

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE BAJA CALIFORNIA Facultad de Ciencias Químicas e Ingeniería Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias e Ingeniería

La enzima PDI de *Entamoeba histolytica* (*Eh*PDI) es capaz de complementar la mutante de *Saccharomyces cerevisiae* ΔPDI1 y rescatar el fenotipo letal

TESIS QUE PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTOR EN CIENCIAS PRESENTA

M. EN C. ROSA ELENA MARES ALEJANDRE

Tijuana, B. C.

Diciembre de 2009.

El presente trabajo de investigación fue realizado en el

LABORATORIO DE BIOTECNOLOGIA

de la Facultad de Ciencias Químicas e Ingeniería, UABC.

Bajo la Dirección del

DR. JOSE MANUEL CORNEJO BRAVO

Bajo la Tutoría del

DR. MARCO ANTONIO RAMOS IBARRA

Para la realización de este trabajo se obtuvo financiamiento de la

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE BAJA CALIFORNIA

(10ª Convocatoria Interna de Apoyo a Proyectos de Investigación) y del

CONSEJO NACIONAL DE CIENCIA Y TECNOLOGIA

(SEP-CONACYT 2004 para Ciencia Básica Proyecto 47554)

Agradecimientos

Contenido

Agradecimientos	3
Contenido	4
Índice de Figuras	8
Índice de Tablas	9
Abreviaturas	10
Resumen	11
1. INTRODUCCIÓN	12
1.1. Amibiasis y Entamoeba histolytica	12
1.1.1. Ciclo biológico	13
1.1.2. Morfología celular y organización estructural	15
1.1.3. Metabolismo	17
1.1.4. Organización del genoma	18
1.1.5. Patogenia y mecanismos de invasión	19
1.2. Procesamiento y plegamiento de proteínas in vivo	21
1.2.1. De los genes a las proteínas	22
1.2.2. Etiquetamiento de proteínas	23
1.2.3. Transporte de proteínas citosol-RE	24
1.2.4. Plegamiento asistido por chaperonas en el RE	25
1.2.5. Control de calidad de proteínas en la vía de secreción	30
1.3. Plegamiento de proteínas en el retículo endoplásmico	31
1.3.1. Plegamiento oxidativo	31

1.3.2. Señalización y estrés en RE	
1.4. La familia PDI de mamífero	34
1.4.1. Plegamiento asistido de proteínas	
1.4.2. Función de PDI	
1.5. PDI de Entamoeba histolytica (EhPDI)	
2. OBJETIVOS	
2.1. Objetivo general	
2.2. Objetivos específicos	
3. MATERIALES Y MÉTODOS	41
3.1. Reactivos químicos y biológicos	41
3.1.1. Reactivos químicos	41
3.1.2. Escherichia coli y cultivos bacterianos	41
3.1.3. Saccharomyces cerevisiae y cultivos de levadura	
3.1.4. Plásmidos	
3.1.5. Enzimas y otros reactivos biológicos	
3.1.6. Oligonucleótidos sintéticos	
3.1.7. Sistemas de purificación	
3.2. Equipo	46
3.3. Protocolos generales	47
3.3.1. Purificación de ADN plasmídico	47
3.3.2. Purificación de fragmentos de ADN a partir de gel de agarosa	a47
3.3.3. Purificación de productos de la reacción de PCR	
3.3.4. Condiciones estándar de termociclado (PCR)	
3.3.5. Análisis de ADN mediante electroforesis en gel de agarosa	
3.3.6. Transformación bacteriana	
3.3.7. Secuenciación de ADN	
3.3.8. Análisis bioinformático de secuencias de ADN	

3.3.9. Análisis estadístico	50
3.4. Estrategia de construcción del vector pYEhPDI	50
3.4.1. Diseño de oligonucleótidos	50
3.4.2. Estrategia de amplificación	51
3.4.3. Construcción del vector p13XDEL2	53
3.4.4. Construcción del vector p13PsXDEL2	54
3.4.5. Construcción del vector pYEhPDI	56
3.5. Estrategia de construcción de los vectores que portan las variantes de EhPDI	57
3.6. Estrategia de construcción del vector pYScPDI	58
3.7. Aislamiento de la cepa mutante haploide ΔPDI1/pCT38 de S. cerevisiae	60
3.7.1. Preparación del plásmido pCT38 a alta concentración	60
3.7.2. Preparación de células de levadura BY4743-YCL043c electrocompetentes	60
3.7.3. Transformación de células de levadura BY4743-YCL043c	61
3.7.4. Análisis aleatorio de esporas (Random Spore Analysis)	62
3.7.5. Identificación de la cepa mutante haploide $\Delta PDI1/pCT38$ de S. cerevisiae	63
3.8. Complementación de la mutante haploide <i>APDI1/pCT38</i> de S. cerevisiae	64
3.8.1. Preparación de los plásmidos pYScPDI, pYEhPDI y pYRMs a alta concentración	ı64
3.8.2. Preparación de células electrocompetentes APDI1/pCT38 de S. cerevisiae	64
3.8.3. Transformación de la cepa mutante haploide $\Delta PDII/pCT38$ de S. cerevisiae	65
3.8.4. Ensayo de intercambio de plásmidos	66
3.9. Curvas de crecimiento celular	67
3.10. Inmunodetección de EhPDI mediante western blot	68
3.10.1.Extracción de proteínas totales	68
3.10.2.Electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)	68
3.10.3.Electrotransferencia de proteínas e inmunodetección (Western blot)	69
3.11. Análisis cualitativo de la presencia del gen EhPDI y su variante RM06 en la haploide ΔPDI1	сера 70
- 3.11.1.Extracción de plásmido a partir de células de levadura	70

	3.1	1.2.Amplificación por PCR de ScPDI1, EhPDI y RM06	71
<i>4</i> .	RE	SULTADOS Y DISCUSIONES	72
	4.1.	La enzima PDI es importante para la biología celular de E. histolytica	72
	4.2.	La enzima PDI de E. histolytica exhibe características estructurales relevantes	.72
	<i>4.3</i> .	S. cerevisiae como modelo para el estudio de la enzima PDI de E. histolytica	73
	4.4.	El vector que expresa EhPDI bajo el control del promotor de ScPDI1	74
	4.5.	Los vectores que expresan variantes de EhPDI	.77
	4.6.	El vector que expresa ScPDI1, un control positivo del ensayo	80
	4.7.	La cepa mutante haploide <i>APDI1/pCT38</i> de S. cerevisiae	81
	<i>4.8</i> .	La enzima PDI amibiana complementa la mutante APDI1 de S. cerevisiae	84
	<i>4.9</i> .	El gen EhPDI se mantiene en la mutante APDI1 de S. cerevisiae	87
	4.10.	EhPDI y la variante RM06 se expresan en la mutante APDI1 de S. cerevisiae	.88
	4.11. ⊿PD	EhPDI y la variante RM06 restablecen la velocidad de crecimiento de la muta 11 de S. cerevisiae	nte 90
	4.12. de S.	La enzima PDI de E. histolytica participa en el ambiente redox de la mutante ΔH cerevisiae	PDI 91
5.	CO	ONCLUSIONES	92
6.	BI	BLIOGRAFIA	.93

Índice de Figuras

Figura 1. Ciclo biológico de Entamoeba histolytica.	13
Figura 2. Trofozoito de	15
Figura 3. Quiste de E. histolytica	16
Figura 4. Representación gráfica de la estructura 3D de la enzima PDI1	28
Figura 5. Actividad oxidorreductasa de PDI	29
Figura 6. Secuencia nucleotídica y polipeptídica deducida de EhPDI	37
Figura 7. Representación circular	43
Figura 8. Representación circular del plásmido pRS413	44
Figura 9. Representación circular del plásmido pBPelBEhPDI.	45
Figura 10. Representación grafica de la estrategia de amplificación de	51
Figura 11. Representación circular del plásmido pYEhPDI	76
Figura 12. Análisis del vector pYEhPDI	77
Figura 13. Análisis de las variantes de EhPDI	78
Figura 14. Representación circular del plásmido pYScPDI	80
Figura 15. Análisis del vector pYScPDI	82
Figura 16. Tamizado de 36 esporas en medio SD en ausencia de	83
Figura 17. Análisis del fenotipo letal de la cepa RSA4-16,	83
Figura 18. Caracterización de las auxotrofías de la cepa RSA4-16,	84
Figura 19. Ensayo de complementación funcional.	86
Figura 20. Análisis del vector pYEhPDI	88
Figura 21. Análisis de la expresión de EhPDI en la mutante ΔPDI1 de S. cerevisiae	89
Figura 22. Curvas de crecimiento celular la mutante ΔPDI1 de S. cerevisiae complem	nentada con
ScPDI1, EhPDI, su variante RM06	90

Índice de Tablas

Tabla 1. Chaperonas y enzimas presentes en Reticulo Endoplásmico
Tabla 2. Medios de cultivo para Escherichia coli (g/L)42
Tabla 3. Oligonucleótidos sintéticos. 46
Tabla 4. Nomenclatura utilizada para la identificación de los productos de PCR de las variantes
de EhPDI
Tabla 5. Nomenclatura utilizada para la identificación de los vectores que expresan las variantes
de EhPDI
Tabla 6. Medios de cultivo para selección de células haploides Δ PDI1/pCT3863
Tabla 7. Medios selectivos utilizados para caracterización de auxotrofías de la cepa haploide
ΔPDI1/pCT3863
Tabla 8. Medios de cultivo para el ensayo de complementación funcional. 66
Tabla 9. Medios de cultivo utilizados para la caracterización de auxotrofías de las células
complementantes de la función de ScPDI167
Tabla 10. Variantes de EhPDI
Tabla 11. Resultados del análisis de las curvas de crecimiento celular

Abreviaturas

aa	Aminoácido
ADN	Acido desoxirribonucleico
ARN	Acido ribonucleico
BM	Biología molecular
BrEt	Bromuro de etidio
C, Cys	Cisteína
DTT	Ditriotreitol
dNTPs	Desoxirribonucleótidos trifosfatados
Eh	Entamoeba histolytica
<i>Eh</i> PDI	PDI de Entamoeba histolytica
FA	Fosfatasa alcalina
5-FOA	Ácido 5-fluoro-orótico
H, HIS	Histidina
KDa	Kilodaltons
L, LEU	Leucina
μL, mL, L	Microlitro, mililitro, litro
mm	milimetros
M, mM, µM	Molar, milimolar, micromolar
MCS	Sitio de clonación multiple
nm	Nanómetro
ng, mg, µg	Nanogramo, miligramo, microgramo
N-Tx, C-Tx	Amino tiorredoxina, Carboxilo tiorredoxina
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
pPCR	Producto de la reacción en cadena de la polimerasa
PDI	Proteína disulfuro isomerasa
RE	Retículo endoplásmico
S	Serina
ScPDI	PDI de Sacaromyces cerevisiae
U, URA	Uracilo
WCGHCK	Triptófano, cisteína, glicina, histidina, lisina
W, TRP	Triptófano

Resumen

En *Entamoeba histolytica*, el protozoario parásito intestinal causante de amibiasis en humanos, algunas proteínas involucradas en la adhesión y la destrucción de tejidos, tales como la lectina de unión a galactosa y N-acetil-galactosamina o las proteínas formadoras de poro, contienen enlaces disulfuro que son importantes para su actividad biológica; lo anterior significa que, para estos factores de virulencia, la conformación de su estructura terciaria depende (en buena medida) de una correcta oxidación de sus residuos de cisteína (*Cys*).

En células eucariotas, una de las características estructurales de la mayoría de las proteínas secretadas es la presencia de enlaces disulfuro. La enzima proteína disulfuro isomerasa (PDI, EC 5.3.4.1.) es el principal catalizador biológico de la formación y re-arreglo de enlaces disulfuro en el retículo endoplásmico (RE) y su actividad oxidorreductora depende de un par de cisteínas presentes en el motivo CXXC de sus sitios activos (dominios Tx). La PDI es una tiol/disulfuro oxidorreductasa que cataliza las reacciones de oxidación, reducción e isomerización de enlaces disulfuro.

El conocimiento acerca del mecanismo de formación y re-arreglo de enlaces disulfuro en proteínas amibianas es limitado. Mediante un ensayo genético-funcional, se mostró la primera evidencia experimental de una enzima PDI amibiana (*Eh*PDI) con actividad disulfuro oxidasa *in vivo*. Además, recientemente se demostró que la enzima *Eh*PDI exhibe las actividades disulfuro reductasa y oxidasa *in vitro*.

El presente trabajo extiende el conocimiento acerca de las funciones *in vivo* de la enzima *Eh*PDI. Utilizando como modelo de célula eucariota a la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, se realizaron experimentos para evaluar la actividad oxidorreductasa de la enzima *Eh*PDI en una mutante Δ PDI1. Estudios genéticos y funcionales previos de la enzima PDI1, principal tiol/disulfuro oxidorreductasa de *S. cerevisiae*, demostraron que es esencial para la supervivencia celular de la levadura.

Los resultados del ensayo de complementación funcional de la mutante Δ PDI1 de *S. cerevisiae* demostraron que la enzima *Eh*PDI es capaz de restablecer la función oxidorreductasa y rescatar el fenotipo letal de la mutante Δ PDI1. Además, mediante mutaciones de sustitución sitio-dirigidas, se observó que: (i) la actividad de *Eh*PDI depende de la presencia de los residuos de *Cys* presentes en los sitios activos de sus dominios *Tx*, y (ii) la participación individual de los dominio *Tx* no es equivalente.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Amibiasis y Entamoeba histolytica

La amibiasis se define como la infección por el protozoario parásito intestinal *Entamoeba histolytica*. Habitualmente, *E. histolytica* reside en el intestino grueso; sin embargo, ocasionalmente penetra la mucosa intestinal para diseminarse hacia otros órganos (*p.e.* hígado). Los factores y mecanismos que desencadenan la invasión extra-intestinal aún son poco claros.

La amibiasis es responsable de aproximadamente 100,000 defunciones anualmente, colocándose en segundo lugar, después de malaria, en la tasa de mortalidad ocasionada por protozoarios parásitos [54]. Actualmente, existen datos bioquímicos, inmunológicos y genéticos que indican la existencia de dos especies de *Entamoeba* morfológicamente indistinguibles: *histolytica* y *dispar*, las cuales anteriormente eran descritas como patógena y no patógena, respectivamente [62].

Algunas proteínas amibianas han sido asociadas con la virulencia del parásito: la lectina de unión a los azúcares galactosa y N-acetil-galactosamina (que participa en la adherencia a células epiteliales), amibaporos (péptidos que forman canales en las membranas celulares), y cisteína proteinasas (enzimas que degradan tejidos). Estos factores de virulencia, así como otros antígenos únicos presentes en la superficie del parásito, son considerados como blancos potenciales para el desarrollo de vacunas anti-amibianas [62, 29].

A diferencia de otros protozoarios parásitos (tales como *Trypanosoma* o *Plasmodium*), *E. histolytica* tiene un ciclo de vida muy simple, existiendo como quiste (forma infectiva) o trofozoito (forma invasiva) [35]. Los humanos, y quizás algunos primates, son los únicos hospederos naturales del parásito [54].

1.1.1. Ciclo biológico

E. histolytica es un parásito cosmopolita de distribución mundial. Sin embargo, su incidencia aumenta en climas templados y en lugares donde las condiciones de salud e higiene



Figura 1. Ciclo biológico de Entamoeba histolytica.

son precarias [32]. El ciclo de vida incluye cuatro estadios consecutivos: trofozoitos, pre-quistes, quistes y formas meta-quísticas (Figura 1) [34].

Por su importancia para la patología humana, la investigación se ha centrado en el quiste y el trofozoito, excluyendo el conocimiento de los otros estadios. Los trofozoitos proliferan y colonizan en el intestino grueso; sin embargo, en condiciones poco conocidas, se puede originar la forma de resistencia (quiste), el cual se puede observar en las heces fecales de los individuos infectados [32].

El ciclo biológico de *E. histolytica* se esquematiza claramente en la Figura 1. Brevemente, la infección [1] ocurre mediante la ingestión de quistes maduros [2] en alimentos, bebidas o manos contaminadas. El desenquistamiento [3] ocurre en el intestino delgado, donde los trofozoitos [4] son liberados, y migran hacia el intestino grueso. Los trofozoitos se multiplican por fisión binaria y producen quistes [5], los cuales son excretados en las heces [1]. Gracias a la protección conferida por una pared quitinosa, los quistes pueden sobrevivir por días o semanas en el ambiente externo; siendo éstos los responsables de la transmisión.

Por razones poco conocidas, existen individuos que portan trofozoitos en el lumen del intestino delgado [A] que no exhiben el cuadro clínico de la amibiasis intestinal (infección no invasiva), convirtiéndose en portadores asintomáticos. Sin embargo, en otros portadores del parásito, los trofozoitos invaden la mucosa intestinal [B], ocasionando un cuadro clínico característico de la infección intestinal (*p.e.* disentería amibiana); adicionalmente, y dependiendo de la virulencia del parásito, los trofozoitos pueden ser transportados a través del torrente sanguíneo hacia otros tejidos (*p.e.* hígado, pulmones y cerebro) [C], ocasionando cuadros clínicos característicos de la infección extra-intestinal (*p.e.* absceso hepático amibiano) [9].

1.1.2. Morfología celular y organización estructural

Trofozoitos. Células pleomórficas mononucleadas, muy dinámicas, cuya forma y motilidad dependen en gran medida de la temperatura, pH, osmolaridad y potencial oxidorreductor (Figura 2). Los trofozoitos en movimiento tienen forma alargada con uno o varios pseudópodos frontales y una cola (o uroide), con movimientos citoplasmáticos y



Figura 2. Trofozoito de *E. histolytica.*

desplazamiento continuo [36]. El diámetro de la célula es variable (10-60 µm), debido tanto al pleomorfismo del parásito como a las condiciones de nutrimentales. La intensa actividad endocítica del parásito puede manifestarse mediante la presencia de numerosas vesículas pinocíticas o fagocíticas [32].

La actividad móvil y el pleomorfismo de los trofozoitos se deben a un citoplasma simple, carente de algunos componentes típicos, como las mitocondrias, y la presencia de un citoesqueleto poco estructurado, un sistema endomembranoso poco desarrollado (equivalente al retículo endoplásmico y aparato de Golgi), y un sistema de vesículas digestivas poco diferenciado [35]. En su defecto, el citoplasma exhibe una gran cantidad de vesículas citoplásmicas de tamaño variable (entre 0.5 y 9 μ m de diámetro), de las cuales se han identificado, tanto a nivel estructural como bioquímico, lisosomas, vacuolas (fagocíticas, pinocíticas y autofágicas) y cuerpos residuales [32].

Los componentes químicos de la membrana citoplasmática son de gran interés, ya que en ella se localiza un gran número de antígenos relevantes para la respuesta inmune humoral. Además, contiene receptores para (i) moléculas presentes en las células del hospedero, y (ii) componentes de la matriz extracelular; así como, otros elementos que posiblemente confieran al parásito parte de su capacidad citolítica y citotóxica.

Uno de los aspectos más relevantes del trofozoito es la gran plasticidad de su membrana celular. Cuando los componentes de la membrana entran en contacto con algún ligando (p.e. anticuerpos anti-amiba), los complejos ligando-receptor (inicialmente distribuidos uniformemente) experimentan rápidamente una redistribución hacia el polo posterior de la amiba, llamado "uroide". Esta redistribución se realiza por un mecanismo de deslizamiento de actina y miosina (mediado por calmodulina y una cinasa de la cadena ligera de la miosina). Posteriormente, el casquete formado por acumulación de estos complejos, denominado "cap", es liberado hacia el ambiente extracelular o, en algunos casos, es incorporado al citoplasma amibiano (a través de vacuolas citoplásmicas) donde es degradado por las enzimas hidrolíticas [32]. En el interior de la membrana nuclear, se localizan gruesos cúmulos de cromatina condensada y en su centro se destaca un pequeño cuerpo rico en ADN. En trofozoitos en

metafases y mediante colorantes fluorescentes (que se unen específicamente a ADN) se demostró la presencia de seis condensaciones de cromatina, las cuales han sido interpretadas como cromosomas. La división celular ocurre por mitosis cerrada, ya que la membrana nuclear no se fragmenta. Por razones poco conocidas, durante su trayecto de expulsión hacia el medio ambiente, el trofozoito



Figura 3. Quiste de E. histolytica.

experimenta dos divisiones nucleares en ausencia de división celular. Este extraordinario fenómeno celular da como resultado una célula con 4 núcleos, denominado quiste.

Quistes. Células redondas tetranucleadas, hialinas, con un diámetro de 8 a 20 μ m de diámetro, y una pared quitinosa rígida (Figura 3). Después de una división nuclear, cada quiste da origen a ocho trofozoitos en la luz del intestinal del hospedero. La membrana citoplasmática presenta invaginaciones profundas. En tinciones con yodo, el citoplasma aparece vacuolado con numerosos depósitos de glucógeno, los cuales disminuyen en número y tamaño conforme el quiste madura. La tinción con hematoxilina permite la identificación cuatro núcleos pequeños; sin embargo, se pueden observar uno o dos núcleos en formas quísticas inmaduras [36]. Los inhibidores de la síntesis de quitina (específicamente, inhibidores de la quitina sintasa 2 de *E. histolytica*) podrían llegar a ser empleados como alternativas para el control de la amibiasis, ya que los trofozoitos no sobreviven en las condiciones adversas del medio exterior [61].

1.1.3. Metabolismo

E. histolytica es un organismo aeróbico facultativo, con enzimas glicolíticas ortólogas a algunas que se encuentran en bacterias. Esta característica bioquímica ofrece una ventaja metabólica al estilo de vida de la amiba, ya que le permite adaptarse a las diferentes concentraciones de oxígeno (baja en el lumen del intestino grueso) [35].

E. histolytica es considerada como singular entre los organismos eucariotas, debido a que carece de glutatión y otras enzimas dependientes de glutatión. En otros organismos, la función primordial del glutatión es la protección contra la toxicidad del oxígeno. Sin embargo, en la

amiba se han identificado altas concentraciones de cisteína y otras moléculas con grupos tioles, los cuales podrían sustituir la función del glutatión.

La glucosa es la principal fuente de energía; sin embargo, los transportadores de glucosa son similares a los transportadores de ribosa presentes en organismos procariotas [29]. Por ser un organismo fagocítico, *E. histolytica* tiene acceso a bacterias y compuestos orgánicos derivados del hospedero. Muchas de las rutas metabólicas de aminoácidos están ausentes, a excepción de serina y cisteína (el mayor tiol intracelular).

1.1.4. Organización del genoma

Todo el ADN amibiano se encuentra localizado en el núcleo, ya que no contiene mitocondrias u otros organelos que contengan ADN. Sin embargo, se encuentran presentes varias copias de ARN ribosomal (ARNr) como elementos circulares (episomas). La unidad genética estructural se encuentra formada por histonas atípicas: además, presenta un cariotipo complejo (11 a 20 bandas, posibles cromosomas) [59].

El proyecto genoma de *E. histolytica* ha concluido [29]. El análisis se llevó a cabo en una cobertura de 12.5 veces la representación del genoma, el cual consiste de 20,772,429 pares de bases (NCBI Acc. NZ_AAFB0000000.2) Se predicen 8,342 genes (8,163 codificantes para proteínas y 80 para ARN estructurales, y 99 *pseudo-genes*), con un promedio de 1.17 Kb en tamaño, los cuales comprenden alrededor del 49 % del genoma. Además, se predice que una cuarta parte de los genes contienen intrones, y alrededor del 6% contiene intrones múltiples. Además, en un análisis de comparativo, no fueron identificados homólogos para 2,572 de las proteínas inferidas (31 %).

Los cromosomas de *E. histolytica* no se condensan, por lo que es difícil determinar el número exacto de cromosomas. Además, la variación del tamaño de los cromosomas puede ser debida a la expansión y contracción sub-telomérica, tal como se ha observado en otros protistas. Por otro lado, existen regiones que consisten de arreglos de ARN de transferencia, los cuales comprenden casi un 10% de la secuencia. Se especula que estos arreglos pueden tener un papel importante, funcional y estructural, en la organización genómica [29].

Los análisis post-genómicos han mostrado que el genoma de *E. histolytica* codifica para un gran número de receptores de proteína cinasas y contiene expansiones de una gran variedad de familias de genes, incluyendo aquellas asociadas con la virulencia.

1.1.5. Patogenia y mecanismos de invasión

La patología en amibiasis inicia por la adherencia de *E. histolytica* a las células intestinales. Entre los principales factores de adherencia se encuentra la denominada "*lectina Gal/GalNAc*", que se une a residuos de galactosa (*Gal*) y N-acetil-galactosamina (*GalNAc*) de las glucoproteínas celulares del hospedero [45]. Este receptor es un heterodímero formado por una cadena pesada y una ligera. La cadena pesada es una proteína integral que bloquea la formación del complejo de membrana durante la cascada de activación del complemento [10]. Por otro lado, se ha descrito una molécula de 37 KDa que aparentemente puede funcionar como receptor de fibronectina [48].

El principal mecanismo de la virulencia amibiana es su capacidad citotóxica, proceso que está mediado por una serie de factores y sustancias secretadas al medio extracelular, entre las que destacan los amiboporos (proteínas formadoras de poros) y las cisteína proteinasas [10].

La familia de los amibaporos comprende tres isoformas: A, B y C; los cuales se expresan en una proporción aproximada de 35:10:1, respectivamente; y exhiben una identidad del 35-57 % en su secuencia polipeptídica [48]. A pesar de la divergencia en su secuencia, poseen un patrón característico de 6 cisteínas altamente conservadas, que participan en la formación de enlaces disulfuro, y un residuo de histidina en el extremo C-terminal, que se cree está involucrado en el mecanismo de dimerización dependiente de pH. La estructura secundaria del amibaporo A presenta plegamiento caracterizado por varias α -hélices [21].

Los amibaporos son polipéptidos solubles que se insertan en la membrana de la célula diana (por unión con fosfolípidos aniónicos a bajo pH), oligomerizan (proceso mediado por la interacción péptido-péptido), difunden en la membrana y forman un canal, a través del cual se produce la salida de iones y otras moléculas pequeñas [10]. En consecuencia, el medio intracelular cambia y esto resulta en muerte celular por lisis. Se ha demostrado que los amibaporos presentan homología con los polipéptidos secretados por células NK y con la saponina, sustancias que producen un efecto lítico similar al observado con los amibaporos [21]. Recientemente, mediante un ensayo de silenciamiento transcripcional de la isoforma amibaporo A, se demostró que los trofozoitos pierden patogenicidad, demostrando así que esta proteína juega un papel clave como factor de virulencia de *E. histolytica* [64]. Se ha postulado que los trofozoitos de *E. histolytica* son resistentes a la actividad lítica de los amibaporos debido a que su membrana celular posee fosfolípidos neutros, impidiendo la inserción del polipéptido. Además, la principal función de los amibaporos es la lisis de las bacterias fagocitadas, principal fuente de nutrimental para los trofozoitos.

Las cisteína proteinasas (CP) son las enzimas proteolíticas de mayor concentración en los lisados de *E. histolytica*. En un análisis *post*-genómico, un total de 50 diferentes isoenzimas fueron identificadas, de las cuales *Eh*CP1, *Eh*CP2 y *Eh*CP3 comprenden aprox. el 90% de la actividad de proteinasa encontrada en el trofozoito [58]. Las CP se han asociado a la degradación de la matriz extracelular (fibronectina, laminina, colágena) y a la evasión de la respuesta inmune del hospedero, al digerir IgA e IgG, y participar en la inactivación de las anafilotoxinas C3a y C5a [48].

La capacidad agresora de las amibas no se puede adjudicar a una sola proteína, toxina, enzima, o función celular [37]; es el resultado de una combinación de factores: la liberación de toxinas y de enzimas, la motilidad activa del parásito, su capacidad de adhesión y fagocítica, su asombrosa maquinaria enzimática que degrada rápida y eficientemente los componentes orgánicos ingeridos por el parásito y su capacidad de contender exitosamente con los componentes humorales y celulares de la respuesta inmunológica del hospedero.

1.2. Procesamiento y plegamiento de proteínas in vivo

Después de su biosíntesis, las proteínas deben ser correctamente plegadas y sufrir una serie de modificaciones *post*-traduccionales para llevar a cabo sus funciones biológicas. El procesamiento y plegamiento se lleva a cabo en tres compartimentos celulares: citosol, RE y mitocondria. Cada compartimento está equipado con un grupo de chaperonas y enzimas de plegamiento optimizadas para trabajar en las condiciones locales. En todos los casos, el resultado final debe ser una molécula nativa libre de errores. Además, la maduración estructural debe en un corto periodo. En el atestado ambiente intracelular, las proteínas no plegadas pueden sufrir

agregación y ser tóxicas para la célula; por lo tanto, la agregación es prevenida por varios sistemas proteolíticos que disponen rápidamente de los polipéptidos aberrantes o dañados [2, 20].

Una fracción considerable del proteoma consiste de moléculas que están destinadas al espacio extracelular o la membrana citoplásmica: éstas pueden ser secretadas por la célula o insertarse en la membrana, para actuar como ligandos o receptores, respetivamente. Las proteínas destinadas al espacio extracelular son sintetizadas por los ribosomas unidos al RE, y traducidos y translocados hacia el lumen del RE, donde adquieren su conformación nativa, antes de ser transportados al Aparato de Golgi u otros compartimentos. Las proteínas de secreción y de membrana representan el principal mecanismo de comunicación intercelular. La fidelidad de las interacciones ligando-receptor requiere que ambas moléculas posean su conformación nativa. Por lo tanto, el plegamiento de proteínas en la vía de secreción debe ser estrictamente controlado [2, 20].

1.2.1. De los genes a las proteínas

El flujo de la información genética (ADN a ARN a proteínas) constituye la base molecular para la vida. La replicación del genoma es extremadamente precisa. Mecanismos de corrección, tales como la edición y la reparación, aseguran una frecuencia de error $<1x10^{-8}$ en procariotas y $<1x10^{-10}$ en eucariotas. Sin embargo, mutaciones a nivel genómico son toleradas y contribuyen de manera esencial al proceso de evolución [2, 20].

La realidad muestra que la transferencia de información de ADN a ARNm (transcripción), de ARNm a polipéptido (traducción), y la conversión de este último a una proteína en la forma correcta y biológicamente activa no están exentas de errores. Sin embargo,

los errores espontáneos en la transcripción o traducción así como ciertos niveles de ineficiencia en los mecanismos de plegamiento raramente tienen consecuencias dramáticas para la superviviencia celular, ya que los productos de ambos (ARNm y proteínas) tienen tiempos de vida media relativamente cortos y pueden ser reemplazados rápidamente por nuevos productos. Además, los mecanismos de control de la calidad biológica están ubicados estratégicamente para seleccionar los productos defectuosos y removerlos rápidamente [2, 20].

Los ribosomas de células eucariotas están localizados exclusivamente en el citosol y en la mitocondria. Por lo tanto, para que las proteínas puedan localizarse en el lumen del retículo endoplásmico (RE), deben resolverse dos situaciones: (i) como atraer los ribosomas hacia la membrana del RE, y (ii) como translocar el polipéptido naciente a través de la membrana del RE hacia el lumen [2, 20].

1.2.2. Etiquetamiento de proteínas

En la década de 1950s, *George Palade* demostró que en células secretorias una gran población de ribosomas estaba asociada a membranas internas (RE) [44]. Una década después, demostró que las proteínas citosólicas se traducen en ribosomas libres, mientras que las proteínas de secreción se traducen en ribosomas unidos a la membrana y que éstos vectorialmente liberan los polipéptidos nacientes a través de la membrana del RE [8]. Adicionalmente, se observó que la traducción *in vitro* de la cadena ligera de las inmunoglobulinas era más grande que la proteína madura expresada *in vivo*, debido a la presencia de un estrecho de 20 aminoácidos hidrofóbicos presentes en el extremo amino de la proteína. Esta observación dio origen a la hipótesis del péptido señal, la cual fue posteriormente demostrada por *Gunter Blobel*: las secuencias señal funcionan como etiquetas durante la biosíntesis de proteínas y son removidas en la membrana del RE, rindiendo una proteína madura [6, 7].

1.2.3. Transporte de proteínas citosol-RE

Durante la primera etapa de la traducción de proteínas en el ribosoma, un complejo ribonucleoproteico, compuesto por una molécula de ARN 7S y seis polipéptidos llamado "*partícula de reconocimiento de la secuencia señal (SRP)*", se une a la secuencia señal cuando ésta emerge del ribosoma, deteniendo momentáneamente la elongación hasta que el ribosoma establece contacto con la membrana del RE. Posteriormente, se reanuda la biosíntesis de proteínas, la etiqueta hidrofóbica es removida por una peptidasa de señal, y el polipéptido naciente es translocado hacia el lumen del RE [2, 20].

Datos recientes muestran que la eficiencia del etiquetado de polipéptidos es variable y puede afectar la carga biosintética del RE durante las condiciones de estrés. El lumen del RE tiene condiciones únicas (es mas oxidante comparado con el citosol), y algunas proteínas expresadas en este compartimento están sujetas a modificaciones *post*-traduccionales, tales como la formación de enlaces disulfuro intra o inter-moleculares [2, 20].

La discrepancia entre el plegamiento *in vitro* e *in vivo* dio lugar al descubrimiento de un sistema enzimático que cataliza los pasos limitantes del plegamiento de proteínas en el RE: la adición de azúcares, la formación de enlaces disulfuro y la isomerización de residuos de prolina en proteínas maduras [2, 20]. Más de 50 años de investigación han demostrado la existencia mecanismos complejos que han co-evolucionado para facilitar el plegamiento de polipéptidos, controlar la calidad de los productos, y discernir entre las proteínas nativas (que van a ser

transportadas hacia su destino final) y proteínas aberrantes o mal plegadas (que serán removidas rápidamente de la célula) [2, 20].

1.2.4. Plegamiento asistido por chaperonas en el RE.

El plegamiento de proteínas en el inicia desde la traducción y continúa durante la translocación y termina mediante mecanismos post-traduccionales, hasta que la proteína adquiere la estructura nativa. La alta concentración de iones calcio y las condiciones oxidantes del RE crean un ambiente equivalente al medio extracelular. El lumen del RE prepara a las proteínas de secreción para las condiciones extracelulares. Por último, las proteínas plegadas y ensambladas correctamente son empaquetadas dentro de vesículas recubiertas y transportadas hacia el AG [2, 20].

Chaperonas clásicas. Los compartimentos celulares en los cuales sucede la biosíntesis y la translocación de proteínas (citosol, mitocondria y RE) contienen una alta concentración de chaperonas moleculares que previenen la agregación de proteínas no plegadas, facilitan la maduración de proteínas, y retienen a las proteínas plegadas en micro o macro-ambientes enriquecidos de proteínas de plegamiento. Las chaperonas clásicas están agrupadas en varias subfamilias, llamadas "*Hsp*" (de 40, 60, 70, 90 y 100 kDa). El lumen del RE no contiene los miembros de la familia de Hsp60 (chaperoninas); sin embargo, posee miembros de la familia reguladora GRP78/BiP (Hsp70) y sus cofactores ERdj1-5 (Hsp40), la familia de proteínas parecida a GrpE, un miembro de la familia Hsp90 (GRP94), y un miembro de la familia Hsp100 (Torsina A) [2, 20].

Los miembros citosólicos de la familia de *Hsp* son inducidos a nivel de transcripción en respuesta al estrés térmico; por otro lado, los miembros del RE no lo son, pero su síntesis es inducida bajo condiciones de sobrecarga del RE, disminución de glucosa, desbalance de calcio o condiciones homeostáticas redox.

La proteína chaperona GRP78/BiP ha sido referida como un miembro regulador del RE. GRP78/BiP protege proteínas inmaduras de la agregación, uniéndose a los dominios hidrofóbicos con baja afinidad (1-100 mM). La unión de GRP78/BiP a agregados de proteínas mal plegadas indica su función en el mantenimiento de la solubilidad, facilitando la eventual eliminación de proteínas aberrantes.

Chaperonas lectinas. La mayoría de proteínas que se transportan a través de la vía de secreción reciben N-glicanos múltiples. Estas modificaciones hidrofílicas pueden cambiar las propiedades generales de las proteínas y proveer sitios de unión para chaperonas lectinas. En contraste con GRP78/BiP (que se une directamente al esqueleto hidrofóbico del polipéptido), las chaperonas lectina se unen a azúcares o extensiones hidrofílicas. Al parecer ambos sistemas de chaperonas tienen funciones similares, favoreciendo el proceso de maduración. Los azúcares pre-ensamblados [compuesto de tres glucosas, nueve manosas y dos residuos N-acetil-glucosamina (Glc₃Man₉GlcNAc₂)] son transferidos por la oligosacaril transferasa (OST) de un donador lipídico presente en la membrana del RE (dolicol-fosfato) [2, 20].

Los oligosacáridos modifican covalentemente la cadena lateral de asparaginas (Asn) en el sitio consenso Asn-X-(Ser/Thr). La transferencia generalmente ocurre co-traduccionalmente, una vez que la secuencia consenso ha emergido de 12 – 14 aminoácidos hacia el lumen del RE

(alineando la *Asn* con el sitio activo de OST). Entonces el oligosacárido es rápidamente procesado por la acción secuencial de las glucosidasas I y II.

Calnexina (CNX) y calreticulina (CRT) fueron nombradas por su habilidad para unir calcio. CNX es una proteína de membrana tipo I que contiene un solo dominio de unión a carbohidratos. CRT es un parálogo soluble de CNX. Ya que CNX y CRT se unen glicoproteínas monoglicosiladas con afinidad en el orden micromolar, sus ciclos de unión como chaperonas están controlados por las glicosilasas y transferasas que dictan la composición de carbohidratos de las glicoproteínas maduras en el RE.

Formación de enlaces disulfuro. Una de los etapas críticas en la maduración de proteínas en el RE es la formación de enlaces disulfuro. Las condiciones del RE favorecen la asistencia de proteínas para esta cometido. Las oxidorreductasas de la familia de PDI catalizan estas reacciones actuando como aceptores de electrones, en la reacción de oxidación, o como donadores de electrones, para llevar a cabo la reacción de reducción.

Las enzimas PDI también pueden isomerizar enlaces disulfuro, ayudando a una proteína a obtener los enlaces disulfuro nativos mediante un re-arreglo de los enlaces disulfuro no nativos. Los miembros de la familia PDI están caracterizados por la presencia del motivo CXXC en su sitio activo. La enzima PDI de mamífero (la más estudiada) es una proteína multifuncional que puede actuar tanto como oxidorreductasa como chaperona.

Por otro lado, la estructura cristalográfica de la PDI1 de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* ha sido resuelta. La PDI1 de *S. cerevisiae* muestra un arreglo de cuatro dominios tiorredoxina: *a-b-b'-a'* (dos funcionales '*a'* y dos no funcionales '*b'*) que forman una estructura torcida parecida a una "U" (Figura 4). Los dominios catalíticos '*a'* están localizados en la



Figura 4. Representación gráfica de la estructura 3D de la enzima PDI1 de *S. cerevisiae*.

parte superior de la "U", cercanos uno al otro, y los no catalíticos '*b*' están localizados en la parte media baja de la "U", en un área enriquecida de residuos hidrofóbicos. La superficie hidrofóbica juega un papel importante: se une a estructuras mal plegadas y posiciona los sustratos para que actúe el dominio catalítico sobre el sustrato.

Para la catálisis de la formación de enlaces disulfuro en los polipéptidos, el motivo CXXC (de la enzima PDI) contiene un enlace disulfuro que actúa como aceptor de electrones, y deja la reacción en su estado reducido. En contraste, para la reducción de sustratos disulfuro, el motivo CXXC interviene en la reacción en su estado reducido. Finalmente, la isomerización de un re-arreglo de disulfuros inicia y termina con el estado reducido (Figura 5).



Figura 5. Actividad oxidorreductasa de PDI.

El estado de oxidación de los residuos *Cys* del sitio catalítico determina la función de PDI en el proceso de maduración de polipéptidos; por otro lado, su estado redox es controlado por el ambiente y otras proteínas adicionales, que ayudan a llevar y traer electrones hacia dentro y fuera del RE.

Isomerización residuos de prolina. En proteínas nativas, muchos enlaces peptídicos están conectados en conformación "*trans*" con la excepción de los enlaces *Xaa-Pro*, que pueden ser encontrados como conformaciones "*cis*" o "*trans*". Experimentos de replegamiento han demostrado que la isomerización "*cis/trans*" de los enlaces peptidil-prolil limitan el proceso de plegamiento de polipéptidos. La isomerización de los residuos *Pro* es catalizada por enzimas peptidil-prolil *cis/trans* isomerasas (PPI).

Las células de mamífero contienen tres clases de PPI: parvulinas, ciclofilinas y proteínas de unión FK506 (FKBPs). El RE contiene CypB, FKBP2, FKBP7 y FKBP10. CypB se ha

encontrado en complejos que contienen varias chaperonas del RE. Además, la familia de FKBP puede actuar como reguladores de la actividad de GRP78/BiP [2, 20].

1.2.5. Control de calidad de proteínas en la vía de secreción

A finales de la década de 1980s, se demostró que existe un mecanismo que asegura el ensamblaje correcto de proteínas, como pre-requisito para el transporte hacia el AG, en ruta hacia la secreción. Este mecanismo es conocido como "control de calidad del RE" [63]. Algunos estudios revelan que las proteínas que presentan defecto en el plegamiento y ensamblaje son eventualmente retro-traslocadas hacia el RE. El control de calidad de proteínas está íntimamente ligado al proceso de plegamiento. Ambos dependen de las chaperonas y enzimas residentes. El control de calidad tiene diferentes papeles [2, 20]:

- a. previene el despliegue de proteínas aberrantes, asegurando que sólo las proteínas nativas procedan a través de la ruta de secreción;
- b. retiene a los precursores en un ambiente apropiado para su maduración;
- c. aumenta su concentración para favorecer su ensamblaje y polimerización;
- d. reduce el riesgo de proteo-toxicidad, inhibiendo la agregación y promoviendo la degradación de proteínas mal plegadas;
- e. mantiene la homeostasis en la vía de secreción;
- f. regula el desarrollo de proteínas en la vía de secreción; y
- g. participa en el almacenamiento de proteínas para la secreción regulada.

1.3. Plegamiento de proteínas en el retículo endoplásmico

Una vez que las proteínas nacientes son co-traducidas y translocadas hacia el atestado ambiente del lumen del RE, éstas son plegadas en conformaciones más estables y de baja energía. Los principios básicos que gobiernan el plegamiento de proteínas son comunes en algunos compartimentos celulares, modificaciones bioquímicas que incluyen la remoción de la secuencia señal, la formación de enlaces disulfuro, la N-glicosilación y la adición de una molécula de anclaje a membranas (GPI, glicosil-fosfatidil-inositol). Podemos encontrar una plétora de enzimas y asistentes en la vía de secreción temprana, que cataliza cada paso (Tabla 1). El mecanismo de procesamiento y plegamiento de proteínas es altamentente complejo. Aún existen preguntas que deben obtener respuesta. ¿Cómo está regulada la biosíntesis y el balance de proteínas en cada tipo celular? o ¿Como están funcionalmente interconectados todos los compartimientos que participan en el mecanismo de procesamiento y plegamiento de proteínas? [2, 20].

1.3.1. Plegamiento oxidativo

En términos de composición iónica y potencial redox, el RE es el compartimiento intracelular que provee un ambiente ideal para las proteínas que están destinadas hacia el exterior. La relación entre glutatión oxidado y reducido (GSSG/GSH) en el RE, comparado con el citosol, no es suficiente para garantizar el plegamiento oxidativo.

En realidad, para muchas proteínas es necesario la isomerización y algunas veces la reducción para llevar a cabo el plegamiento correcto. Un ambiente hiper-oxidante como el lumen del RE, por consiguiente, puede inhibir el plegamiento de proteínas con disulfuros múltiples y

Tabla 1. Chaperonas y enzimas presentes en Retículo Endoplásmico.			
Clase	Nombre	Localización	Función
Chaperonas	BiP/GRP78 GRP94 ORP150 HERP	RE RE RE Membrana del RE	Plegamiento, Señalización Plegamiento Plegamiento, Hipoxia Degradación
Co-chaperonas	Sil1/BAP ERdj	RE RE	Intercambio de ATP Co-factor de BiP
Lectinas	CNX CRT VIPL/VIP36 EDEM, OS9/Erlectin	Membrana del RE RE RE/Cis-Golgi Membrana RE	Plegamiento Plegamiento Transporte Degradación
Enzimas redox	Ero1α/Ero1β PDI ERp57/ERp72 ERp44	RE RE RE ERGIC Cis-Golgi	Oxidasa Oxidasa, Isomerasa, Reductasa, Chaperona Isomerasa Retención mediada por tioles
Prolina isomerasas	PPlasas Ciclofilinas	RE RE, Mitocondria, Núcleo y Citosol	Isomerización de prolinas Isomerización de prolinas

promover la agregación. De tal manera que, el plegamiento oxidativo depende primordialmente de la asistencia de proteínas que favorecen la interacción proteína-proteína [2, 20].

En células eucarióticas, la principal vía de plegamiento oxidativo involucra la formación de enlaces disulfuro en proteínas nacientes, catalizada por oxidorreductasas de la familia de enzimas PDI. En mamíferos y levaduras, PDI consiste de cuatro dominios tiorredoxina (Tx): dos dominios laterales (a y a'), encargados de la actividad oxidorreductasa; y dos dominios centrales (b y b'), que proveen una superficie hidrofóbica apropiada para la unión y presentación de

sustratos. Después de transferir un enlace disulfuro a las proteínas nacientes, PDI es re-oxidada por los miembros de la familia de flavoproteínas Ero1 [12].

In vitro, la proteína Ero1 de levadura puede utilizar oxígeno molecular como el último aceptor de electrones, en una reacción que produce peróxido de hidrógeno en cantidades equimolares a los disulfuros formados. Se realizaron estudios para determinar si H_2O_2 es generado por las células vivas como un subproducto del plegamiento oxidativo, ya que esto puede servir para los propósitos de señalización. Sin embargo, al menos en levaduras, la formación de disulfuros puede ocurrir en condiciones anaeróbicas, sugiriendo que existe otro aceptor de electrones [13, 14].

1.3.2. Señalización y estrés en RE

La acumulación de proteínas mal plegadas en el lumen del RE provoca una cascada de señalización multidimensional para aliviar el estrés del RE. Algunos mecanismos se activan para manejar la gran cantidad de proteínas mal plegadas:

- (i) disminución de la traducción de proteínas;
- (ii) aumento de la transcripción de genes involucrados en el plegamiento de proteínas no plegadas (chaperonas y enzimas de plegamiento) y de degradación asociada al RE;
- (iii) disminución de la entrada de proteínas en el RE; y
- (iv) degradación selectiva de ciertos ARN mensajeros que codifican para proteínas de secreción.

Sí las medidas anteriores no son suficientes para eliminar las proteínas mal plegadas del RE, se activa la vía de la apoptosis [20].

1.4. La familia PDI de mamífero

La familia de PDI de mamífero incluye más de una docena de proteínas. Algunas de las enzimas contienen solo un dominio *Tx* activo (ERp18, ERp44, y TMX1–4), otras dos (PDI, ERp57, PDIp, PDILT y P5), tres (ERp72, ERP46, y PDIr), o hasta cuatro (ERdj5). El sitio canónico CXHC, característico de las oxidasas, se encuentra una sola vez en ERdj5; dos veces en PDI, PDIp, ERp57 y P5; y tres veces en ERp72. El motivo CXPC, característico de las reductasas, se encuentra tres veces en ERdj5. Los otros miembros de la familia muestran una gran variedad de motivos que carecen de uno o ambas cisteínas terminales [26].

1.4.1. Plegamiento asistido de proteínas

In vivo, así como *in vitro*, la estructura terciaria de una proteína está determinada por su secuencia de aminoácidos [47]. El plegamiento de proteínas es la búsqueda de una conformación única y biológicamente activa entre un gran número de posibilidades. Aunque una alta estabilidad termodinámica es ciertamente una propiedad que identifica los estados nativos de muchas proteínas [65].

Muchas de las proteínas que se desnaturalizan espontáneamente pueden recuperar su estructura terciaria de la misma manera. Sin embargo, existen proteínas que facilitan el plegamiento de polipéptidos *in vivo*. Dos tipos de proteínas han sido implicadas en el plegamiento: (i) un grupo de estas incluyen factores que modifican la estructura de los residuos

de aminoácidos entre las cadenas polipeptídicas (*p.e.* PDI y ciclofilina); y (ii) otro grupo comprende las chaperones moleculares que asisten al plegamiento (*p.e.* HSP70, GroEL y GroES) [4]. Las características estructurales que determinan la conformación biológicamente activa deben ser descifradas por estos asistentes del plegamiento, da tal manera que puedan discernir la conformación nativa de otra mal plegada [65].

1.4.2. Función de PDI

Para las proteínas en las cuales la estructura nativa está estabilizada por enlaces disulfuro, el plegamiento correcto de su estructura tridimensional requiere de la oxidación química de sus residuos de cisteína [12]. Este plegamiento oxidativo es muy lento y puede ser complicado por competencia con la agregación. En cada célula, el plegamiento oxidativo es asistido por enzimas que catalizan la formación de enlaces disulfuro y chaperonas moleculares que inhiben la agregación hidrofóbica [16].

La proteína disulfuro isomerasa (PDI; EC 5.3.4.1) es una "foldasa" residente del lumen del RE caracterizada por el pionero del plegamiento de proteínas *Christian Anfinsen*, basado en la habilidad de catalizar el replegamiento de ribonucleasa A, una enzima de 4 enlaces disulfuro [41]. La actividad proteína-tiol oxidorreductasa de PDI difiere con respecto al estado redox y los requerimientos celulares: cataliza la oxidación e isomerización de disulfuros de cadenas polipeptídicas nacientes que llevan a cabo su plegamiento en el ambiente oxidante del RE; en tanto que, reduce enlaces disulfuro de proteínas en el citosol, endosomas y la membrana plasmática como consecuencia de su ambiente reductor [15]. Aunque la PDI se clasifica como una oxidorreductasa, realmente tiene un papel multifuncional, participando en el plegamiento, ensamblaje y modificación *post*-traduccional de una gran variedad de sustratos, incluyendo proteínas multi-dominios y de cadenas multiméricas [28, 41]. Tres son las reacciones de catálisis que puede llevar a cabo:

- (i) formación de enlaces disulfuro (de proteínas reducidas o parcialmente reducidas en condiciones oxidantes);
- (ii) reducción de disulfuros (utilizando pequeños complejos de tioles como agentes oxido-reductores); e
- (iii) isomerización (reacciones acopladas de oxidación y reducción de enlaces disulfuro que permite al sistema catalizar la conformación más estable).

En general, el proceso químico de la catálisis en las tres reacciones es la oxido-reducción que permite el intercambio ditiol-disulfuro [19].

Los enlaces disulfuro son cruciales para el plegamiento y estabilidad de muchas proteínas, pero se conoce muy poco acerca de este mecanismo *in vivo*. Cuando una proteína presenta una conformación desnaturalizada, la reformación *in vitro* de un enlace disulfuro ocurrirá, pero el proceso es muy lento y los enlaces formados no son siempre los correctos; en contraste, *in vivo* los enlaces disulfuro se forman rápidamente y, generalmente, son los correctos [4].

1.5. *PDI de Entamoeba histolytica (EhPDI)*
Recientemente, se publicó la primera secuencia PDI amibiana con actividad proteína disulfuro oxidasa *in vivo* [47]. Mediante la técnica de amplificación rápida de extremos de ADN complementario (RACE) se aisló la secuencia nucleotídica de un gen amibiano que codifica para una proteína con alta homología a proteínas PDI, la cual se denominó *Eh*PDI'.

*Eh*PDI codifica para un polipéptido de 337 aminoácidos, con un peso molecular teórico calculado de 38 KDa (Figura 6). El análisis polipeptídico de la enzima inferida predice un péptido señal N-terminal de 15 aminoácidos y dos dominios Tx, que presentan el motivo WCGHCK, y un dominio C-terminal conocido como Erp29. La arquitectura mostrada en la

1▶Met Lys Phe Leu Leu Phe Thr Leu Leu Thr Phe Leu Val Ser Ala Asp Val Val Ser Leu Asn Pro Thr Asn Phe Asn 79 ACT ATT GTT GAT GGA AGT AAA CAT GTT TTT GTT AAG TTT TTT GCT CCA TGG TGT GGA CAT TGC AAA AAA CTT GCT CCA 27▶Thr Ile Val Asp Gly Ser Lys His Val Phe Val Lys Phe Phe Ala Pro Trp Cys Gly His Cys Lys Lys Leu Ala Pro 157 GAA TAT ATT AAA CTT GCT GAT GCT TAC AAA GAT AAA CAA GAC ATT GTA ATT GCT GAA CTT GAT TGT GAC AAT AAA GAC sstGlu Tyr Ile Lys Leu Ala Asp Ala Tyr Lys Asp Lys Gln Asp Ile Val Ile Ala Glu Leu Asp Cys Asp Asn Lys Asp 235 CAC AAA GAC CTC TGT GGA AAG TTT GGA ATT AGT GGA TTT CCA ACC TTA AAA TTC TTC AGA AAA GGA ACT ACT GAA CCA 79 His Lys Asp Leu Cys Gly Lys Phe Gly Ile Ser Gly Phe Pro Thr Leu Lys Phe Phe Arg Lys Gly Thr Thr Glu Pro 313 ATT GAA TAT GAA GGT GGA AGA ACT GTA GAA GAT CTT TCT CAT TTT ATT CAA GAA AAG ATT CAA CCT AAA GCA CCA TCT 105↓Ile Glu Tyr Glu Gly Gly Arg Thr Val Glu Asp Leu Ser His Phe Ile Gln Glu Lys Ile Gln Pro Lys Ala Pro Ser 391 AAT GTT TCA GTA ACA ACT GCT ACA TTT GAT AGT ATT GTA ATG GAC CCA ACT AAA AAT GTC TTT GTT AAA TTC TTT 131⊁Asn Val Val Ser Val Thr Thr Ala Thr Phe Asp Ser Ile Val Met Asp Pro Thr Lys Asn Val Phe Val Lys Phe Phe 469 GCT CCA TGG TGT GGA CAT TGT AAG GCT CTC GCA CCA AAA TAT ATT GAA GTT AGC AAG ATG TAT GCC GGT GAA GAT GAC 157⊫Ala Pro Trp Cys Gly His Cys Lys Ala Leu Ala Pro Lys Tyr Ile Glu Val Ser Lys Met Tyr Ala Gly Glu Asp Asp 547 CTT GTT GTA GCT GAA GTC GAT TGT ACT GCA AAT CAA GAG ACA TGT AAC AAA TAT GAA GTA CAT GGA TAT CCT ACT TTA 188) ▶ Leu Val Val Ala Glu Val Asp Cys Thr Ala Asn Gln Glu Thr Cys Asn Lys Tyr Glu Val His Gly Tyr Pro Thr Leu 425 AAA TCA TTC CCA AAG GGA GAA AAT AAG AAA CCT ATT GCT TAT GAA GGA GGA AGA GAA GTT AAA GAC TTT GTT ACC TAC 209▶Lys Ser Phe Pro Lys Gly Glu Asn Lys Lys Pro Ile Ala Tyr Glu Gly Gly Arg Glu Val Lys Asp Phe Val Thr Tyr 703 TTC AAT ACC AAT TAT GGA TAT GAT AGA GAT GAG AAT GGA AAA TTA GGT AAA ACT GCT GGA AGA ATT GCT GAA CTT GAT 235 ▶ Phe Asn Thr Asn Tyr Gly Tyr Asp Arg Asp Glu Asn Gly Lys Leu Gly Lys Thr Ala Gly Arg Ile Ala Glu Leu Asp 261 ▶ Asp Leu Ala Lys Gly Phe Ala Asn Lys Glu Asn Lys Asp Glu Ile Ile Lys Lys Ala Glu Ala Ile Glu Gly Gly Ala 859 TAT TAC GTT AAA GTC ATG AAA AGA ATT ATT GAG AGA GGA GGA GAT TAT GTA GAA AAA GAA AAG GCT AGA ATC AAT AAA 287▶Tyr Tyr Val Lys Val Met Lys Arg Ile Ile Glu Arg Gly Ala Asp Tyr Val Glu Lys Glu Lys Ala Arg Ile Asn Lys 937 ATC TTA GAA AAC CCA TCT ATG AAA GCC AAG AAA ATT GAT GAT TTT ACT AGA AAC TTG AAT GTA CTT GAA GTT TTC TAA 313 ▶ I le Leu Glu Asn Pro Ser Met Lys Ala Lys Lys I le Asp Asp Phe Thr Arg Asn Leu Asn Val Leu Glu Val Phe •••

Figura 6. Secuencia nucleotídica y polipeptídica deducida de *Eh*PDI.

La secuencia codificante para el péptido señal se muestra sombreada. Los motivos estructurales CGHC se indican en rectángulos. Los aa se denotan en código de 3 letras.

proteína PDI amibiana corresponde a un patrón estructural compartido por algunos miembros de la familia P5 clase 2. *Eh*PDI carece de la secuencia K/HDEL, señal de retención presente en el extremo C-terminal de las proteínas solubles residentes del RE.

La actividad disulfuro oxidasa de *Eh*PDI *in vivo* fue evaluada mediante un ensayo de complementación funcional utilizando la mutante JCB571 de *E. coli* (*dsb*A⁻) [4, 23, 46]. Los resultados obtenidos demuestran que la enzima PDI amibiana complementa la actividad oxidasa de la DsbA bacteriana, al re-establecer completamente (100 %) la actividad fosfatasa alcalina en el periplasma de *E. coli* (proteína que depende de la completa oxidación y formación correcta de sus enlaces disulfuro para adquirir su estructura terciaria y realizar su función enzimática).

Aunque existen 11 secuencias PDI anotadas en la base de datos del genoma de *E. histolytica* [46], *Eh*PDI es la primera enzima amibiana involucrada en el mecanismo de formación de enlaces disulfuro que ha sido caracterizada funcionalmente. Estos resultados apoyan la hipótesis de que el genoma de *E. histolytica* codifica para proteínas involucradas en el correcto plegamiento de polipéptidos nacientes, una etapa importante en el mecanismo de secreción de proteínas amibianas.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo general

Determinar la actividad oxidorreductasa de la enzima PDI de *E. histolytica* (*Eh*PDI) mediante ensayos de complementación funcional y rescate del fenotipo letal de una mutante Δ PDI1 de *S. cerevisiae*.

2.2. Objetivos específicos

- Mediante la aplicación de herramientas de bioinformática y técnicas de biología molecular, construir los plásmidos para la expresión (en células de levadura) de los genes silvestres *Sc*PDI1 y *Eh*PDI, y variantes del gen *Eh*PDI (con mutaciones en los dominios tiorredoxina).
- Aislar la cepa mutante haploide ΔPDI1/pCT38 de S. cerevisiae mediante un análisis aleatorio de esporas, utilizando la cepa heterocigota diploide BY4743-YCL043c de S. cerevisiae como parental.
- Evaluar la función de la enzima *Eh*PDI como oxidorreductasa mediante un ensayo de complementación y rescate del fenotipo letal de la mutante haploide ΔPDI1/pCT38 de *S. cerevisiae*, utilizando una técnica de intercambio de plásmidos.
- 4. Evaluar la participación funcional de los dominios tiorredoxina de la enzima *Eh*PDI mediante un ensayo de complementación y rescate del fenotipo letal de la mutante

haploide ΔPDI1/pCT38 de *S. cerevisiae*, utilizando una técnica de intercambio de plásmidos.

5. Caracterizar el fenotipo resultante de la mutante haploide Δ PDI1 de *S. cerevisiae* complementada con la enzima *Eh*PDI mediante un análisis de la expresión proteica y curvas de crecimiento celular.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Reactivos químicos y biológicos

3.1.1. Reactivos químicos

Todos los reactivos químicos utilizados fueron grado BM (biología molecular). Agarosa, Tris base (tris [hidroximetil]-aminometano), SDS (dodecil sulfato de sodio), EDTA·Na₂ (ácido etilendiamino tetra-acético disódico), hidróxido de sodio, glicina y glicerol fueron adquiridos de *IBI Scientific*; sorbitol de *Research Organics* y ácido 5-fluoro-orótico (5-FOA) de *Toronto Research Chemicals*. Acetato de potasio, cloruro de sodio, cloruro de calcio, bromuro de etidio, cloroformo, fenol equilibrado, alcohol isoamílico, metanol, *Triton*[®] X-100, *Tween*[®] 20, βmercaptoetanol, ampicilina, geneticina (G418), "*YNB w/o amino acids*" (una mezcla base de fuentes de nitrógeno, sin aminoácidos), y las perlas de vidrio tratadas con ácido fueron obtenidos de SIGMA en México.

3.1.2. Escherichia coli y cultivos bacterianos

La cepa XL1-Blue MRF' de *Escherichia coli* (*Stratagene*) fue utilizada rutinariamente en los experimentos de biología molecular. La preparación de células bacterianas competentes para transfección por choque térmico fue realizada mediante el tratamiento con cloruro de calcio, siguiendo un protocolo estándar de laboratorio [50].

Los cultivos bacterianos fueron realizados utilizando medios complejos, líquidos o sólidos (1.7 % de agar) (Tabla 2). Los medios de cultivo LB y 2X YT fueron preparados siguiendo las instrucciones recomendadas [50].

Tabla 2. Medios de cultivo para <i>Escherichia coli</i> (g/L).			
Componentes	LB	2X YT	
Triptona	10	16	
Extracto de levadura	5	10	
NaCl	10	5	

3.1.3. Saccharomyces cerevisiae y cultivos de levadura

La cepa BY4743-YCL043c de *S. cerevisiae* [MAT a/ α his3 Δ 1/his3 Δ 1 leu2 Δ 0/leu2 Δ 0 lys2 Δ 0/LYS2 met15 Δ 0/MET15 ura3 Δ 0/ura3 Δ 0 PDI1/pdi1::kanMX] fue adquirida de la compañía *Open Biosystems*. Como la mutación *null* del gen PDI1 de *S. cerevisiae* (*Sc*PDI1) es letal, la cepa BY4743-YCL043c es mantenida de manera heterocigota (PDI1/ Δ PDI1). Las células de levadura fueron transfectadas mediante electroporación, siguiendo un protocolo proporcionado por el proveedor (*BTX Harvard Apparatus*).

Para la propagación de las células de levadura se utilizó el medio complejo YPD líquido (1 % de extracto de levadura, 2 % de peptona y 2 % de glucosa) suplementado con 200 μg/mL de geneticina (G-418). Para los ensayos de selección, se utilizó el medio SD agar [sintético dextrosa: 0.67 % de "*YNB w/o amino acids*", 2 % de glucosa, y 2 % de agar] suplementado con 200 μg/mL de G-418.

Dependiendo del ensayo de selección auxotrófica, el medio SD agar fue suplementado con 20 mg/L de histidina, 60 mg/L leucina, 20 mg/L triptófano o 20 mg/L uracilo. Además, para la selección de células haploides URA⁺, el medio selectivo fue suplementado con 0.1 % de 5-FOA y 20 mg/mL de uracilo.

3.1.4. Plásmidos

El plásmido pCT38 (Figura 7), derivado del vector pRS316 (*New England Biolabs*), contiene la unidad transcripcional completa del gen *Sc*PDI1 (un fragmento de 2.608 Kb: 879 pb de la región promotora, 1569 pb de la región codificante y 160 pb de la región terminadora) clonada en los sitios de restricción *Kpn*I y *Xba*I del plásmido pRS316 [55, 22].

pCT38 es un plásmido centromérico que contiene el gen URA3, el cual complementa la auxotrofía a uracilo en células de levadura Δ URA3. pCT38 fue amablemente proporcionado por la *Dra. Christine Tachibana* de la Universidad de Washington (E.U.A.) [55].

El vector pRS413 (*New England Biolabs*) (Figura 8) es un plásmido centromérico que contiene el gen HIS3, el cual complementa la auxotrofia a histidina en células de levadura ΔHIS3.





El plásmido pBPelB*Eh*PDI (Figura 9) fue utilizado como molde para la amplificación del gen codificante para la enzima *Eh*PDI [47].

3.1.5. Enzimas y otros reactivos biológicos

Las reacciones de PCR fueron realizadas utilizando la ADN polimerasa de *Thermus* aquaticus (Taq) (Roche Applied Science). Las reacciones de ligación se realizaron usando la ADN ligasa del bacteriófago T4 (New England Biolabs).

Las reacciones de defosforilación se llevaron a cabo utilizando la fosfatasa alcalina de intestino de becerro recombinante *bCIP* (*New England Biolabs*). Las digestiones nucleolíticas se realizaron usando las endonucleasas de restricción *Ava*I, *Apa*I, *Bam*HI, *Bst*BI, *Bgl*II, *Eco*RV, *Nco*I, *Spe*I, *Xho*I y *Xmn*I (*New England Biolabs*).



La mezcla de desoxirribonucleótidos trifosfatados (dNTPs) y los marcadores de peso molecular (*100-bp ladder*, *1-Kb ladder* y λ -DNA/*Hin*dIII) fueron adquiridos de *New England Biolabs*. La enzima β -glucoronidasa del molusco *Helix pomatia*, utilizada para la digestión de la membrana celular de levaduras, fue adquirida de la compañía SIGMA de México.

3.1.6. Oligonucleótidos sintéticos

El diseño de oligonucleótidos se realizó utilizando el paquete computacional *Gene Construction Kit*TM 2.5.3. (*Textco, Inc.*). Las propiedades fisicoquímicas y la estructuración secundaria fueron determinadas usando el programa *OLIGO*[®] 4.06 (*National Biosciences, Inc.*). Los oligonucleótidos fueron adquiridos a través del servicio de síntesis química de la compañía *GENOSYS*, representados por la compañía SIGMA de México (Tabla 3).

Tabla 3. Oligonucleótidos sintéticos.			
Nombre	Secuencia nucleotídica (5´ a 3´)	Zona de hibridación	
BXPS	GCCTCCTCTGTTTTCGCCCAAggateette cteetegagCACGATGAATTGTAATTCTGA	[Pro/PS de ScPDI1] - (BamHI- Xhol) – [HDEL de ScPDI1]	
XDEL2	gttttcctcgagCACGATGAATTGTAA	HDEL del gen ScPDI1	
NB <i>Eh</i> PDI	gcgaggatccGATGTAGTATCATTAAATCC	Amino del gen <i>Eh</i> PDI	
CXEhPDI	gcgactcgagGAAAACTTCAAGTACATTCAA	Carboxilo del gen EhPDI	
ScPDI1F	acactcggatccCAACAAGAGGCTGTGGCC	Amino del gen ScPDI1	
ScPDI1R	acactcctgcagTTACAATTCATCGTGAATGGC	Carboxilo del gen ScPDI1	
RV	GGAAACAGCTATGACCATG	MCS pBluescript SK-	
FW	GTAAAACGACGGCCAGTG	MCS pBluescript SK-	

3.1.7. Sistemas de purificación

Para la purificación del ADN se utilizaron diferentes estuches comerciales, dependiendo del origen de la muestra: (i) para ADN plasmídico, *QIAprep[®] Spin Miniprep Kit*; (ii) para productos de la reacción de PCR, *QIAprep[®] PCR Purification Kit*; y (iii) para la extracción de ADN a partir de gel de agarosa, *QIAquick[®] Gel Extraction Kit*. Todos estos fueron adquiridos de la compañía *QIAGEN*.

3.2. Equipo

Para la visualización de los geles de agarosa teñidos con bromuro de etidio se utilizó el fotodocumentador *Gel DocTM 2000 (BioRad)*. Las reacciones de PCR se llevaron a cabo utilizando el termociclador *TechneTM T-300*.

Las mediciones de absorbancia para la determinación de la concentración de ADN plasmídico (260/280 nm) fueron realizadas usando el espectrofotómetro UV/Visible *SmartSpec*TM *Plus (BioRad)*. Las mediciones de absorbancia para la determinación del crecimiento celular

(650 nm) fueron realizadas usando el lector de microplacas *Microplate Reader™ 680 (BioRad)*.
Para la transformación de células se utilizó el electroporador *Electro-Cell[™] Manipulator 630* (*BTX Harvard Apparatus*).

3.3. Protocolos generales

3.3.1. Purificación de ADN plasmídico

El ADN plasmídico de alta pureza fue obtenido utilizando el estuche comercial *QIAprep*[®] *Spin Miniprep Kit*, siguiendo el protocolo recomendado por el proveedor: el paquete celular, de 1.5 mL del cultivo bacteriano joven, fue separado mediante centrifugación a 14,000 rpm durante 1 min. La pastilla celular fue resuspendida en 250 µL del amortiguador *P1* y mezclada con 250 µL del amortiguador *P2*. Inmediatamente, la mezcla se neutralizó con 350 µL del amortiguador *N3*. Las proteínas precipitadas fueron separadas mediante centrifugación a 14,000 rpm durante 10 min y el sobrenadante fue transferido a una columna de *QIAPrep*TM *Spin Column*. La columna fue lavada con 500 µL de amortiguador *PB* y con 750 µL de amortiguador *PE*. Finalmente, el ADN plasmídico fue recuperado en 100 µL de amortiguador *EB* (o aguas destilada estéril) mediante centrifugación a 14,000 rpm durante 1 min.

3.3.2. Purificación de fragmentos de ADN a partir de gel de agarosa

Los fragmentos de ADN embebidos en gel de agarosa fueron purificados utilizando el estuche comercial $QIAquick^{TM}$ Gel Extraction Kit, siguiendo el procedimiento recomendado por el proveedor: el fragmento de gel fue redisuelto en 3 volúmenes de amortiguador QG mediante

incubación a 55 °C durante 10 min. Un volumen de isopropanol fue añadido y mezclado por pipeteo. La mezcla fue transferida a una columna *QIAquick*TM *Spin Column* y centrifugada a 13,000 rpm durante 1 min. La columna fue lavada con 750 µL de amortiguador *WB*. Finalmente, el ADN fue recuperado mediante en 30 µL de amortiguador *EB* (o agua destilada estéril) mediante centrifugación a 14,000 rpm durante 1 min.

3.3.3. Purificación de productos de la reacción de PCR

Los productos de las reacciones de PCR fueron purificados utilizando el estuche comercial $QIAquick^{TM}$ PCR Purification Kit, siguiendo el procedimiento recomendado por el proveedor: la reacción de PCR fue mezclada con 5 volúmenes de amortiguador PB. La mezcla fue transferida a una columna $QIAquick^{TM}$ Spin Column y centrifugada a 14,000 rpm durante 1 min. La membrana fue lavada con 750 µL de amortiguador PE. El ADN fue recuperado en 50 µL de amortiguador EB (o agua destilada estéril) mediante centrifugación a 14,000 rpm durante 1 min.

3.3.4. Condiciones estándar de termociclado (PCR)

Las reacciones se amplificación se realizaron utilizando las siguientes condiciones de termociclado: 1 ciclo de desnaturalización inicial [2 min a 94 °C]; 35 ciclos de amplificación exponencial [30 seg a 94 °C, 30 seg a 55 °C, 1 min a 72 °C], y 1 ciclo de extensión final [7 min a 72 °C].

3.3.5. Análisis de ADN mediante electroforesis en gel de agarosa

Los productos de amplificación, fragmentos de restricción y otras muestras de ADN fueron analizados y visualizados mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.5 - 2.0 %, conteniendo $0.5 \mu \text{g/mL}$ de bromuro de etidio.

3.3.6. Transformación bacteriana

El ensayo de transformación bacteriana se realizó mediante choque térmico, utilizando células competentes *E. coli* XL1-Blue MRF', preparadas siguiendo el protocolo estándar de laboratorio [50]: 1 - 5 μ L de la muestra de ADN circular (plásmido o ligación) fueron añadidos a alícuotas de células competentes (100 μ L) y mantenidas en hielo durante 30 min. El choque térmico se realizó de la siguiente manera: la mezcla se colocó en un termobloque a 42 °C durante 5 min e, inmediatamente, se regresó a hielo nuevamente. Después de transcurridos 5 min, las células fueron recuperadas mediante la adición de 1 mL de medio 2X YT e incubadas a 37 °C durante 30 - 60 min y 300 rpm. Diferentes volúmenes (1/10 y 9/10) de la suspensión celular fueron inoculados sobre la superficie del medio LB sólido suplementado con el antibiótico apropiado para la selección (habitablemente ampicilina a 150 μ g/mL).

3.3.7. Secuenciación de ADN

La secuencia nucleotídica de los plásmidos recombinantes y fragmentos clonados fue obtenida mediante secuenciación automática de ADN, utilizando los servicios de la compañía *SeqWright* (http://www.seqwright.com).

3.3.8. Análisis bioinformático de secuencias de ADN

Las secuencias de nucleotídicas y polipeptídicas deducidas fueron analizadas utilizando servidores en línea: *ORFfinder* del Centro Nacional de Información en Biotecnología de los E.U.A. (NCBI, http://www.ncbi.nlm.nih.gov) y *Translate* del Sistema Experto en Análisis de Proteínas de Suiza (EXPASY, http://www.expasy.ch). Adicionalmente, se utilizó el programa *Gene Construction Kit*TM v2.4. (*Textco, Inc.*) para facilitar el manejo de datos y construcción in silico de plásmidos. El programa *pDRAW32* v1.1.106 para *Windows (AcaClone software)* fue utilizado para la visualización de plásmidos y construcciones.

3.3.9. Análisis estadístico

Los parámetros estadísticos de media, desviación estándar, correlación, así como la determinación del valor del tiempo de duplicación fueron calculados utilizando el programa *GraphPad Prism*[®] v5.0 (*GraphPad Software, Inc.*).

3.4. Estrategia de construcción del vector pYEhPDI

3.4.1. Diseño de oligonucleótidos

Para la construcción del vector pY*Eh*PDI, se diseñaron cuatro oligonucleótidos: el primero de estos, BXPS, es un oligonucleótido de fusión que hibrida tanto con la región 5' (promotor - péptido señal) como con la región 3' (señal de retención - señal de la poliadenilación) del gen *Sc*PDI1; además, posee una región intermedia de reconocimiento para las endonucleasas *Bam*HI y *Xho*I (Tabla 3; Figura 10).

El segundo oligonucleótido, XDEL2, hibrida también en la región 3' (señal de retención - señal de la poliadenilación) del gen *Sc*PDI1 y posee un sitio de reconocimiento para la endonucleasa *Xho*I.

Los otros 2 oligonucleótidos fueron diseñados para amplificar al polipéptido maduro de *Eh*PDI (y sus variantes): NB*Eh*PDI, hibrida con la región amino y posee el sitio de reconocimiento para la endonucleasa *Bam*HI; y, CX*Eh*PDI, hibrida en la región carboxilo y posee el sitio de reconocimiento para la endonucleasa *Xho*I.

3.4.2. Estrategia de amplificación

Amplificación de las regiones 5' y 3' del gen ScPDI1 [PCRs 5'ScPDI1 y 3'ScPDI1]. Utilizando como molde el plásmido pCT38, se realizaron dos reacciones de PCR independientes para amplificar las regiones 5' y 3' del gen *Sc*PDI1. Se prepararon mezclas independientes (50 μL) conteniendo 10 ng de ADN plasmídico, 2.5 U de *Taq* ADN polimerasa, 0.3 μM de los oligonucleótidos (BXPS y RV para la región 5'; o XDEL2.RM y FW para la región 3'), 200 μM de dNTPs y las condiciones óptimas para la reacción (solución amortiguadora: 10 mM de Tris-



Figura 10. Representación grafica de la estrategia de amplificación de la unidad transcripcional para la expresión de *E. histolytica* en levadura. Las regiones reguladoras (promotor y terminador) del gen *Sc*PDI1 están señaladas. Las flechas representan la posición y orientación de los oligonucleótidos utilizados en la construcción de las mutantes.

HCl, pH 8.3; 50 mM de Cloruro de potasio; y 1.5 mM de Cloruro de magnesio). La amplificación se realizó utilizando las condiciones estándar de termociclado (protocolo general 3.3.4). El producto de amplificación fue analizado mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.5 % (protocolo general 3.3.5) y, finalmente, purificado utilizando un estuche comercial (protocolo general 3.3.3).

Amplificación del gen EhPDI silvestre [PCR EhPDI]. La codificante secuencia para el polipéptido maduro del gen EhPDI fue amplificada utilizando el plásmido pBPelBEhPDI como molde. Se preparó una mezcla (50

Tabla	4. Nomencla	tura utilizada para	la	
identifi	cación de los _l	productos de PCR de	las	
variantes de EhPDI.				
PPCR	N-Tx / C-Tx	Mutación		
EhPDI	CGHC / CGHC	silvestre		
RM05	SGHS / CGHC	C44S, C47S		
RM06	CGHC / SGHS	C160S, C163S		
RM07	SGHC / SGHC	C44S, C160S		
RM10	CGHS / CGHS	C47S, C163S		
RM15	SGHS / SGHS	C44S, C47S, C143S, C163S		

 μ L) conteniendo 10 ng de ADN plasmídico, 2.5 U de *Taq* ADN polimerasa, 0.3 μ M de los oligonucleótidos (NB*Eh*PDI y CX*Eh*PDI), 200 μ M de dNTPs y las condiciones óptimas para la reacción (solución amortiguadora: 10 mM de Tris-HCl, pH 8.3; 50 mM de Cloruro de potasio; y 1.5 mM de Cloruro de magnesio). La amplificación se realizó utilizando las condiciones estándar de termociclado (protocolo general 3.3.4). El producto de amplificación fue analizado mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.5 % (protocolo general 3.3.5) y, finalmente, purificado utilizando un estuche comercial (protocolo general 3.3.3).

Amplificación de las variantes del gen EhPDI. Las versiones mutantes del gen *Eh*PDI fueron amplificadas utilizando como molde los plásmidos pRM05, pRM06, pRM07, pRM10 y pRM15 (Tabla 4) [31]. Para cada variante, se realizó una reacción de PCR independiente, siguiendo el procedimiento de amplificación del gen *Eh*PDI silvestre.

3.4.3. Construcción del vector p13XDEL2

El producto de PCR 3'*Sc*PDI1 (correspondiente a la región terminadora) y el plásmido pRS413 fueron digeridos con las endonucleasas de restricción *Xho*I y *Sac*I. Se prepararon dos mezclas independientes de digestión (25 µL) conteniendo 1 µg del producto PCR o 500 ng del vector, 20 U de ambas endonucleasas y las condiciones óptimas para la reacción (solución amortiguadora: 50 mM de Acetato de potasio; 20 mM de Tris-acetato, pH 7.9; 10 mM de Acetato de magnesio; y 1 mM de Ditiotreitol). La reacción de digestión se llevo a cabo durante 2 h a 37 °C.

Adicionalmente, el vector pRS413 fue defosforilado utilizando 10 U de fosfatasa alcalina (*bCIP*) durante 30 min a 37 °C. Posteriormente, el vector (digerido y defosforilado) fue analizado mediante electroforesis en agarosa al 1.5 % (protocolo general 3.3.5) y purificado (a partir de gel de agarosa) utilizando un estuche comercial (protocolo general 3.3.2). Por otro lado, el producto de PCR 3'*Sc*PDI1 digerido fue purificado utilizando un estuche comercial (protocolo general 3.3.3).

La reacción de ligación de la región terminadora del gen *Sc*PDI1 y el plásmido pRS413 se realizó utilizando la enzima ADN ligasa del bacteriófago T₄. Una mezcla de ligación (10 μ L) se preparó mezclando 5 ng del vector digerido y defosforilado, 25 ng del inserto digerido, 1 U de T₄ ADN ligasa, y las condiciones óptimas para la reacción (solución amortiguadora: 50 mM de

Tris-HCl, pH 7.5; 10 mM de Cloruro de magnesio; 10 mM de Ditiotreitol; y 1 mM de ATP). La reacción se llevó a cabo durante la noche a 16 °C.

El producto de la ligación pRS413/3'ScPDI1 fue transfectado en células competentes *E. coli* XL1-Blue MRF' mediante choque térmico (protocolo general 3.3.6). Los cultivos fueron incubados durante la noche a 37 °C. Las unidades formadoras de colonias capaces de crecer en presencia de ampicilina fueron consideradas como transformantes estables. Para la identificación de clonas positivas (es decir, que contengan la región terminadora del gen *Sc*PDI1), aleatoriamente se seleccionaron varias colonias, se cultivaron en medio líquido LB-Amp y se realizó una extracción del plásmido (protocolo general 3.3.1). Posteriormente, se realizó un análisis de restricción, utilizando las endonucleasas *SacI* y *XhoI*, basado en la variabilidad de la longitud de los fragmentos de restricción. Los productos de la digestión fueron analizadas mediante electroforesis en gel de agarosa al 2 % (protocolo general 3.3.5). Las clonas positivas fueron designadas como p13XDEL2.

3.4.4. Construcción del vector p13PsXDEL2

El producto de PCR 5'*Sc*PDI1 (correspondiente a la región promotora) y el plásmido p13XDEL2 fueron digeridos con las endonucleasas de restricción *Apa*I y *Xho*I. Inicialmente, se prepararon dos mezclas independientes de digestión (25 μ L) conteniendo 1 μ g del producto PCR o 500 ng del vector, 20 U de la endonucleasa *Apa*I y las condiciones óptimas para la reacción (solución amortiguadora: 50 mM de Acetato de potasio; 20 mM de Tris-acetato, pH 7.9; 10 mM de Acetato de magnesio; y 1 mM de Ditiotreitol). La reacción de digestión se llevó a cabo durante 1 h a 25 °C.

Posteriormente, se realizó la segunda digestión, con 20 U de la enzima *Xho*I, en un volumen final de 50 μ L, donde las concentraciones de la mezcla de reacción fueron ajustadas. La reacción de digestión se llevo a cabo durante 1 h a 37 °C.

Adicionalmente, el plásmido p13XDEL2 fue defosforilado utilizando 10 U de fosfatasa alcalina (*bCIP*) durante 30 min a 37 °C. Posteriormente, el vector (digerido y desfosforilado) fue analizado mediante electroforesis en agarosa al 1.5 % (protocolo general 2.3.5.) y purificado (a partir de gel de agarosa) utilizando un estuche comercial (protocolo general 3.3.2). Por otro lado, el producto de PCR 5'*Sc*PDI1 digerido fue purificado utilizando un estuche comercial (protocolo general 3.3.3).

La reacción de ligación de la región promotora del gen *Sc*PDI1 y el plásmido p13XDEL2 se realizó utilizando la enzima ADN ligasa del bacteriófago T₄. Un mezcla de ligación (10 μ L) se preparó mezclando 5 ng del vector digerido y defosforilado, 25 ng del inserto digerido, 1 U de T₄ ADN ligasa y las condiciones óptimas para la reacción (solución amortiguadora: 50 mM de Tris-HCl, pH 7.5; 10 mM de Cloruro de magnesio; 10 mM de Ditiotreitol; y 1 mM de ATP). La reacción se llevó a cabo durante la noche a 16 °C.

El producto de la ligación p13XDEL2/5'ScPDI1 fue transfectado en células competentes *E. coli* XL1-Blue MRF' mediante choque térmico (protocolo general 3.3.6). Los cultivos fueron incubados durante la noche a 37 °C. Las unidades formadoras de colonias capaces de crecer en presencia de ampicilina fueron consideradas como transformantes estables. Para la identificación de clonas positivas (es decir, que contengan la región promotora del gen *Sc*PDI1), aleatoriamente se seleccionaron varias colonias, se cultivaron en medio líquido LB-Amp y se realizó una extracción del plásmido (protocolo general 3.3.1). Posteriormente, se realizó un análisis

55

endonucleolítico, utilizando las endonucleasas *Apa*I y *Xho*I, basado en la variabilidad de la longitud de los fragmentos de restricción. Los productos de la digestión fueron analizadas mediante electroforesis en gel de agarosa al 2 % (protocolo general 3.3.5). Las clonas positivas fueron designadas como p13PsXDEL2.

3.4.5. Construcción del vector pYEhPDI

El producto de PCR *Eh*PDI (correspondiente a la secuencia codificante para el polipéptido maduro) y el plásmido p13PsXDEL2 fueron digeridos con las endonucleasas de restricción *Bam*HI y *Xho*I. Se prepararon dos mezclas independientes de digestión (25 μ L) conteniendo 1 μ g del producto PCR o 500 ng del vector, 20 U de ambas endonucleasas y las condiciones óptimas para la reacción (solución amortiguadora: 10 mM Tris-HCl, pH7.9; 50 mM de Cloruro de sodio; 10 mM de Cloruro de magnesio; y 1 mM de Ditiotreitol). La reacción de digestión se llevo a cabo durante 2 h a 37 °C.

Adicionalmente, el plásmido p13PsXDEL2 fue defosforilado utilizando 10 U de fosfatasa alcalina (*bCIP*) durante 30 min a 37 °C. Posteriormente, el vector (digerido y defosforilado) fue analizado mediante electroforesis en agarosa al 1.5 % (protocolo general 3.3.5) y purificado (a partir de gel de agarosa) utilizando un estuche comercial (protocolo general 3.3.2). Por otro lado, el producto de PCR *Eh*PDI digerido fue purificado utilizando un estuche comercial (protocolo general 3.3.3).

La reacción de ligación de la secuencia codificante para el péptido maduro del gen *Eh*PDI y el plásmido p13PsXDEL2 se realizó utilizando la enzima ADN ligasa del bacteriófago T₄. Una mezcla de ligación (10 μ L) se preparó mezclando 10 ng del vector digerido y desfosforilado, 25

ng del inserto digerido, 1 U de T_4 ADN ligasa y las condiciones óptimas para la reacción (solución amortiguadora: 50 mM de Tris-HCl, pH 7.5; 10 mM de Cloruro de magnesio; 10 mM de Ditiotreitol; y 1 mM de ATP). La reacción se llevó a cabo a temperatura ambiente durante 2 h.

El producto de la ligación p13XDEL2/*Eh*PDI fue transfectado en células competentes *E. coli* XL1-Blue MRF' mediante choque térmico (protocolo general 3.3.6). Los cultivos fueron incubados durante la noche a 37 °C. Las unidades formadoras de colonias capaces de crecer en presencia del ampicilina fueron consideradas como transformantes estables. Para la identificación de clonas positivas (es decir, que contengan la secuencia codificante para el péptido maduro de la enzima *Eh*PDI) aleatoriamente se seleccionaron varias colonias, se cultivaron en medio líquido LB-Amp y se realizó una extracción del plásmido (protocolo general 3.3.1).

Posteriormente, se realizó un análisis endonucleolítico, utilizando las endonucleasas *Bam*HI y *Xho*I, basado en la variabilidad de la longitud de los fragmentos de restricción. Los productos de la digestión fueron analizados mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.5% (protocolo general 3.3.6). Las clonas positivas fueron designadas como pY*Eh*PDI.

3.5. Estrategia de construcción de los vectores que portan las variantes de EhPDI

Los plásmidos que portan una variante del gen *Eh*PDI fueron obtenidos siguiendo el procedimiento utilizado para la construcción del vector pY*Eh*PDI (materiales y métodos 3.4.5). Las mutaciones presentes en las variantes del gen *Eh*PDI (RM05, RM06, RM07, RM10 y RM15) se muestran en las Tabla 5. Las variantes del gen *Eh*PDI fueron caracterizadas mediante un análisis de restricción, utilizando las endonucleasas *Nco*I, *Bst*BI y *Xho*I.

Para digestiones simples, se preparó una mezcla de reacción (10 μ L) conteniendo 250 ng del plásmido purificado, 1 U de la enzima *Bst*BI y las condiciones óptimas para la reacción (solución amortiguadora: 20 mM de Tris-acetato, pH 7.9; 10 mM

Tabla 5. Nomenclatura utilizada para la identificación de los vectores que expresan las variantes de *Eh*PDI.

Variante	N-Tx / C-Tx	Mutación
PY <i>Eh</i> PDI	CGHC / CGHC	Silvestre
pYRM05	SGHS / CGHC	C44S, C47S
pYRM06	CGHC / SGHS	C160S, C163S
pYRM07	SGHC / SGHC	C44S, C160S
pYRM10	CGHS / CGHS	C47S, C163S
pYRM15	SGHS / SGHS	C44S, C47S, C143S, C163S

de acetato de magnesio; 50 mM acetato de potasio; y 1 mM de Ditiotreitol). La reacción fue llevada a cabo durante 1 h a 65°C. Por otro lado, para digestiones dobles, se preparó una mezcla de reacción (10 µL) conteniendo 250 ng del plásmido purificado, 1 U de *Nco*I, 1 U *Xho*I y las condiciones óptimas para la reacción (20 mM de Tris-acetato, pH 7.9; 10 mM de Acetato de magnesio; 50 mM de Acetato de potasio; y 1 mM de Ditiotreitol). La mezcla fue incubada durante 1 h a 37°C. Cada mutante fue nombrada de acuerdo al plásmido parental correspondiente (Tabla 5). Posteriormente, los productos de restricción fueron analizados mediante electroforesis en gel de agarosa al 2.0 % (protocolo general 3.3.5).

3.6. Estrategia de construcción del vector pYScPDI

Mediante un análisis bioinformático del patrón de restricción del plásmido pCT38, se observó que la unidad transcripcional del gen *Sc*PDI1 puede ser obtenida utilizando las endonucleasas de restricción *Apa*I y *Sac*II; además, puede ser subclonada en el plásmido pRS413. Para este fin, se utilizó el plásmido pYRM15 como aceptor de la unidad transcripcional.

Los plásmidos pCT38 y pYRM15 fueron digeridos con las endonucleasas *Apa*I y *Sac*II. Se prepararon dos mezclas independientes de digestión (25 µL) conteniendo 500 ng de vector, 20 U de ambas enzimas y las condiciones óptimas para la reacción (solución amortiguadora: 10 mM de Tris-HCl, pH7.9; 50 mM de Cloruro de sodio; 10 mM de Cloruro de magnesio; y 1 mM de Ditiotreitol). La reacción de digestión se llevo a cabo durante 2 h a 37°C.

Adicionalmente, el vector pYRM15 fue defosforilado utilizando 10 U de la enzima fosfatasa alcalina (*bCIP*) durante 30 min a 37°C. Posteriormente, el vector (digerido y defosforilado) fue analizado mediante electroforesis en agarosa al 1.5 % (protocolo general 3.3.5) y purificado (a partir de gel de agarosa) utilizando un estuche comercial (protocolo general 3.3.2). Por otro lado, el producto de digestión *Sc*PDI1 fue purificado utilizando un estuche comercial (protocolo general 3.3.3).

La reacción de ligación de la unidad transcripcional del gen *Sc*PDI1 y el vector pRS413 (parental de pYRM15) se realizó utilizando la enzima ADN ligasa del bacteriófago T₄. Una mezcla de ligación (10 μ L) se preparó mezclando 10 ng del vector digerido y desfosforilado, 25 ng del inserto digerido, 1 U de la enzima T₄ ADN ligasa y las condiciones óptimas para la reacción (solución amortiguadora: 50 mM de Tris-HCl, pH 7.5; 10 mM de Cloruro de magnesio; 10 mM de Ditiotreitol; y 1 mM de ATP). La reacción se llevó a cabo a temperatura ambiente durante 2 h.

El producto de la ligación pRS413/ScPDI1 fue transfectado en células competentes *E. coli* XL1-Blue MRF´ mediante choque térmico (protocolo general 3.3.6). Los cultivos fueron incubados durante la noche a 37 °C. Las unidades formadoras de colonias capaces de crecer en presencia de ampicilina fueron consideradas como transformantes estables. Para la identificación

de clonas positivas (es decir, que contengan la unidad transcripional *Sc*PDI1) aleatoriamente se seleccionaron varias colonias, se cultivaron en medio líquido LB-Amp y se realizó una extracción del plásmido (protocolo general 3.3.1).

Posteriormente, se realizó un análisis endonucleolítico, utilizando las endonucleasas *Apa*I y *Sac*II, basado en la variabilidad de la longitud de los fragmentos de restricción. Los productos de la digestión fueron analizados mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.5 % (protocolo general 3.3.5). Las clonas positivas fueron designadas como pY*Sc*PDI.

3.7. Aislamiento de la cepa mutante haploide *APDI1/pCT38* de S. cerevisiae

3.7.1. Preparación del plásmido pCT38 a alta concentración

Para obtener una alta concentración del plásmido pCT38, se obtuvo la pastilla celular de un cultivo bacteriano de 50 mL (LB-Amp) de la cepa *E. coli* XL1-Blue MRF⁻ portadora de plásmido. Posteriormente, se realizaron mini-purificaciones de alta concentración utilizando un estuche comercial (protocolo general 3.3.1). La determinación de la concentración del ADN plasmídico se realizó mediante espectrofotometría UV (260/280 nm).

3.7.2. Preparación de células de levadura BY4743-YCL043c electrocompetentes

A partir de un cultivo joven, se aisló una colonia de la cepa heterocigota diploide BY4743-YCL043c de *S. cerevisiae* y se inoculó en 50 mL de medio YPD suplementado con 200 μ g/mL de G418. El cultivo de incubó a 30 °C, con agitación vigorosa (300-350 rpm), hasta

obtener una densidad de 1 x 10^8 células/mL. Posteriormente, las células fueron cosechadas, lavadas y resuspendidas en un volumen final de 0.5 mL de 1 M de sorbitol frío, estéril.

3.7.3. Transformación de células de levadura BY4743-YCL043c

El plásmido pCT38 fue transfectado en las células electrocompetentes de la cepa heterocigota diploide BY4743-YCL043c de *S. cerevisiae* mediante choque eléctrico. En un microtubo, se preparó una mezcla conteniendo 1 μ g del plásmido y 200 μ L de células competentes, se mantuvo en hielo durante 5 min y se transfirió a una celda de electroporación de 2 mm. Para el choque eléctrico, se utilizaron las siguientes condiciones: 25 μ F de capacitancia, 200 ohms de resistencia y un voltaje de 2.5 KV. Después del pulso de electroporación, las células fueron recuperadas mediante la adición de 1 mL de 1 M sorbitol estéril e incubación a 30°C (con agitación suave, 100 rpm) durante 15 min.

Las transfectantes diploides estables URA⁺ fueron seleccionadas en medio SD suplementado con 20 mg/L de histidina, 60 mg/L de leucina y 200 µg/mL de G418. A partir de la suspensión de células recuperadas, 200 µL fueron sembrados (plaqueados) en la superficie del medio selectivo e incubada durante 48 h a 30 °C. Las unidades formadoras de colonias capaces de crecer en presencia del antibiótico y en ausencia de uracilo fueron consideradas como transfectantes estables, las cuales fueron nombradas como cepa heterocigota diploide BY4743-YCL043c/pCT38.

3.7.4. Análisis aleatorio de esporas (Random Spore Analysis)

Esporulación. A partir de un cultivo joven, se aisló una colonia de la cepa heterocigota diploide BY4743-YCL043c/pCT38 de *S. cerevisiae* y se sembró en medio sólido YPD suplementado con 200 μ g/mL de G418. El cultivo de incubó a 30 °C durante 12-16 h; posteriormente, un colonia fue aislada e inoculada en 2.5 mL de medio de esporulación (1% de Acetato de potasio; 0.025% de Glucosa; y 200 μ g/mL de G418). La esporulación se llevó a cabo durante 10 días, incubando el cultivo a 25 °C con agitación (300-350 rpm).

Obtención de esporas. En un tubo cónico estéril, se cosecharon las células de 1 mL del cultivo de esporulación y se resuspendieron en 0.2 mL de agua estéril. La ruptura y liberación de esporas se realizó añadiendo 500 U de β -glucoronidasa e incubando durante 1 h a 30 °C (con agitación, 300 rpm); posteriormente, se agregaron 0.15 g de perlas de vidrio (0.5 mm) y se continuo la incubación durante 1 h a 30 °C (con agitación, 300 rpm). Finalmente, se añadió 1 mL de agua estéril. Para completar la ruptura y liberación de esporas, la suspensión celular fue lisada vigorosamente mediante agitación en vórtex durante 2 min y se añadieron 4 mL de agua estéril. Este procedimiento garantiza la liberación de esporas en un 5 - 10% de las células diploides.

Las esporas (células haploides) estables Δ PDI1/pCT38 URA⁺ de *S. cerevisiae* fueron seleccionadas en medio SD suplementado con 20 mg/L de histidina, 60 mg/L de leucina y 200 µg/mL de G418. Inicialmente, se realizaron diluciones de 10⁻¹ a 10⁻³ de la suspensión de esporulación y sembraron (plaquearon) 200 µL en la superficie del medio selectivo. Los cultivos fueron incubados durante 48 h a 30 °C.

3.7.5. Identificación de la cepa mutante haploide *APDI1/pCT38* de S. cerevisiae

La cepa mutante haploide Δ PDI1/pCT38 de *S. cerevisiae* fue identificada mediante un análisis de crecimiento en medios selectivos. Las unidades formadoras colonias (obtenidas mediante el análisis aleatorio de esporas) fueron resembradas en los medios sintéticos

Tabla 6. Medios de cultivo para selección de células haploides ΔPDI1/pCT38.			
Componente	SD+HLW	SC+HLW+U/FOA	
YNB	0.67 %	0.67 %	
Glucosa	2 %	2 %	
G418	200 µg/mL	200 μg/mL	
Histidina	20 mg/L	20 mg/L	
Leucina	60 mg/L	60 mg/L	
Triptófano	20 mg/L	20 mg/L	
Uracilo	-	20 mg/L	
5-FOA	-	0.1 %	

SD+HLW (carente de uracilo y FOA) y SD+HLW+U/FOA (suplementado con uracilo y FOA) (Tabla 6). Los cultivos fueron incubados durante 72 - 96 h a 30 °C. Aquellas unidades formadoras de colonias capaces de crecer en ausencia de uracilo/FOA e incapaces de crecer en presencia de éstos, fueron consideradas como clonas positivas.

Además, se realizó un análisis de auxotrofías, utilizando medios sintéticos selectivos. La composición y concentración de cada medio selectivo se muestra en Tabla 7. Las clonas

Tabla 7. Medios selectivos utilizados para caracterización de auxotrofías de la cepa haploide $\Delta PDI1/pCT38$. Componente SD -H SD -L SD -U SD-W YNB 0.67 % 0.67 % 0.67 % 0.67 % Glucosa 2 % 2 % 2 % 2 % G418 200 µg/mL 200 µg/mL 200 µg/mL 200 µg/mL Histidina ---20 mg/L 20 mg/L 20 mg/L 60 mg/L 60 mg/L Leucina 60 mg/L 20 mg/L 20 mg/L Uracilo 20 mg/L --Triptófano 20 mg/L 20 mg/L 20 mg/L --

positivas fueron sembradas en los 4 medios sintéticos. Los cultivos fueron incubados durante 72 - 96 h a 30 °C. Aquellas unidades formadoras de colonias con el fenotipo deseado fueron nombradas como cepa mutante haploide Δ PDI1/pCT38 de *S. cerevisiae*.

3.8. Complementación de la mutante haploide *APDI1/pCT38* de S. cerevisiae

3.8.1. Preparación de los plásmidos pYScPDI, pYEhPDI y pYRMs a alta concentración

Para obtener una alta concentración de los plásmidos pY*Sc*PDI, pY*Eh*PDI y las variantes pYRM (Tabla 5), se obtuvo la pastilla celular de un cultivo bacteriano de 50 mL (LB-Amp) de la cepa XL1-Blue MRF' *E. coli* portadora del plásmido de interés. Posteriormente, se realizaron mini-purificaciones de alta concentración utilizando un estuche comercial (protocolo general 3.3.1). La determinación de la concentración del ADN plasmídico se realizó mediante espectrofotometría UV (260/280 nm).

3.8.2. Preparación de células electrocompetentes *APDI1/pCT38* de S. cerevisiae

A partir de un cultivo joven, se aisló una colonia de la cepa mutante haploide Δ PDI1/pCT38 de *S. cerevisiae* y se inoculó en 50 mL de medio líquido SD suplementado con 200 µg/mL de G418. El cultivo de incubó a 30 °C, con agitación vigorosa (300-350 rpm), hasta obtener una densidad de 1 x 10⁸ células/mL. Posteriormente, las células fueron cosechadas, lavadas y resuspendidas en un volumen final de 0.5 mL de 1 M sorbitol frío, estéril.

3.8.3. Transformación de la cepa mutante haploide *APDI1/pCT38* de S. cerevisiae

El plásmido pY*Sc*PDI, pY*Eh*PDI, o sus variantes pYRM (Tabla 5), fueron transfectados en las células electrocompetentes de la cepa mutante haploide Δ PDI1/pCT38 de *S. cerevisiae* mediante choque eléctrico.

En un microtubo, se preparó una mezcla conteniendo 1 µg del plásmido y 200 µL de células competentes, se mantuvo en hielo durante 5 min y se transfirió a una celda de electroporación de 2 mm. Para el choque eléctrico, se utilizaron las siguientes condiciones: 25 µF de capacitancia, 200 ohms de resistencia y un voltaje de 2.5 KV. Después del pulso de electroporación, las células fueron recuperadas mediante la adición de 1 mL de 1 M sorbitol estéril e incubación a 30°C (con agitación suave, 100 rpm) durante 15 min.

Las transfectantes (mutantes haploides) estables Δ PDI/pCT38/pYScPDI, Δ PDI/pCT38/pYEhPDI o Δ PDI/pCT38/pYRMs URA⁺ HIS⁺ de S. cerevisiae fueron seleccionadas en medio SD suplementado con 60 mg/L de leucina y 200 µg/mL de G418. A partir de la suspensión de células recuperadas, 200 µL fueron sembrados (plaqueados) en la superficie del medio selectivo e incubada durante 48 h a 30 °C.

Las unidades formadoras de colonias capaces de crecer en presencia del antibiótico y en ausencia de uracilo e histidina fueron consideradas como transfectantes estables, las cuales fueron nombradas como mutantes haploides Δ PDI1/pCT38/pYScPDI, Δ PDI1/pCT38/pYEhPDI o Δ PDI1/pCT38/pYRMs de *S. cerevisiae*.

3.8.4. Ensayo de intercambio de plásmidos

Las cepas mutantes haploides transfectantes estables $\Delta PDI1/pCT38/pYScPDI$, $\Delta PDI1/pCT38/pYEhPDI$ o $\Delta PDI1/pCT38/pYRMs$ de *S. cerevisiae* fueron sometidas a un ensayo de intercambio de plásmidos (*plasmid shuffling*) con el fin de conocer sí la enzima *EhPDI*, o sus variantes pRMYs, complementan la función de la enzima *ScPDI1* (el plásmido pY*ScPDI* fue utilizado como control positivo del ensayo). Las cepas mutantes haploides trasnfectantes estables fueron sembradas en los medios sintéticos SD+L (carente de uracilo y FOA) y SD+L+U/FOA

(suplementado con uracilo y FOA) (Tabla 8).

Los cultivos fueron incubados durante 96 - 120 h a 30 °C. Aquellas unidades formadoras de colonias capaces de rescatar el fenotipo letal; es decir, capaces de crecer en presencia de uracilo/FOA, fueron consideradas como clonas positivas (complementantes).

Tabla 8. N	1edios de	cultivo para el		
ensayo	ensayo de complementaci			
funcional.				
Componente	SD+L	SD+L+U/FOA		
VALD	0.67.0/	0.67.0/		
YNB	0.67 %	0.67 %		
Glucosa	2%	2%		
G418	200 µg/m	ιL 200 μg/mL		
Leucina	60 mg/L	60 mg/L		
Uracilo		20 mg/L		
FOA		0.1 %		

Además, se realizó un análisis de

auxotrofías, utilizando medios sintéticos selectivos. La composición y concentración de cada medio selectivo se muestra en Tabla 9. Las clonas complementantes positivas fueron sembradas en los 4 medios sintéticos. Los cultivos fueron incubados durante 72 h a 30 °C. Aquellas unidades formadoras de colonias con el fenotipo deseado fueron nombradas como cepas mutantes haploides $\Delta PDI1/pYScPDI$, $\Delta PDI1/pYEhPDI$, $\Delta PDI1/pYRMs$ de *S. cerevisiae*.

Tabla 9. Medios de cultivo utilizados para la caracterización de auxotrofías de las células complementantes de la función de ScPDI1.				
Componente	SD -H	SD -L	SD -U	SD -W
YNB	0.67 %	0.67 %	0.67 %	0.67 %
Glucosa	2 %	2 %	2 %	2 %
G418	200 μg/mL	200 µg/mL	200 µg/mL	200 μg/mL
Histidina	-	20 mg/L	20 mg/L	20 mg/L
Leucina	60 mg/L	-	60 mg/L	60 mg/L
Uracilo	20 mg/L	20 mg/L	-	20 mg/L
Triptófano	20 mg/L	20 mg/L	20 mg/L	-

3.9. Curvas de crecimiento celular

Las cepas mutantes haploides Δ PDI1/pY*Sc*PDI, Δ PDI1/pY*Eh*PDI y Δ PDI1/pYRM06 de *S. cerevisiae* capaces de complementar el fenotipo letal fueron caracterizadas mediante la determinación del tiempo de duplicación, utilizando curvas de crecimiento celular. A partir de cultivos jóvenes, se aislaron colonias, se inocularon en 5 mL de medio líquido YPD suplementado con 200 µg/mL de G418 y se incubó a 30°C durante 24 h, con agitación vigorosa (300 – 350 rpm). Para normalizar la cantidad de células presentes en cada cultivo, se estimó la densidad celular mediante espectrofotometría (DO₆₅₀). Posteriormente, se transfirieron 0.1 U DO₆₅₀ a 3 mL de medio de cultivo fresco (YPD suplementado con 200 µg/mL de G418). Los cultivos se incubaron a 30 °C, con agitación vigorosa (300 – 350 rpm), durante 10 h. El primer registró de DO₆₅₀ se realizó a los 5 min (t = 0); enseguida, la cinética de crecimiento celular fue monitoreada registrando la DO₆₅₀ cada hora.

Las curvas de crecimiento celular fueron realizadas por duplicado y las determinaciones del tiempo de duplicación resultan del promedio de dos experimentos independientes. El tiempo de duplicación celular fue calculado a partir de la rapidez específica de crecimiento celular, utilizando la siguiente ecuación:

$$t = ln2/\mu$$

Donde µ representa la rapidez especifica de crecimiento celular y t el tiempo de duplicación.

3.10. Inmunodetección de EhPDI mediante western blot

3.10.1. Extracción de proteínas totales

Las proteínas totales fueron preparadas a partir de cultivos jóvenes, siguiendo un protocolo reportado en la literatura [1]. Brevemente, una pastilla celular de 2.5 U DO₆₅₀ fue lavada mediante la adición de 0.2 mL de 0.1 M de NaOH, incubada a temperatura ambiente durante 5 min y centrifugada durante 2 min a 10,000 rpm. La pastilla celular, tratada con álcali, fue resuspendida en 50 μ L de amortiguador de carga 2X, desnaturalizante y reductor (0.05 M de Tris-HCl, pH 6.8; 10 % de Glicerol; 2.5 % de Dodecil sulfato de sodio; 5 % de 2-Mercaptoetanol; y 0.002 % de Azul de bromofenol). La lisis y desnaturalización por calor se llevo a cabo durante 10 min a 95°C. El lisado celular fue mantenido en hielo hasta su aplicación en los ensayos de *SDS-PAGE* y *Western blot*.

3.10.2. Electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

El análisis cualitativo de la expresión de *Eh*PDI, de su variante RM06, y del control *Sc*PDI1 fue realizado mediante la separación electroforética de proteínas en gel de poliacrilamida, en condiciones desnaturalizantes y reductoras (*SDS-PAGE*). Después de un pulso

de centrifugación, 6 µL del extracto proteico (sobrenadante) fueron cargados en un gel de poliacrilamida al 12.5 %. Dos geles fueron preparados de acuerdo a protocolos estándar de laboratorio [50], uno para tinción con azul de *Coomassie* y otro para un análisis tipo *Western blot* (*WB*).

3.10.3. Electrotransferencia de proteínas e inmunodetección (Western blot)

Después de la separación electroforética, las proteínas fueron electrotransferidas a una membrana de nitrocelulosa, utilizando el sistema *Criterion*TM *Blotter (BioRad)* y siguiendo las instrucciones proporcionadas por el proveedor: inicialmente, el gel fue equilibrado con el amortiguador de transferencia frío (25 mM de Tris; 192 mM de Glicina; 10 % de Metanol); posteriormente, se preparó un sistema de transferencia tipo emparedado (absorbente-gel-nitrocelulosa-absorbente); y enseguida, se procedió a la electrotransferencia, durante 30 min a 100 V; finalmente, la membrana de nitrocelulosa fue separada del emparedado y se procedió al reconocimiento con anticuerpos (inmunodetección).

Previo al reconocimiento, la membrana de nitrocelulosa fue bloqueada durante la noche con solución de bloqueo (10 mM de Tris-HCl, pH 7.5; 150 mM de Cloruro de sodio; 0.05 % de $Tween^{\text{(B)}}$ 20; y 5 % de leche $Svelty^{\text{TM}}$ [Nestle^(B)]). Al día siguiente, la membrana de nitrocelulosa fue lavada con TBST (10 mM de Tris-HCl, pH 7.5; 150 mM de Cloruro de sodio; y 0.05 % de $Tween^{\text{(B)}}$ 20) durante 30 minutos (3 lavados de 10 min). El reconocimiento primario fue realizado utilizando un anticuerpo policional de conejo anti-*Eh*PDI (dilución 1:1000 en TBST) durante 1 h. La membrana de nitrocelulosa fue lavada nuevamente con TBST durante 30 min. El reconocimiento secundario fue realizado utilizando un anticuerpo policional de conejo anti-*Eh*PDI (dilución 1:1000 en TBST) durante 1 h.

conjugado a fosfatasa alcalina (dilución 1:5000 en TBST) durante 1 h. La membrana fue lavada nuevamente con TBST durante 30 min. Finalmente, el reconocimiento indirecto fue revelado utilizando una solución que contiene una mezcla del sustrato cromogénico para fosfatasa alcalina BCIP (fosfato de 5-bromo-4-cloro-3-indol) y el amplificador de la señal NBT (nitroazul de tetrazolio). La reacción se detuvo (a criterio) agregando una solución 5 mM de EDTA, pH 8.0.

3.11. Análisis cualitativo de la presencia del gen EhPDI y su variante RM06 en la cepa haploide ΔPDI1

3.11.1. Extracción de plásmido a partir de células de levadura

El análisis cualitativo de la presencia de los genes *Eh*PDI silvestre así como la variante RM06 en la cepa mutante haploide Δ PDI1/pY*Eh*PDI o Δ PDI1/pYRM06 de *S. cerevisiae*, respectivamente, se realizó mediante la amplificación y detección por PCR, utilizando un protocolo estándar [1], ligeramente modificado. Brevemente, a partir de un cultivo joven de 1.4 mL (crecido en medio YPD suplementado con 200 µg/mL de G418) se cosechó el paquete celular y, posteriormente, fue resuspendido en 200 µL de solución de lisis (2 % de *Triton*[®] X-100; 1 % de dodecil sulfato de sodio; 100 mM de Cloruro de sodio; 10 mM de Tris-HCl; pH 8.0; y 1 mM de EDTA). En seguida, se adicionaron 200 µL de una solución fenol:cloroformo:alcohol-isoamílico (25:24:1) y 0.3 g de perlas de vidrio tratados con ácido. La lisis celular fue favorecida por agitación tipo vortex durante 2 min. Finalmente, se realizaron dos extracciones con 1 vol de cloroformo. La fase acuosa fue separada y utilizada para la amplificación por PCR de los genes *Sc*PDI1, *Eh*PDI y RM06.

3.11.2. Amplificación por PCR de ScPDI1, EhPDI y RM06

Los plásmidos aislados a partir de las células haploide Δ PDI1 fueron amplificados utilizando oligonucleótidos específicos para los genes para *Eh*PDI (NB*Eh*PDI y CX*Eh*PDI) y para *Sc*PDI1 (ScPDI1F y ScPDI1R). Se prepararon mezclas independientes (50 µL) conteniendo 5 µL de cada extracto plasmídico, 2.5 U de *Taq* ADN polimerasa, 0.3 µM de los oligonucleótidos específicos para cada gen, 200 µM de dNTPS y las condiciones óptimas para la reacción (solución amortiguadora: 10 mM de Tris-HCl, pH 8.3; 50 mM de Cloruro de potasio; y 1.5 mM de Cloruro de magnesio). La amplificación se realizó utilizando las condiciones estándar de termociclado (protocolo general 3.3.4). El producto de amplificación fue analizado mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.5 % (protocolo general 3.3.5).

4. RESULTADOS Y DISCUSIONES

4.1. La enzima PDI es importante para la biología celular de E. histolytica

En células eucariotas, una de las características estructurales de la mayoría de las proteínas secretadas es la presencia de enlaces disulfuro. La enzima PDI es el principal catalizador biológico de la formación y rearreglo de enlaces disulfuro en el RE y su actividad oxidoreductora depende de un par de cisteínas presentes en el motivo CXXC de sus dominios Tx [14, 27].

El protozoario intestinal *E. histolytica*, agente causal de la amibiasis humana [62], depende en gran medida de sus actividades citoadherente, citotóxica y citolítica para su estilo de vida parasitario. Esta actividades, a su vez, dependen de factores de virulencia (tales como la lectina de unión a galactosa/N-acetil-galactosamina o las proteínas formadoras de poros) que contienen enlaces disulfuro importantes para adoptar su estructura nativa y funcional [30, 21].

4.2. La enzima PDI de *E. histolytica* exhibe características estructurales relevantes

La enzima *Eh*PDI presenta dos dominios Tx con alta similitud a la tiorredoxina bacteriana y los dominios Tx de la PDI humana. Aún más, en un análisis de predicción de la estructura secundaría, se observó que éstos exhiben el patrón de plegamiento característico de los dominios Tx funcionales [46].

Por otro lado, ambos dominios Tx de la enzima EhPDI poseen el motivo estructural CGHC (Figura 6), en los cuales los residuos Cys son esenciales para la actividad oxidasa *in vivo*;
ya que la enzima pierde la capacidad asistir el plegamiento oxidativo de la fosfatasa alcalina bacteriana cuando los residuos de *Cys* son sustituidas por *Ser* [31]. El reemplazó de los átomos de azufre por oxígeno no tiene impacto significativo en la capacidad de las enzimas PDI para unirse a los polipéptidos; es decir, no altera las funciones no enzimáticas [27].

4.3. S. cerevisiae como modelo para el estudio de la enzima PDI de E. histolytica

El gen *Sc*PDI1, codificante para la principal oxidorreductasa de la familia PDI de S. cerevisiae, es esencial para la supervivenvia celular [11; 51]. El genoma de *S. cerevisiae* contiene otros cuatro genes no esenciales, homólogos a PDI1: MPD1, MPD2, EUG1 y EPS1. Sin embargo, MPDI1 es el único homólogo capaz de complementar las funciones esenciales de PDI1 cuando se expresa bajo el control del promotor de PDI1. Por otro lado, EUG1, cuyo sitio activo exhibe el CXXS, también puede complementar las funciones de PDI1 cuando su sitio activo se muta a CXXC. Ambos resultados demuestran que, a nivel molecular, la función esencial de *Sc*PDI1 depende de un promotor fuerte y de la presencia del motivo oxido-reductor CXXC [55, 42].

Considerando el papel bioquímico *in vivo* de la enzima *Sc*PDI1 y el fenotipo letal, un ensayo de complementación funcional de la mutante haploide Δ PDI1 de *S. cerevisiae* ha sido utilizado como modelo heterólogo para estudiar el papel biológico de enzimas ortólogas a *Sc*PDI1. Este ensayo ha sido aplicado exitósamente para estudiar las enzimas PDI de *Mus musculus* y *Rattus norvegicus* [18, 27], *Dictyostelium discoiduem* [39], *Aspergillus niger* [40] y *Homo sapiens* [26]. Sin embargo, debe tenerse en consideración que la enzima ortóloga debe expresarse de manera episomal; ya que, aparentemente, no es posible lograr complementación a

partir de genes integrados en el genoma de la levadura, tal como se observó para la enzima PDI humana [26].

Por lo tanto, y teniendo en consideración lo antes expuesto, el ensayo de complementación de la mutante haploide Δ PDI1 de *S. cerevisiae* fue considerado como el modelo heterólogo apropiado para estudiar el papel bioquímico *in vivo* de la enzima *Eh*PDI.

4.4. El vector que expresa *Eh*PDI bajo el control del promotor de *Sc*PDI1

Como se describió anteriormente, es necesario un plásmido de levadura que permita la expresión de la enzima *Eh*PDI bajo el control del promotor del gen *Sc*PDI1; además, que contenga un origen de replicación centromérico y que permita la selección por complementación de una auxotrofía (preferentemente diferente a uracilo).

Para este fin, se diseño la estrategia de construcción de un vector que contenga las regiones promotoras y terminadoras del gen silvestre *Sc*PDI1 y que exprese la enzima *Eh*PDI con dos etiquetas: (i) en el amino terminal, el péptido señal de la enzima *Sc*PDI1, para favorecer el mecanismo de reconocimiento y transporte hacia el RE; y (ii) en el carboxilo terminal, el tetrapéptido HDEL, para favorecer el mecanismo de retención en el RE. La estrategia de construcción fue diseñada en tres etapas, utilizando al vector comercial pRS413 (CEN/ARS, HIS3) como plásmido parental.

Construcción del plásmido p13XDEL2

El plásmido p13XDEL2 porta la región 3' del gen *Sc*PDI (etiqueta HDEL y la secuencia terminadora del gen). La región 3' fue amplificada mediante PCR utilizando oligonucleótidos

específicos y el plásmido pCT38 como molde. El producto de PCR obtenido fue digerido con endonucleasas de restricción y, posteriormente, ligado en el vector pRS413. Mediante un análisis del patrón de la longitud de los fragmentos de restricción (datos no mostrados) fue posible identificar y caracterizar el vector recombinante p13XDEL2 (5.088 Kb).

Construcción del plásmido p13PsXDEL2

El plásmido p13PsXDEL2 es un vector filial del plásmido p13XDEL2, el cual contiene la inserción de la región 5' del gen *Sc*PDI (secuencia promotora y péptido señal del gen) corriente arriba de la región 3' del mismo gen. La región 5' fue amplificada mediante PCR utilizando oligonucleótidos específicos y el plásmido pCT38 como molde. El producto de PCR obtenido fue digerido con las endonucleasas de restricción y, posteriormente, ligado en el vector p13XDEL2. Mediante un análisis del patrón de la longitud de los fragmentos de restricción (datos no mostrados) fue posible identificar y caracterizar el vector recombinante p13PsXDEL2 (5.599 pb).

Construcción del plásmido pYEhPDI

El plásmido pY*Eh*PDI es un vector filial de p13PsXDEL2, el cual contiene la inserción de la secuencia codificante para el polipéptido maduro de la enzima *Eh*PDI en fase con el péptido señal y la secuencia de retención del gen *Sc*PDI1. La secuencia *Eh*PDI fue amplificada mediante PCR utilizando los oligonucleótidos específicos y el plásmido pBPelB*Eh*PDI como molde. El producto de PCR obtenido fur digerido con endonucleasas de restricción y, posteriormente, ligado en el vector p13PsXDEL2. Mediante un análisis del patrón de la longitud



Figura 11. Representación circular del plásmido pYEhPDI.

Se muestra la unidad transcripcional del gen *Eh*PDI, el gen bacteriano para la enzima β lactamasa (Amp^R), el gen de levadura para la proteína HIS3 y los orígenes de ColE1 y CEN/ARS, de bacteria y de levadura, respectivamente. La talla molecular y algunos los sitios de restricción también son indicados. El panel de abajo muestra la representación gráfica de la fusión entre el gen *Eh*PDI y las regiones regulatorias de *Sc*PDI1. Se ilustran la región 5' (promotora) y el péptido señal del gen *Sc*PDI1, los dominios *Tx* y el dominio D del gen *Eh*PDI, así como la región 3' (terminadora) del gen *Sc*PDI1. Adicionalmente se muestran los sitios de corte por algunas endonucleasas.

de los fragmentos de de restricción fue posible identificar y caracterizar el vector recombinante pY*Eh*PDI (6.571 Kb) (Figura 11).

La Figura 12 muestra el análisis del patrón de la longitud de los fragmentos de restricción del plásmido pY*Eh*PDI, obtenido mediante el uso de endonucleasas específicas para el gen *Eh*PDI. Como se puede observar, el patrón obtenido corresponde al esperado, con el pequeño inconveniente de que no se aprecia el fragmento de 348 pb (esperada en la digestión con la



Figura 12. Análisis del vector pYEhPDI. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5 % en el que se observa el patrón de digestión de pYEhPDI en presencia de diferentes endonucleasas.

> Digestión con *Bgl*l Digestión con *Apa*l Digestión con *Nco*l

M: DNA λ /*Hind*III (Kb).

endonucleasa *Nco*I); sin embargo, es posible observar una diferencia significativa en la parte superior del gel, comparando los fragmentos de alto peso molecular obtenidos con las endonucleasas *Apa*I y *Nco*I, que asegura la presencia de la secuencia *Eh*PDI. Adicionalmente, la secuencia del plásmido fue verificada mediante secuenciación de ADN, a través la cual fue posible asegurar la fusión en fase de *Eh*PDI con las señales de localización y retención en el RE (resultados no mostrados).

Tamaños esperados

4586 y 1985 pb

6223 y 348 pb

6571 pb

4.5. Los vectores que expresan variantes de *Eh*PDI

Con el objeto de analizar la participación de los residuos Cys (presentes en los motivos estructurales CGHC de los dominios Tx) en la función de *Eh*PDI, se realizaron construcciones que expresen variantes de la enzima (pYRMs).

Para este fin, se amplificaron las variantes RM05, RM06, RM07, RM10 y RM15 [31], las cuales contienen las versiones mutantes de la enzima *Eh*PDI (Tabla 4, Figura 10).

Tabla 10. Variantes de EhPDI.Se muestra la posición de cada cambio con respecto a cada motivo estructural y los tamaños de losfragmentos esperados en el análisis de restricción por las endonucleasas BstBI o Ncol/Xhol.								
Variante	Mutación	N-Tx/C-Tx	Digestión con BstBI (pb)	Digestión con NcoI y XhoI (pb)				
pY <i>Eh</i> PDI		CGHC/CGHC	4793, 1328,450	5683, 540, 348				
pYRM05	C44S, C47S	SGHS/CGHC	4326, 1328,467, 450	6031, 540				
pYRM06	C160S, C163S	CGHC/SGHS	3978, 1328, 815, 450	5683, 888				
pYRM07	C44S, C160S	SGHC/SGHC	4793, 1328,450	6571				
pYRM10	C47S, C163S	CGHS/CGHS	3978, 1328, 467, 450, 348	5683, 540, 348				
pYRM15	C44S, C47S, C160S, C163S	SGHS/SGHS	3978, 1328, 467, 450, 348	6571				

Posteriormente, los productos amplificados fueron ligados en el plásmido p13PsXDEL2, fusionados en fase con las señales de localización y retención en el RE (resultados no mostrados).



Figura 13. Análisis de las variantes de EhPDI.

Fragmentos de restricción separados mediante electroforesis en gel de agarosa al 2 %. Patrón de digestión de pY*Eh*PDI, pYRM05, pYRM06, pYRM07, pYRM10, y pYRM15 en presencia de la endonucleasa (A) *Bst*BI y con las endonucleasas *Nco*I y *Xho*I (B). En ambos, se muestra los marcadores de peso molecular (M_1 : λ -*DNA/Hind*III y M_2 : *100-bp DNA ladder*). PM en Kb.

Para caracterizar los plásmidos recombinantes obtenidos, se realizó un análisis del patrón de la longitud de los fragmentos de restricción, utilizando endonucleasas específicas para la identificación de las mutaciones (Tabla 10, Figura 13).

Como se observa, es posible identificar y caracterizar las mutantes debido a la variabilidad en el número o longitud de los fragmentos de digestión simple (*Bst*BI) o doble (*Nco*I y *Xho*I). La Figura 13 muestra el patrón de restricción comparativo entre los plásmidos que portan *Eh*PDI silvestre o una versión mutante. Como se puede observar, tanto la digestión simple como la doble fueron útiles para discernir el patrón esperado para cada construcción.

4.6. El vector que expresa *Sc*PDI1, un control positivo del ensayo

Con el fin de tener un control positivo para el ensayo de complementación funcional, se realizó una construcción conteniendo la unidad transcripcional del gen de *Sc*PDI1 en el vector



Figura 14. Representación circular del plásmido pYScPDI.

Se muestran la unidad transcripcional del gen ScPDI1, el gen bacteriano para la enzima β -lactamasa (Amp^R), el gen de levadura para la proteína HIS3 y los orígenes de ColE1 y CEN/ARS, de bacteria y de levadura, respectivamente. La talla molecular y algunos los sitios de restricción también son indicados.

El panel de abajo muestra una representación gráfica de la unidad transcripcional del gen *Sc*PDI1, donde se observan la región 5' (promotora), el péptido señal, los dominios *Tx* activos *a* y *a*' y los inactivos *b* y *b*', el dominio *c*, así como la región 3' (terminadora). Adicionalmente se muestran los sitios de corte por algunas endonucleasas.

pRS413 (plásmido parental de las construcciones de *Eh*PDI y sus variantes). A partir del plásmido pCT38 fue posible aislar la unidad transcripcional *Sc*PDI1, mediante la digestión con las endonucleasas *Apa*I y *Sac*II; la cual, posteriormente fue subclonada en los mismos sitios del plásmido pRS413 (donado por la construcción pYRM15). La Figura 14 muestra un esquema del vector pY*Sc*PDI (7.077 Kb).

Adicionalmente, para caracterizar el plásmido pY*Sc*PDI1 se realizó un análisis del patrón de la longitud de los fragmentos de restricción, utilizando endonucleasas específicas. La Figura 15 muestra el patrón de restricción obtenido. Como se puede observar, el patrón corresponde a lo esperado, con ligeras excepciones, tal como la ausencia del fragmento de 60 pb de la digestión con *Bgl*II (ya que se sale del gel).

4.7. La cepa mutante haploide ΔPDI1/pCT38 de S. cerevisiae

Con el objetivo de aislar la cepa mutante haploide Δ PDI1 de *S. cerevisiae* viable, la cepa heterocigota diploide BY4743-YCL043c fue transfectada con el vector pCT38 y sometida a un análisis aleatorio de esporas.

Inicialmente, la cepa BY4743-YCL043c/pCT38 fue aislada en medio SD carente de uracilo. La transformación fue de alta eficiencia, ya que se obtuvo una gran cantidad de unidades formadoras de colonias, capaces de crecer en presencia de G418 y en ausencia de uracilo (URA⁺).

Posteriormente, la cepa BY4743-YCL043c/pCT38 fue inducida hacia esporulación, exhibiendo una baja eficiencia (entre 5 y 10%), después de 10 días en condiciones de baja concentración de nutrientes y temperatura controlada.



Figura 15. Análisis del vector pYScPDI. Fragmentos de restricción separados mediante electroforesis en gel de agarosa al 2 %.

	<u>Tamaños esperados</u>	
EcoRV/NotI	6007 y 1071 pb	
Xmnl	3316, 3241 y 521 pb	
Bg/II	4339, 2679 y 60 pb	
<i>Bst</i> Bl	5300, 1328 y 450 pb	
Spel/Xbal	5137 y 1941 pb	

M; DNA ladder 1 Kb (en Kb).

El aislamiento de esporas se realizó mediante digestión enzimática (β -glucoronidasa) de los carbohidratos de la pared celular, permitiendo la liberación de esporas (células haploides). La selección inicial se realizó en medio SD carente de uracilo.

Sin embargo, para asegurar la identificación de unidades formadoras de colonias mutantes haploides Δ PDI1/pCT38 de *S. cerevisiae* se realizó mediante un tamizado y una selección negativa en medio SD, utilizando como agentes selectivos una mezcla de uracilo y FOA.

Como el FOA es convertido a un compuesto tóxico (5-fluoroacilo) por el producto del gen URA3 (5'-fosfato decarboxilasa), las colonias mutantes haploides Δ PDI1/pCT38 de *S*. *cerevisiae* mueren en presencia de FOA; y por otro lado, las colonias diploides (parentales) sobreviven en presencia del compuesto.

Para ilustrar esta estrategia de selección, la Figura 16 muestra el tamizado de 36 unidades formadoras de colonias sembradas en medio SD en ausencia o presencia de uracilo y FOA.



Figura 16. Tamizado de 36 esporas en medio SD en ausencia de 5-FOA/URA (A) y replica en presencia de ambos compuestos (B). El círculo muestra el fenotipo letal de una colonia mutante haploide ΔPDI1/pCT38 de *S. cerevisiae*.

Utilizando la estrategia anterior, la cepa mutante haploide ΔPDI1/pCT38 de *S. cerevisiae* fue exitósamente aislada a partir de un amplio tamizado (>300 unidades formadoras de colonias). Como la eficiencia de esporulación fue muy baja, sólo se identificaron 4 colonias con las características fenotípicas deseadas. Desafortunadamente, 3 de éstas fueron negativas a un segundo análisis (datos no mostrados), restando sólo 1 colonia, potencialmente con el fenotipo deseado, identificada como RSA4-16. Para asegurar la identificación, la cepa RSA4-16 fue sometida a un tercer análisis del fenotipo letal. La Figura 17 muestra resultados que confirman



Figura 17. Análisis del fenotipo letal de la cepa RSA4-16, mutante haploide ΔPDI1/pCT38 de *S. cerevisiae*. Crecimiento en medio mínimo SD en ausencia o presencia de uracilo y FOA.



Figura 18. Caracterización de las auxotrofías de la cepa RSA4-16, haploide mutante ΔPDI1 de *S. cerevisiae*.

que RSA4-16 es una cepa mutante haploide Δ PDI1/pCT38) de *S. cerevisiae*.

Enseguida, se realizó una caracterización de la cepa mutante haploide RSA4-16 (Δ PDI/pCT38) mediante un análisis de crecimiento en medios selectivos para auxotrofías. En la Figura 18 se observa que la cepa mutante haploide Δ PDI/pCT38 de *S. cerevisiae* presenta el fenotipo esperado (URA⁺ TRP⁺ HIS⁻ LEU⁻); es decir, crecimiento en ausencia de uracilo (ya que posee el vector pCT38, vector URA3) y en ausencia de triptófano (utilizado como control de crecimiento). Por otro lado, como era de esperarse, debido a que la cepa BY4743 (parental) es auxótrofa a histidina y leucina, no se observó crecimiento celular en medios carentes de estos nutrientes.

En conjunto, los resultados observados son congruentes con lo esperado; por lo tanto, la cepa RSA4-16, denominada como mutante haploide Δ PDI1/pCT38 de *S. cerevisiae* fue utilizada en el ensayo de complementación funcional.

4.8. La enzima PDI amibiana complementa la mutante ΔPDI1 de S. *cerevisiae*

Para evaluar la función de la enzima *Eh*PDI como oxidorreductasa y la participación funcional de los dominios Tx, se realizó un ensayo de complementación de la mutante haploide Δ PDI1/pCT38 de *S. cerevisiae* y rescate del fenotipo letal.

Inicialmente, la cepa mutante haploide Δ PDI1/pCT38 de *S. cerevisiae* fue transfectada con los plásmidos pY*Sc*PDI (control positivo), pY*Eh*PDI, pYRM05, pYRM06, pYRM07, pYRM10, y pYRM15. Las transfectantes fueron exitosamente aisladas en medio SD carente de uracilo e histidina. De cada transformación se obtuvieron alrededor de 20 unidades formadoras de colonias URA⁺ HIS⁺, las cuales fueron nombradas como mutantes haploides Δ PDI1/pCT38/pY*Sc*PDI, Δ PDI1/pCT38/pY*Eh*PDI, Δ PDI1/pCT38/pYRM05, Δ PDI1/pCT38/ pYRM06, Δ PDI1/pCT38/ pYRM07, Δ PDI1/pCT38/pYRM10, y Δ PDI1/pCT38/pYRM15.

Posteriormente, se utilizó la técnica de intercambio de plásmidos "*plasmid shuffling*" para purgar el plásmido URA3 (pCT38) mediante segregación. Para realizar el intercambio de plásmidos, se utilizan como agentes selectivos a FOA y uracilo. El FOA es convertido a un compuesto tóxico por el producto del gen URA3; por lo tanto, durante la segregación y selección, las unidades formadoras de colonias que porten el plásmido pCT38 mueren, mientras que aquellas que porten el plásmido derivado de pRS413 (HIS3) (*p.e.* los plásmidos pY*Sc*PDI, pY*Eh*PDI, y pYRMs) sobreviven sí son capaces de complementar la función deficiente de *Sc*PDI1.

Como primer ensayo, se realizó un tamizado con 4 unidades formadoras de colonia URA⁺ e HIS⁺ en presencia de la mezcla uracilo/FOA. Mediante este análisis fue posible observar que la enzima *Eh*PDI silvestre y la variante RM06 (CGHC/SGHS) complementan la mutante haploide Δ PDI1 de *S. cerevisiae*. Para asegurar este importante resultado, se realizó nuevamente el ensayo de complementación utilizando 1 U DO₆₅₀ de un cultivo líquido de las cepas URA⁺ e HIS⁺, las cuales fueron seleccionadas en medio SD en presencia de uracilo y FOA.



Figura 19. Ensayo de complementación funcional.

(A) y (B) Crecimiento en medio SD-L (ausencia de uracilo e histidina). (C) y (D) Crecimiento en medio SD-L+Ura/FOA. La Nomenclatura se indica en la Tabla 10.

La Figura 19 se muestra el resultado del ensayo de complementación funcional de la mutante haploide Δ PDI1 de *S. cerevisiae* con la enzima *Eh*PDI y la variante RM06 (CGHC/SGHS). Como se puede observar en los paneles C y D, sólo el control (*Sc*PDI), *Eh*PDI y la variante RM06 fueron capaces de crecer en presencia de uracilo y FOA, y rescatar el fenotipo letal.

En resumen, este resultado demuestra que la enzima PDI de *E. histolytica* es capaz de complementar la función de oxidorreducción de la enzima PDI1 de *S. cerevisiae*. Además, es posible establecer que el dominio N-Tx de la enzima amibiana es el dominio funcional para esta actividad enzimática, tal como se ha observado para otros homólogos.

4.9. El gen EhPDI se mantiene en la mutante $\triangle PDI1$ de S. cerevisiae

Con el propósito de caracterizar la mutante haploide Δ PDI1 de *S. cerevisiae* complementada con *Eh*PDI y la variante RM05, se realizó un ensayo para comprobar la presencia del gen codificante de *Eh*PDI de manera episomal. Los plásmidos fueron aislados a partir de las células complementadas y las regiones codificantes fueron amplificadas mediante PCR utilizando oligonucleótidos específicos para cada gen.

En la Figura 20 se muestra el resultado de la amplificación. Como se puede observar en el carril 1, a partir del plásmido aislado de las células utilizadas como control positivo (pYScPDI) se amplificó un producto de aprox. 1.5 Kb con el par de oligonucleótidos específicos para ScPDI1, congruente con el tamaño esperado (verificado con el carril 6). Por otro lado, en los carriles 3 y 5, donde se utilizo como molde el plásmido aislado de las células Δ PDI1 de *S. cerevisiae* complementadas con *Eh*PDI y la variante RM06 (pY*Eh*PDI y pYRM06, respectivamente) se amplificó de manera específica un producto de aprox. 1 Kb con el par de oligonucleótidos *Eh*PDI, congruente con el tamaño esperado (verificado con el carril 7). Finalmente, la amplificación fue específica para cada gen, ya que los controles negativos no mostraron producto alguno (carriles 2 y 4), asegurando que la complementación se debe



Figura 20. Análisis del vector pYEhPDI. Separación de los productos de PCR obtenidos mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.5 %.

M: 1 Kb ladder (Kb)

- 1. pYScPDI oligos ScPDI, 1527 pb
- 2. pYScPDI oligos EhPDI
- 3. pYEhPDI oligos EhPDI, 986 pb
- 4. pYEhPDI oligos ScPDI
- 5. pYRM06 oligos EhPDI, 986 pb
- 6. Control positivo PPCR ScPDI, 1527 pb
- 7. Control positivo PPCR EhPDI, 986 pb

exclusivamente a la presencia episonal del plásmido, descartando la posibilidad de contaminación cruzada o el remanente del plásmido parental.

Cabe mencionar dos aspectos: (i) para las amplificaciones específicas del gen *Eh*PDI y su variante RM06, se utilizó como control negativo la preparación obtenida de las células Δ PDI1 de *S. cerevisiae* complementadas con *Eh*PDI (carril 4), ya que el genotipo de la mutante es el mismo en ambos casos; y (ii) como los productos de PCR son de igual tamaño, ya que se utilizó el mismo para de oligonucleótidos, se realizó un análisis del polimorfismo de la longitud de los productos de restricción con la enzima *Bst*BI, el cual permitió identificar el gen *Eh*PDI y establecer diferencia con con respecto a la mutante RM06 (resultado no mostrado).

4.10. *Eh*PDI y la variante RM06 se expresan en la mutante ΔPDI1 de S. *cerevisiae*

Posteriormente, se comprobó la expresión de *Eh*PDI y su variante RM06, a partir de extractos totales de la mutante Δ PDI1 de *S. cerevisiae* complementada, mediante ensayos tipo *Western blot*. Para el reconocimiento primario se utilizó un anticuerpo policional anti-*Eh*PDI.



Figura 21. Análisis de la expresión de *Eh*PDI en la mutante Δ PDI1 de *S. cerevisiae*. (A) SDS-PAGE al 12.5 % de extractos totales de proteínas a partir de células que fueron capaces de complementar la mutante Δ PDI1. (B) *Western blot* de los lisados totales. En el recuadro se muestra el reconocimiento con el anticuerpo *anti-Eh*PDI (talla molecular de aprox. 38 KDa).

Primeramente, las proteínas totales fueron separadas mediante electroforesis en gel desnaturalizante/reductor de poliacrilamida, SDS-PAGE (Figura 21, panel A) y, posteriormente, fueron electrotransferidas a una membrana de nitrocelulosa. El reconocimiento con el anticuerpo anti-*Eh*PDI demostró reacción positiva en una banda de aprox. 38 KDa (congruente con el tamaño esperado), en los carriles correspondientes a los extractos de las células complementadas (*Eh*PDI y RM06) (Figura 21, panel B).

La intensidad del reconocimiento fue débil, este hecho puede ser atribuible al nivel de expresión, ya que estos extractos son a partir de cultivos no inducidos. Nuestro control negativo de expresión fue el correcto, ya que no se observó reconocimiento en el carril correspondiente al extracto de las células complementadas con *Sc*PDI1.

4.11. *Eh*PDI y la variante RM06 restablecen la velocidad de crecimiento de la mutante ΔPDI1 de *S. cerevisiae*

Para medir la eficiencia de complementación, se determinó el tiempo de duplicación a partir de curvas de crecimiento celular. En cultivos líquidos de células Δ PDI1 de *S. cerevisiae* complementantes con *Sc*PDI1, *Eh*PDI y la variante RM06 se determinó la rapidez específica de crecimiento celular.

La Figura 22 se muestra las curvas de crecimiento celular obtenidas para las complementantes. Como se puede observar, la cinética para *Eh*PDI y su variante RM06 (CCSS) son muy similares a la observada para *Sc*PDI1 (Figura 22, panel A).



Figura 22. Curvas de crecimiento celular la mutante Δ PDI1 de *S. cerevisiae* complementada con *Sc*PDI1, *Eh*PDI, su variante RM06.

(A) Gráfica que muestra la DO_{650} con respecto al tiempo. (B) Gráfica que muestra las duplicaciones con respecto al tiempo. Las curvas de crecimiento celular fueron realizadas por duplicado y las determinaciones del tiempo de duplicación resultan del promedio de dos experimentos independientes.

A partir de éstas, se calculó el tiempo de duplicación en la fase de crecimiento exponencial (Figura 22, panel B). En la Tabla 11 se muestran los tiempos de duplicación calculados. Como se oserva, la enzima *Eh*PDI, y su variante RM06, restablecen el tiempo de duplicación de la mutante Δ PDI1 de *S. cerevisiae* a valores cercanos al observado en la complementación homóloga.

4.12. La enzima PDI de *E. histolytica* participa en el ambiente redox de la mutante ΔPDI de *S. cerevisiae*

En general, los resultados demuestran que la actividad oxidorreductora de *Eh*PDI depende de sus dos estados de oxidación (ditiol/disulfuro) para complementar la función de su homólogo en *S. cerevisiae*.

Particularmente, se observó que la actividad oxidorreductasa de la enzima depende en gran medida del dominio estructural N-*Tx*. Estos resultados muestran concordancia con los observados para otras enzimas

Tabla	11.	Resultados		del				
análisis	de	las	curva	is de				
crecimiento celular.								
	Eh	PDI	RM06	ScPDI				
t.(h)	2:	816	2 3 3 2	1 742				
R ²	0.9	9665	0.9746	0.9870				
	0.0			2.5070				

homólogas, tal como *Sc*PDI1, donde se observó que la mutante que contiene activo sólo el dominio '*a*' (CGHC/SGCS) es capaz de llevar a cabo el plegamiento correcto de la enzima Carboxipeptidasa Y; demostrando que los dos dominios Tx (*a* y *a*') son funcionalmente diferentes [22]. En resumen, estas investigaciones reflejan las diferencias en la especificidad del sustrato entre los dominios Tx, o en el potencial redox, indicando que la formación oxidativa inicial de enlaces disulfuro es un aspecto importante para la función de las enzimas PDI.

5. CONCLUSIONES

El esquema de construcción de vectores de expresión en levadura permitió realizar el ensayo de complementación funcional para evaluar la actividad oxidorreductasa de la PDI amibiana.

La enzima *Eh*PDI complementa la función oxidorreductasa de la cepa haploide Δ PDI de Sacharomyces cerevisiae, reestableciendo la función esencial de crecimiento

La actividad oxidorreductasa de la enzima *Eh*PDI depende de la presencia de sus residuos de Cys, presentes en los motivos estructurales CGHC de sus dominios Tx.

No existe una equivalencia funcional entre dominios, ya que el dominio N-Tx es el único capaz de reestablecer la función esencial de crecimiento.

Se sugiere que el dominio N-Tx está más disponible funcionalmente y que participa en la formación de enlaces disulfuro intermediarios (con el regerador redox y con el sustrato).

Estos resultados apoyan la hipótesis de la existencia de genes amibianos que codifican para proteínas implicadas en el mecanismo de oxidorreducción comprometida en el correcto plegamiento de polipéptidos.

6. BIBLIOGRAFIA

- Amberg DC, Burke DJ, Strathern JN. Methods in Yeast Genetics: A Cold Spring Harbor Laboratory Course Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press. 2005.
- Anelli T, Sitia R. Protein quality control in the early secretory pathway. The EMBO Journal. 2008; 27: 315–27.
- Bader MW, Hiniker A, Regeimbal J, Goldstone D, Haebel PW, Riemer J, Metcalf P, Bardwell JC. Turning a disulfide isomerase into an oxidase: DsbC mutants that imitate DsbA. EMBO J 2001; 20(7): 1555-62.
- 4. Bardwell JC, McGovern K, Beckwith J. Identification of a protein required for disulfide formation in vivo. Cell 1991; 67: 581-9.
- Bhattacharya A, Satish S, Bagchi S, Bhattacharya S. The genome of *Entamoeba histolytica*. Int. J. Parasitol 1999; 30: 401-10.
- Blobel G, Dobberstein B. Transfer of proteins across membranes. I. Presence of proteolytically processed and unprocessed nascent immunoglobulin light chains on membrane-bound ribosomes of murine myeloma. J Cell Biol. 1975; 67(3): 835-51.
- Blobel G, Walter P, Chang CN, Goldman BM, Erickson AH, Lingappa VR. Translocation of proteins across membranes: the signal hypothesis and beyond. Symp Soc Exp Biol. 1979; 33: 9-36.
- Caro LG, Palade GE. Protein synthesis, storage, and discharge in the pancreatic exocrine cell. An autoradiographic study. J Cell Biol. 1964; 20: 473-95.

- CDC, Center for Disease Control and Prevention (USA). Parasites and Health Amebiasis.
 2002.
- Espinoza-Cantellano M, Martinez-Palomo A. Patogenesis of intestinal amebiasis: from molecules to disease. Clinical microbiology reviews 2000; 13(2): 318-31.
- Farquhar R, Honey N, Murant SJ, Bossier P, Schultz L, Montgomery D, Ellis RW, Freedman RB, Tuite MF. Protein disulfide isomerase is essential for viability in Saccharomyces cerevisiae. Gene. 1991; 108(1): 81-9.
- Frand AR, Cuozzo, Kaiser C. Pathways for protein disulphide bond formation. Trends in Cell Biology 2000; 10: 203-10.
- 13. Frand AR, Kaiser C. Two pairs of conserved cysteines are required for the oxidative activity of Ero1p in protein disulfide bond formation in the endoplasmic reticulum. Mol Biol Cell 2000; 11: 2833-43.
- 14. Frand AR, Kaiser CA. The ERO1 gene of yeast is required for oxidation of protein dithiols in the endoplasmic reticulum. Mol Cell. 1998; 1(2): 161-70.
- 15. Gilbert HF. Protein disulfide isomerase and assisted protein folding. J. Biol Chem 1997; 272(47): 29399-02.
- 16. Gilbert HF. Protein disulfide isomerase. Methods in enzymology 1998; 290: 26-50.
- 17. Gillece P, Luz JM, Lennarz WJ, Cruz FJ, Römisch K. Export of a cysteine-free misfolded secretory protein from the endoplasmic reticulum for degradation requires interaction with protein disulfide isomerase. J. Cell Biol. 1999; 147(7): 1443-56.

- 18. Gunther R, Srinivasan M, Haugejorden S, Green M, *Eh*brecht IM, Kuntzel H. Functional replacement of the Saccharomyces cerevisiae Trg1/Pdi1 protein by members of the mammalian protein disulfide isomerase family. J Biol Chem. 1993; 268(11): 7728-32.
- 19. Hawkins HC, Blackburn EC, Freedman RB. Comparison of the activities of protein disulphide-isomerase and thioredoxin in catalysing disulphide isomerization in a protein substrate. Biochem J 1991; 275: 349-53.
- 20. Hebert DH, Molinari M. In and out of the ER: protein folding, quality control, degradation, and related human diseases. Physiol Rev. 2007; 87: 1377–408.
- Hecht O, Van Nuland NA, Schleinkofer K, Dingley AJ, Bruhn H, Leippe M, Grötzinger J. Solution structure of the pore-forming protein of *Entamoeba histolytica*. J Biol Chem. 2004; 279(17): 17834-41.
- 22. Holst B, Tachibana C, Winther JR. Active site mutations in yeast protein disulfide isomerase cause dithiothreitol sensitivity and a reduced rate of protein folding in the endoplasmic reticulum. J Cell Biol. 1997; 138(6): 1229-38.
- 23. Humphreys DP, Weir N, Mountain A, Lund PA. Human protein disulfide isomerase functionally complements a dsbA mutation and enhances the yield of pectate lyase C in *Escherichia coli*. J Biol Chem 1995; 270(47): 28210-15.
- 24. Ito W, Ishiguro H, Kurosawa Y. A general method for introducing a series of mutations into cloned DNA using the polymerase chain reaction. Gene 1991; 102(1): 67-70.
- 25. Kadokura H, Nichols II L, Beckwith J. Mutational alterations of the key cis proline residue that cause accumulation of enzymatic reaction intermedies of DsbA, a member of the thioredoxin superfamily. J Bacteriol 2005; 187(4): 1519-22.

- 26. Kimura T, Hosoda Y, Kitamura Y, Nakamura H, Horibe T, Kikuchi M. Functional differences between human and yeast protein disulfide isomerase family proteins. Biochem Biophys Res Commun. 2004; 320(2): 359-65.
- 27. Laboissiere MC, Sturley SL, Raines RT. The essential function of protein-disulfide isomerase is to unscramble non-native disulfide bonds. J Biol Chem. 1995; 270(47): 28006-9.
- 28. Lambert N, Freedman RB. Kinetics and specificity of homogeneous protein disulphureisomerase in protein disulphide isomerization and in tilo-protein-disulphide oxidoreduction. Biochem J 1983; 213: 235-43.
- 29. Loftus B, Anderson I, Davies R, Alsmark C, Samuelson J, et al. The genome of the protist parasite *Entamoeba histolytica*. Nature 2005; 433: 865-8.
- 30. Mann BJ. Structure and function of the *Entamoeba histolytica* Gal/GalNAc lectin. Int Rev Cytol. 2002; 216: 59-80.
- 31. Mares RE, Magaña PD, Meléndez-López SG, Licea AF, Cornejo-Bravo JM, Ramos MA. Oxidative folding and reductive activities of *EhPDI*, a protein disulfide isomerase from *Entamoeba histolytica*. Parasitol Int. 2009; 58(3): 311-3.
- 32. Martínez-Palomo A, Espinoza Cantellano M. *Entamoeba histolytica*: biología celular y molecular. Biología celular y molecular. Jiménez LF, Merchant H (Editores), Prentice Hall, 1era Edición 2003: 741-60.
- 33. Martínez-Palomo A, Pinto P, Chavez B. Membrane structure of *Entamoeba histolytica*: fine structure of freeze-fractured membranes. J. Ultrastructure Res 1976;54: 148-58.

- Martínez-Palomo A. Amoebiais. Clinics in Tropical medicine and communicable disease, 1986; 1(3): 293-07.
- 35. Martínez-Palomo A. Biology of amebiasis: progress and perspectives. The biology of parasitism. Liss AR, Englund PT, Sher A (Editors), New York, 1988: 61-76.
- 36. Martínez-Palomo A. Parasitic amebas of the intestinal tract. Parasitic protozoa. Kreier JP, Baker JR (Editors), Academic Press, New York, 2nd Edition 1993: 65-141.
- 37. Martínez-Palomo A. The patogenesis of amoebiasis. Parasitol Today, 1987; 3(4): 111-18.
- 38. Meiri E, Levitan A, Guo F, Christopher DA, Schaefer D, Zrÿd JP, Danon A. Characterization of three PDI-like genes in Physcomitrella patens and construction of knock-out mutants. Mol Genet Genomics 2002; 267: 231-40.
- 39. Monnat J, Neuhaus EM, Pop MS, Ferrari DM, Kramer B, Soldati T. Identification of a novel saturable endoplasmic reticulum localization mechanism mediated by the C-terminus of a Dictyostelium protein disulfide isomerase. Mol Biol Cell. 2000; 11(10): 3469-84.
- 40. Ngiam C, Jeenes DJ, Punt PJ, Van Den Hondel CA, Archer DB. Characterization of a foldase, protein disulfide isomerase A, in the protein secretory pathway of Aspergillus niger. Appl Environ Microbiol. 2000; 66(2): 775-82.
- 41. Noiva R. Protein disulfure isomerase: The multifunctional redox chaperone of the endoplasmic reticulum. Cell Develop Biol 1999; 10: 481-93.
- 42. Norgaard P, Westphal V, Tachibana C, Alsoe L, Holsta B, Winthera JR. Functional Differences in Yeast Protein Disulfide Isomerases. J Cell Biol. 2001; 152(3): 553-62.

- 43. Ostermeier M, De Sutter K, Georgiou G. Eucaryotic protein disulfide isomerase complements *Escherichia coli* dsbA mutants and increases the yield of a heterologous secreted protein with disulfide bonds. J Biol Chem 1996; 271(18): 10616-22.
- 44. Palade GE, Porter KR. Studies on the endoplasmic reticulum. I. Its identification in cells *in situ*. J Exp Med. 1954; 100(6): 641-56.
- 45. Pillai D, Wan P, Yau Y, Ravdin J, Kain K. The cysteine-rich region of the *Entamoeba histolytica* adherence lectin (170-kilodalton subunit) is sufficient for high affinity Gal/GalNAc specific binding in vitro. Infect and Inmun 1999; 67(8): 3836-41.
- 46. Ramos MA, Mares RE, Magaña PD, Ortega JE, Cornejo-Bravo JM. In silico identification of the protein disulfide isomerase family from a protozoan parasite. Comput Biol Chem. 2008; 32(1): 66-70.
- 47. Ramos MA, Sanchez-Lopez R, Mares RE, Olvera F, Alagón A. Identification of an *Entamoeba histolytica* gene encoding a protein disulfide isomerase that fuctionally complements the dsbA mutation in *Escherichia coli*. Mol Biochem Parasitol 2005; 143: 236-40.
- 48. Reyes L, León R. Diferenciación de Entamoeba histolytica/Entamoeba dispar y los nuevos hallazgos en la patogénesis de la amibiasis intestinal. Revista Costarricense de Ciencias Médicas 2002; 23: 3-14.
- 49. Rietsch A, Belin D, Martín N, Beckwith J. As in vivo pathway for disulfide bond isomerization in *Escherichia coli*. Proc Natl Acad Sci USA 1996; 93: 13048-53.
- 50. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular Cloning: A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press. 2nd edition. 1989.

- 51. Scherens B, Dubois E, Messenguy F. Determination of the sequence of the yeast YCL313 gene localized on chromosome III. Homology with the protein disulfide isomerase (PDI gene product) of other organisms. Yeast. 1991; 7(2): 185-93.
- 52. Sikorski, R.S., and J.D. Boeke. 1991. In vitro mutagenesis and plasmid shuffling: from cloned gene to mutant yeast. Methods Enzymol. 194: 302–318.
- 53. Stafford SJ, Lund PA. Mutagenic studies on human protein disulfide isomerase by complementation of *Escherichia coli* dsbA and dsbC mutants. FEBS Letters, 2000; 466: 317-22.
- 54. Stanley SL. Amoebiais. The Lancet 2003; 361: 1025-34.
- 55. Tachibana C, Stevens TH. The yeast EUG1 gene encodes an endoplasmic reticulum protein that is functionally related to protein disulfide isomerase. Mol Cell Biol. 1992; 12(10): 4601–11.
- 56. Tan J, Lu Y, Bardwell JC. Mutational análisis of the disulfide catalyst DsbA and DsbB. J Bacteriol 2005; 187(4): 1504-10.
- 57. Thorstenson YR, Zhang Y, Olson PS, Mascareñas D. Leaderless polypeptides efficiently extracted from whole cells by osmotic shock. J Bacteriol 1997; 179(17): 5333-37
- 58. Tillack M, Biller L, Irmer H, Freitas M, Gomes MA, Tannich E, Bruchhaus I. The *Entamoeba histolytica* genome: primary structure and expression of proteolytic enzymes. BMC Genomics. 2007; 8: 170.
- Torres-Guerrero H, Peattie D, Meza I. Chromatin organization in *Entamoeba histolytica*. Mol Biochem Parasitol 1991; 45: 121-30.

- 60. Turano C, Coppari S, Alteiri F, Ferraro A. Proteins of the PDI family: unpredicted non-ER locations and functions. J Cell Physiol 2002; 193: 154-60.
- 61. Van Dellen KL, Bulik DA, Specht CA, Robbins PW, Samuelson JC. Heterologous expression of an *Entamoeba histolytica* chitin synthase in Saccharomyces cerevisiae. Eukaryot Cell. 2006; 5(1): 203-6.
- 62. WHO/PAHO/UNESCO report. A consultation with experts on amoebiasis. Mexico City, Mexico 28-29 January, 1997. Epidemiol Bull. 1997; 18(1): 13-4.
- 63. Zhang JX, Braakman I, Matlack KE, Helenius A. Quality control in the secretory pathway: the role of calreticulin, calnexin and BiP in the retention of glycoproteins with C-terminal truncations. Mol Biol Cell. 1997; 8(10): 1943-54.
- 64. Zhang X, Zhang Z, Alexander D, Bracha R, Mirelman D, Stanley SL Jr. Expression of amoebapores is required for full expression of *Entamoeba histolytica* virulence in amebic liver abscess but is not necessary for the induction of inflammation or tissue damage in amebic colitis. Infect Immun. 2004; 72(2): 678-83.
- 65. Zheng J, Gilbert HF. Discrimination between native and non-native disulfides by proteindisulfide isomerase. J Biol Chem 2001; 276(19): 15747-52.