001). Genetic evidence for parallel pathways of chaperone activity in the periplasm of *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 183(23), 6794-6800.
- Robinson, M.W., & Dalton, J.P. (Eds.). (2011). *Cysteine proteases of pathogenic organisms* (Vol. 712). Springer Science & Business Media.
- Rojas, L., Morán, P., Valadez, A., et al. (2016). *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* infection in Mexican school children: genotyping and phylogenetic relationship. *BMC Infectious Diseases*, 16(1), 485.
- Sajid, M., & McKerrow, J.H. (2002). Cysteine proteases of parasitic organisms. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 120(1), 1-21.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., & Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Schreiner, B., Westerburg, H., Forné, I., et al. (2012). Role of the AAA protease Yme1 in folding of proteins in the intermembrane space of mitochondria. *Molecular Biology of the Cell*, 23(22), 4335-4346.
- Seemuller, E., Lupas, A., Stock, D., & Lowe, J. (1995). Proteasome from *Thermoplasma acidophilum*: a threonine protease. *Science*, 268(5210), 579.
- Serrano-Luna, J., Piña-Vázquez, C., Reyes-López, M., et al. (2013). Proteases from *Entamoeba spp.* and pathogenic free-living amoebae as virulence factors. *Journal of Tropical Medicine*, 2013, 1-32.
- Sibley, L.D. (2013). The roles of intramembrane proteases in protozoan parasites. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1828(12), 2908-2915.
- Singh, M., Shah, V., & Tatu, U. (2014). A novel C-terminal homologue of Aha1 co-chaperone binds to heat shock protein 90 and stimulates its ATPase activity in *Entamoeba histolytica*. *Journal of Molecular Biology*, 426(8), 1786-1798.
- Smith, D.F., Whitesell, L., & Katsanis, E. (1998). Molecular chaperones: biology and prospects for pharmacological intervention. *Pharmacological Reviews*, 50(4), 493-514.
- SUIVE/DGE, Secretaría de Salud, Estados Unidos Mexicanos (2015). Incidencia de amebiasis intestinal (A06.0-A06.3, A06.9) por grupos de edad Estados Unidos Mexicanos 2015.
- SUIVE/DGE, Secretaría de Salud, Estados Unidos Mexicanos (2015). Veinte principales causas de

- enfermedad Nacional, por grupos de edad. Estados Unidos Mexicanos 2015.
- Ta, Jasmine. (2012). *EhCP1 and EhCP5: key released cysteine proteinases of Entamoeba histolytica as drug targets*. UC San Diego: Biology. b7349446. Retrieved from: <http://escholarship.org/uc/item/39z8x7pn>.
- Wilson, I.W., Weedall, G.D., & Hall, N. (2012). Host-Parasite interactions in *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar*: what have we learned from their genomes? *Parasite Immunology*, 34(2-3), 90-99.
- Wiser, M. (2010). *Entamoeba and amebiasis*. Protozoa and Human Disease. Garland Science.
- World Health Organization (WHO). (1997). A consultation with experts on amoebiasis. *Epidemiological Bulletin*, 18, 13-14.
- Ximénez, C., Morán, P., Ramos, F., & Ramiro, M. (2007). Amibiasis intestinal: estado actual del conocimiento. *Medicina Interna de México*, 23(5), 398-407.
- Yerbury, J.J., Stewart, E.M., Wyatt, A.R., & Wilson, M.R. (2005). Quality control of protein folding in extracellular space. *EMBO Reports*, 6(12), 1131-1136.
- Zhai, Y., & Saier, M.H. (2000). The amoebapore superfamily. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Biomembranes*, 1469(2), 87-99.