



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA

Facultad de Ciencias Químicas e Ingeniería

Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias e Ingeniería

PROGRAMA DE MAESTRÍA EN CIENCIAS

**La proteína FRAP de *Entamoeba histolytica* (EhFRAP): análisis
bioinformático y estudio funcional preliminar de una
proteína parecida a *TOR* (*Target Of Rapamycin*)**

TESIS QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS

P R E S E N T A

QFB. PATRICIA LILIÁN ALEJANDRA MUÑOZ MUÑOZ

Tijuana, B. C.

Junio de 2012.

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

Bajo la Dirección y Tutoría del
DR. MARCO ANTONIO RAMOS IBARRA

Para la realización de este trabajo se obtuvo financiamiento del
CONSEJO NACIONAL DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA
(Financiamiento 155714, Fondo Sectorial SEP-CONACYT 2010 para Ciencia Básica)

DEDICATORIAS

A **Dios**, por permitirme vivir y tener salud, por darme el valor y ser mi apoyo incondicional en todo momento. Por darme la fuerza para salir adelante en los momentos más difíciles, pero sobretodo por darme la oportunidad de conocer y estar rodeada de gente tan especial.

Mamá, Papá y Hermano, por ser los pilares más importantes de mi vida y darme el grandioso honor de continuar en esta aventura juntos, los amo.

A tí por darme la vida, transmitirme los valores que me hacen ser quien soy, por creer en mí sin importar en qué nueva locura esté metida. Te admiro mucho y eres orgullosamente mi ejemplo. **¡GRACIAS MAMÁ!**

A ti **PAPÁ**, por tu lucha incansable por esta pequeña gran familia sin importar las circunstancias en las que te encuentres, porque de entre tantos valores que me has transmitido, sobresalen el cumplir con mis compromisos, ser una persona honesta responsable y sensata. Gracias por tus consejos y tu amor incondicional.

HERMANO, por ser mi respaldo en todo momento, por demostrarme cuánto me adoras y particularmente por la confianza que me has dado. Gracias Miriam y Alex por brindarme el más bello regalo: Claudia.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el apoyo económico brindado para la realización de este proyecto.

A la Facultad de Ciencias Químicas e Ingeniería de la UABC por permitirme utilizar sus instalaciones en la realización de este trabajo y por creer una vez más en mí para formar parte de su alumnado.

A mi Director de Tesis, el Dr. Marco Antonio Ramos Ibarra, le agradezco infinitamente por darme la oportunidad de trabajar en su grupo, obteniendo experiencias inigualables que me han servido y servirán siempre para mi vida profesional. No hay palabras para agradecerle los conocimientos que me ha transmitido, su acertada dirección y dedicación al proyecto. ¡Muchas GRACIAS por enseñarme a aprender!

A mis sinodales: Dra. Rosa Elena Mares Alejandre, Dr. Marco Antonio Ramos Ibarra, Dr. Samuel G. Meléndez López, Dr. Iván Córdova Guerrero, por sus invaluable consejos, paciencia y dedicación a lo largo del proyecto. Con todos y cada uno de ustedes guardo gratas experiencias que me ayudan a ser mejor persona cada día.

Al Dr. José Manuel Cornejo Bravo por transmitirme confianza, por su apoyo y acertados consejos brindados durante estos años.

A todo el personal docente y administrativo así como a mis compañeros de posgrado de la Facultad de Ciencias Químicas e Ingeniería.

A todos mis compañeros y amigos del laboratorio de Biotecnología con los que compartí experiencias inolvidables y únicas. Gracias por tantas enseñanzas sin ningún interés a cambio.

Miriam y Claudia, gracias por unirse a esta hermosa aventura, las quiero mucho y no me canso de agradecerle a Dios por tenerlas en mi familia.

Jeannette, los momentos tan lindos que hemos pasado juntas desde niñas siempre me han acompañando ya que forman parte de mi esencia, gracias por continuar en mi vida y ser parte de mi familia. ¡Te quiero mucho Amiga!

Muy en especial a mis amigos Abi, Zeila, Bibi, Mirna y Rogelio. No hay palabras para agradecer las bellas cosas que hemos vivido desde hace ya varios años, experiencias que me enriquecen y hacen que mi vida sea más plena y feliz. Los quiero mucho.

A mis compañeros y amigos de CITEC, en especial a Ana, Clau, Susi, Luis G., Luis V., por todo su apoyo y consejos brindados en estos dos semestres.

A todos los que han colaborado de alguna manera para la realización de este proyecto: ¡MUCHAS GRACIAS!

Tabla de Contenido

Índice de Figuras.....	8
Índice de Tablas.....	9
Abreviaturas	10
Resumen.....	11
1.INTRODUCCIÓN	12
1.1. <i>Entamoeba histolytica</i>	12
1.1.1.Ciclo de Vida	12
1.1.2.Genoma	14
1.1.3.Virulencia.....	15
1.1.4.Patología	17
1.1.5.Diagnóstico.....	18
1.1.6.Tratamiento.....	19
1.2. <i>Diana de rapamicina (target of rapamycin, TOR)</i>	19
1.2.1. <i>Rapamicina y el descubrimiento de las proteínas TOR</i>	19
1.2.2. <i>Organización estructural de las proteínas TOR</i>	20
1.2.3. <i>Familia de proteínas TOR</i>	22
1.2.4. <i>Complejos TORC1 Y TORC2</i>	23
1.2.5. <i>Tor y la regulación del ciclo celular</i>	24
1.3. <i>Saccharomyces cerevisiae como modelo de estudio de proteínas TOR</i>	26
1.3.1. <i>S. cerevisiae como modelo de célula eucariota</i>	26
1.3.2. <i>Complementación funcional de S. cerevisiae ΔTor2</i>	27
2.JUSTIFICACIÓN.....	28
3.HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	29
3.1. <i>Hipótesis</i>	29
3.2. <i>Objetivos</i>	29
3.2.1. <i>Objetivo general</i>	29
3.2.2. <i>Objetivos específicos</i>	29
4.MATERIALES Y MÉTODOS.....	30
4.1. <i>Análisis bioinformático</i>	30
4.2. <i>Reactivos biológicos y químicos</i>	30
4.2.1. <i>Células de Escherichia coli y medios de cultivo</i>	30
4.2.2. <i>Células de S. cerevisiae y medios de cultivo</i>	31
4.2.3. <i>Plásmidos</i>	31
4.2.4. <i>Enzimas y otros reactivos biológicos</i>	33
4.2.5. <i>Oligonucleótidos sintéticos</i>	34

4.2.6.Reactivos químicos	34
4.2.7.Sistemas de purificación	34
4.3.Equipo	35
4.4.Protocolos generales	35
4.4.1.Condiciones típicas de amplificación (PCR).....	35
4.4.2.Purificación de productos de la reacción de PCR	36
4.4.3.Purificación de fragmentos de ADN a partir de gel de agarosa	36
4.4.4.Purificación de ADN plasmídico	36
4.4.5.Análisis de ADN mediante electroforesis en gel de agarosa.....	37
4.4.6.Transformación bacteriana	37
4.5.Estrategia de construcción del plásmido pBEhFRAP	37
4.5.1.Construcción del plásmido pBEhFRAP/Frag1.....	38
4.5.2.Construcción del plásmido pBEhFRAP/Frag1-Frag2	40
4.5.3.Construcción del plásmido pBEhFRAP	41
4.6.Estrategia de construcción del plásmido pYehFRAP2.....	42
4.6.1.Construcción del plásmido pRS425/EhFRAP	43
4.6.2.Construcción del plásmido pRS425/EhFRAP-CYC1TT	44
4.6.3.Construcción de los plásmidos pBPGAL1 y pRS425/PGAL1.....	46
4.6.4.Construcción del plásmido pYehFRAP2.....	49
4.7.Aislamiento de MH346-1a(pSEY18)/pYehFRAP2 y MH346-1a(pSEY18)/pRS425	51
4.7.1.Preparación de MH346-1a(pSEY18) competentes.....	51
4.7.2.Transfección de MH346-1a(pSEY18).....	51
4.8.Intercambio de plásmidos y análisis preliminar de la función de EhFRAP.....	52
4.8.1.Intercambio de plásmidos y análisis de auxotrofías	52
4.8.2.Análisis de expresión de EhFRAP mediante inmunodetección.....	53
5.RESULTADOS Y DISCUSIONES	55
5.1.Las proteínas TOR como diana para el desarrollo de agentes anti-parasitarios.....	55
5.2.El genoma de <i>E. histolytica</i> codifica para dos proteínas parecidas a TOR	55
5.3.La proteína EhFRAP presenta una arquitectura estructural similar a las proteínas TOR ...	58
5.3.1.EhFRAP posee un dominio RBD aparentemente funcional	59
5.3.2.EhFRAP posee un dominio catalítico parecido al dominio PI3Kc	61
5.4.EhFRAP no complementa la mutante Δ TOR2 de levadura	63
5.4.1.Construcción de un plásmido de expresión de EhFRAP en levadura	63
5.4.2.Complementación funcional de la mutante Δ TOR2 con pYehFRAP2	66
5.4.3.Inmunodetección de la expresión de la proteína EhFRAP en levadura	68
5.5.La levadura <i>S. cerevisiae</i> como modelo heterólogo para el estudio de EhFRAP	68
6.CONCLUSIONES	70
7.BIBLIOGRAFÍA	71
ANEXO 1. Secuencia de la proteína EhFRAP (NCBI No. XP_650639)	77

Índice de Figuras

Figura 1. Ciclo vital de <i>Entamoeba histolytica</i>	13
Figura 2. Micrografía electrónica de los eventos patológicos de la amibiasis intestinal en un modelo de laboratorio (cobayo).	17
Figura 3. Organización estructural de las proteínas Tor.....	21
Figura 4. Estructura del complejo Tor-Rapamicina-FKBP12.	22
Figura 5. pBluescript SK-.....	31
Figura 6. pRS425.....	32
Figura 7. pYES2.	32
Figura 8. Estrategia de construcción de pBEhFRAP.....	39
Figura 9. Estrategia de construcción de pRS425/EhFRAP.....	43
Figura 10. Estrategia de construcción de pRS425/EhFRAP-CYC1TT.	45
Figura 11. Estrategia de construcción de pBPGAL1 y pRS425/PGAL1.	47
Figura 12. Estrategia de construcción de pYEhFRAP2.	50
Figura 13. Resultados de la búsqueda de secuencias homólogas a proteínas TOR en la base de datos del genoma de <i>E. histolytica</i>	56
Figura 14. Representación esquemática del análisis comparativo de las secuencias amibianas homólogas a TOR1 y TOR2 de levadura.	57
Figura 15. Representación esquemática de la organización de dominios de <i>EhFRAP</i>	59
Figura 16. Predicción de la estructura terciara del dominio de unión a rapamicina (RBD) de la proteína <i>EhFRAP</i>	60
Figura 17. Predicción del bolsillo de unión a rapamicina del dominio RBD de <i>EhFRAP</i>	61
Figura 18. Análisis de la estructura primaria del dominio PI3Kc de la proteína <i>EhFRAP</i>	61
Figura 19. Predicción de la estructura terciara del dominio PIK3c de la proteína <i>EhFRAP</i>	62
Figura 20. Representación esquemática del plásmido de expresión en levadura pYEhFRAP2.	64
Figura 21. Caracterización molecular de pYEhFRAP2.....	66
Figura 22. Complementación funcional de la mutante Δ TOR2 de <i>S. cerevisiae</i> con la proteína <i>EhFRAP</i>	67

Índice de Tablas

Tabla 1. Oligonucleótidos sintéticos.....	33
Tabla 2. Medios de cultivo utilizados para el ensayo de complementación funcional.	52
Tabla 3. Medios de cultivo utilizados para la caracterización de auxotrofías.	53
Tabla 4. Análisis de homología de las secuencias amibianas parecidas a TOR con respecto a las proteínas TOR1 y TOR2 de levadura.	58
Tabla 5. Fragmentos esperados del análisis de restricción del plásmido pYEhFRAP2.....	65

Abreviaturas

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNg	Ácido desoxirribonucleico genómico
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
ARNpol	Polimerasa de ácido ribonucleico
ARNr	Ácido ribonucleico ribosomal
ARNt	Ácido ribonucleico de transferencia
CP	Cisteína proteinasa
CLQ	Cloroquina
dNTPs	Desoxirribonucleótidos trifosfatados
DTT	Ditiotreitol
Eh	<i>Entamoeba histolytica</i>
Ehp29	Peroxirredoxina (29 kDa) de <i>Entamoeba histolytica</i>
5-FOA	Ácido 5-fluoro-orótico
FRAP	Proteína asociada al complejo rapamicina-FKBP12
Gal/NAcGal	Lectina de unión a galactosa y n-acetil galactosamina
HA	Epítotope de hemaglutinina
kDa	Kilodalton
KERP1	Proteína rica en lisina y ácido glutámico
LB	Luria-bertani
LB-Amp	Luria-bertani con ampicilina
MAPK	Proteína cinasa activada por mitógeno
µg	Microgramo
µm	Micrómetro
µL/mL/L	Microlitro/mililitro/litro
mM/M	Milimolar/molar
mTOR	Diana de rapamicina de humano (Mammalian target of Rapamycin)
MTZ	Metronidazol
N- o C-Terminal	Extremo amino terminal/Extremo carboxilo terminal
pb/Kb/Mb	Pares de bases/kilobase/megabase
PIK	Fosfatidil inositol cinasa
PIKK	Cinasa relacionada a las fosfatidil inositol cinasas
RBD	Dominio de unión a rapamicina
RP	Riboproteína
rpm	Revoluciones por minuto
Sc	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SCGG	Sintético completo galactosa glicerol
TOR	Diana de Rapamicina (Target Of Rapamycin)
TORC	Complejo de la proteína Diana de Rapamicina
2X YT	2X Levadura y triptona (Yeast and Triptone)
YPGG	Medio completo de extracto de levadura, peptona, galactosa y glicerol

Resumen

La proteína TOR (*Target Of Rapamycin*), una fosfatidil inositol cinasa, se encuentra presente en diferentes organismos, incluyendo en el humano. La levadura *Saccharomyces cerevisiae* expresa dos proteínas TOR: TOR1 y TOR2, que forman dos complejos funcionalmente distintos, TORC1 y TORC2, respectivamente. Estos complejos participan en la regulación del crecimiento celular en respuesta a la disponibilidad de nutrientes y factores de crecimiento mediante la fosforilación de proteínas involucradas en el proceso de traducción; además, juegan un papel importante en la organización del citoesqueleto [Gingras *et al.*, 2001].

Mediante un análisis post-genómico del protozooario *Entamoeba histolytica*, se identificaron dos secuencias codificantes para proteínas con homología estructural a las proteínas TOR: *EhFRAP* (EHI_155160) y *EhTOR2* (EHI_169320). El análisis bioinformático demostró que *EhFRAP* posee una estructura y organización de dominios muy similar a proteínas TOR funcionales; aún más, la predicción de la estructura secundaria de los dominios de unión a rapamicina y fosfatidil inositol cinasa mostró un plegamiento muy similar a dominios ortólogos. Considerando lo anterior, el gen *EhFRAP* fue amplificado y clonado en el plásmido de expresión en levadura pRS425 bajo el control del promotor GAL1. El papel funcional fue evaluado mediante un ensayo de complementación de la mutante Δ Tor2 de *S. cerevisiae*, siguiendo un protocolo de intercambio de plásmidos y rescate del fenotipo letal. Los resultados muestran el potencial de la proteína *EhFRAP* como blanco farmacológico para el diseño de fármacos anti-amibianos.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. *Entamoeba histolytica*

El parásito protozooario *E. histolytica* es el agente causal de la amibiasis en humanos, el cual está asociado a infecciones intestinales y extra-intestinales, afectando principalmente a países en vías de desarrollo, como México. La amibiasis es la cuarta causa de mortalidad y la tercera de morbilidad debido a infecciones por protozoarios, generando mundialmente alrededor de 70,000 muertes al año [Debnath *et al.*, 2007].

1.1.1. Ciclo de Vida

E. histolytica presenta dos estadios estables: quiste y trofozoíto, siendo el primero la forma infectante y el segundo la forma invasiva. Ambos estadios pueden estar presentes en las heces fecales diarreicas de un individuo infectado, aunque el trofozoíto es muy lábil y desaparece rápidamente en el medio ambiente [Fotedar *et al.*, 2007]

Los trofozoítos son pleomórficos y varían en tamaño (12-60 μm de diámetro); en tejidos de pacientes se encuentran formas de gran tamaño, en tanto que las formas pequeñas se encuentran en portadores asintomáticos. Dependiendo de las condiciones de su entorno y la formación de pseudópodos (proyecciones citoplasmáticas con forma dactilar) son formas móviles rápidas y unidireccionales. El ectoplasma es transparente, mientras que el endoplasma es granular, el cual puede contener bacterias y eritrocitos. Además, posee un núcleo que abarca del 15-20% del tamaño total de la célula. Por otro lado, el tamaño del quiste varía entre 8.5 y 19 μm de diámetro, es generalmente esférico y puede contener de 1 a 4 núcleos. La membrana nuclear está alineada de manera uniforme con la cromatina periférica y exhibe un cariosoma pequeño, localizado usualmente en el centro del núcleo [Bruckner, 1992].

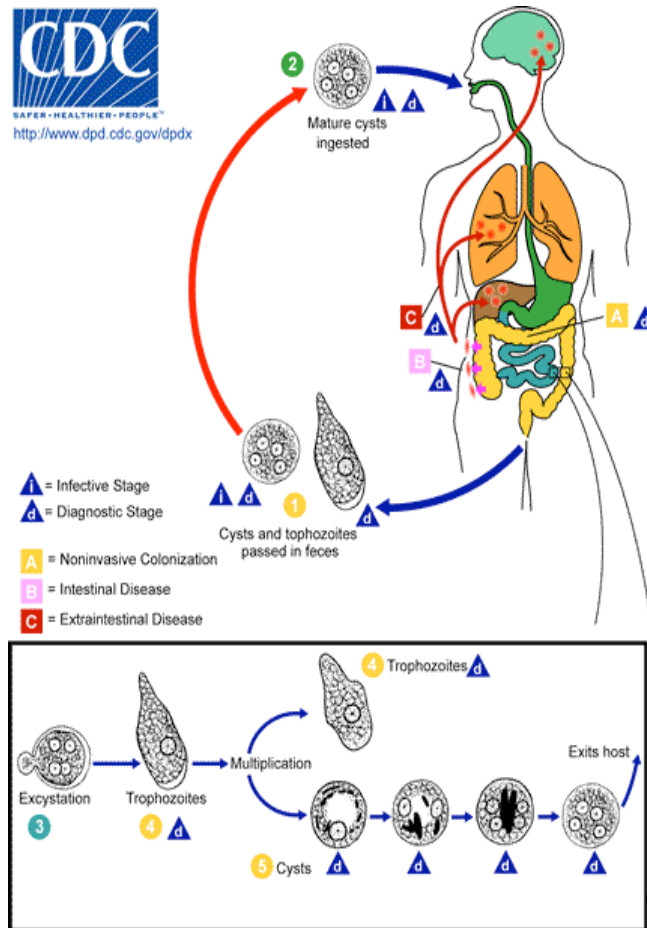


Figura 1. Ciclo vital de *Entamoeba histolytica*.

Tomado de la página web del centro para el control y prevención de enfermedades de E.U.A, 2009.

La infección por *E. histolytica* se adquiere al ingerir los quistes maduros, presentes en agua o alimentos, o en manos contaminadas por heces (vía fecal-oral). Al pasar al intestino delgado, ocurre el proceso de desenquistamiento, generándose un estadio metaquístico; en esta etapa, la amiba se separa de la pared quística y un trofozoíto tetranucleado escapa a través de un pequeño poro. Posteriormente, los núcleos sufren una división adicional (trofozoíto octanucleado), seguida de una fisión celular, rindiendo ocho trofozoítos mononucleados; finalmente, éstos migran hacia el intestino grueso [Bruckner, 1992].

Se piensa que algunos trofozoítos se detienen en el colon debido al decremento abrupto del flujo intestinal y a la afinidad que tiene este parásito por las moléculas presentes en la mucina que recubre el epitelio del colon. Aquí, los trofozoítos se alimentan, crecen y se multiplican por fisión binaria. En muchos casos, los trofozoítos permanecen en el lumen del colon (infección intestinal); sin embargo, en otros casos, los trofozoítos invaden la mucosa intestinal y son transportados, a través de la circulación sanguínea, generando infecciones extra-intestinales, siendo la más común la del hígado (absceso hepático), y con menor frecuencia los pulmones y cerebro [Eichinger, 2001].

Por otro lado, algunos trofozoítos sufren el proceso de enquistamiento: pasando primero por la etapa de pre-quiste, durante la cual adoptan aproximadamente el mismo tamaño que el quiste; posteriormente, desarrollan la pared quística y el núcleo se divide (dos veces) hasta alcanzar la etapa madura, conocida como quiste tetra-nucleado. Los quistes maduros pueden sobrevivir días o semanas en el ambiente externo y son los responsables de la transmisión, a diferencia de los quistes inmaduros (mono- o bi-nucleados) y los trofozoítos, los cuales mueren en el ambiente exterior o son destruidos rápidamente al ser ingeridos (no sobreviven a la acidez del jugo gástrico) [Bruckner, 1992].

Mediante análisis bioquímicos, inmunológicos y genéticos, fue posible reclasificar dos especies morfológicamente idénticas pero genéticamente distintas de *Entamoeba* que infectan el intestino de humanos: *E. histolytica*, potencialmente invasiva y *E. dispar*, no invasiva. En pacientes infectados con *E. dispar*, los trofozoítos permanecen como comensales en el colon [Que y Reed, 2000]. La Figura 1 esquematiza el ciclo de vida de *E. histolytica*.

1.1.2. Genoma

El genoma de *E. histolytica* está conformado por 20,835,395 pb (~20.84 Mb), tiene un bajo contenido de residuos G+C (24.2%) y aproximadamente el 50% es codificante. El análisis bioinformático más reciente identificó 8,342 genes, de los cuales

8,163 codifican para proteínas. Sorprendentemente, uno de cada cuatro genes posee intrones [Lorenzi *et al.*, 2010]. El genoma amibiano está organizado principalmente en cromosomas lineales; sin embargo también posee un número significativo de plásmidos circulares (episomas); interesante, los genes codificantes para los ARN ribosomales se localizan de manera exclusiva en algunos de estos episomas [Bhattacharya *et al.*, 2000].

1.1.3. Virulencia

La infección por *E. histolytica* inicia con la adherencia de los trofozoítos a la mucosa; posteriormente, estos lisan la barrera intestinal (mediante factores citotóxicos), y continúa con la fagocitosis de células del hospedero, ocasionando una respuesta inflamatoria [Santi-Rocca *et al.*, 2009]. La virulencia del parásito se debe a su capacidad secretora de diversas moléculas, entre las que figuran las cisteína proteinasas, la lectina de unión a galactosa/N-acetilgalactosamina, los péptidos formadores de poros (amibaporos), una peroxirredoxina, y la proteína KERP1.

Cisteína proteinasas (EhCPs). Esta familia de proteasas está directamente relacionada con la virulencia y la invasión del parásito, ya que le proporcionan la capacidad de degradar las proteínas de la matriz extracelular (laminina, colágeno, elastina y fibronectina). Además, degradan las inmunoglobulinas IgG e IgA, la interleucina 18 (IL-18) y las anafilotoxinas C3a y C5a, produciendo fragmentos inactivos para evadir la respuesta inmune [Meléndez-López *et al.*, 2007]. Sorprendentemente, el genoma de *E. histolytica* contiene una familia de 50 secuencias codificantes para CPs [Tillack *et al.*, 2007]; sin embargo, más del 90% de la actividad proteolítica en el estadio de trofozoíto es atribuida a los altos niveles de expresión de los genes *EhCP1*, *EhCP2* y *EhCP5*; por otro lado, los genes *EhCP3*, *EhCP4*, *EhCP6*, *EhCP8*, *EhCP9*, *EhCP11*, *EhCP16*, *EhCP17* y *EhCP19* son expresadas a nivel medio, lo que indica que sólo un subgrupo de *EhCPs* es requerido para sustentar el crecimiento *in vitro* [Bruchhaus *et al.*, 2003; Tillack *et al.*, 2007; Ehrenkaufer *et al.*, 2007].

Lectina de unión a galactosa y N-acetilgalactosamina (Gal/NAcGal). Es un heterodímero, conformado por una subunidad pesada (Hgl, 170 kDa) y una ligera (Lgl, 35 kDa) unidas por un enlace disulfuro, que juega un papel crucial en la adherencia de los trofozoítos a las células de la mucosa intestinal, glóbulos rojos y bacterias. La adhesión es vital para que el parásito pueda desarrollar su virulencia, ya que la destrucción celular del epitelio del hospedero depende del contacto directo de los trofozoítos [Bracha *et al.*, 2007].

Amibaporos. Esta familia de péptidos pequeños (77 aminoácidos) se encuentra en vesículas citoplásmicas de los trofozoítos de *E. histolytica*. En estudios *in vitro*, se ha observado que éstos no son secretados de manera continua, sugiriendo que su secreción puede depender de un estímulo, como el contacto célula-célula. Una vez establecido el contacto con la célula blanco (bacteriana o eucariótica), los amibaporos se insertan en su membrana celular formando canales, a través de los cuales puede pasar agua, iones y otras moléculas pequeñas, provocando lisis celular [Solaymani-Mohammadi y Petri, 2008].

Peroxirredoxina. Es un antígeno de superficie de 29 kDa, rico en grupos tiol, presenta actividad peroxidasa y parece conferir protección contra el peróxido de hidrógeno (H₂O₂) generado por el estrés oxidativo, tanto del ambiente interno como del externo. Aparentemente, esta peroxirredoxina es un factor de protección importante contra el ataque oxidativo generado por el hospedero, facilitando la invasión del parásito [Choi *et al.*, 2005].

KERP1. Es una proteína rica en lisina (25%) y ácido glutámico (19%) presente en la superficie y en vesículas internas de *E. histolytica*. Aunque su intervención en la virulencia del parásito debe continuar explorándose, se ha observado que participa en la interacción de los trofozoítos con las células del hospedero [Seigneur *et al.*, 2005]. Además, KERP1 es específica de *E. histolytica* y su expresión aumenta durante el desarrollo de los abscesos hepáticos amibianos [Santi-Rocca *et al.*, 2008].

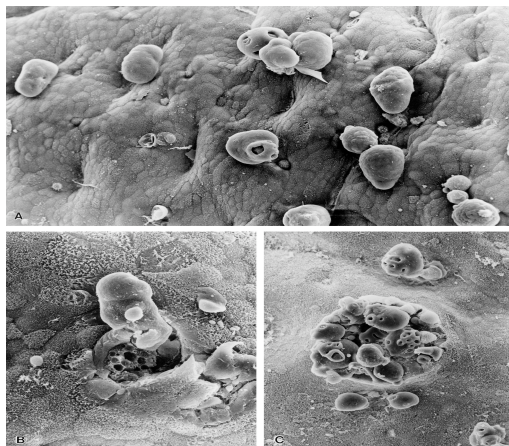


Figura 2. Micrografía electrónica de los eventos patológicos de la amibiasis intestinal en un modelo de laboratorio (cobayo).

(A) Trofozoítos de *E. histolytica* adheridos preferentemente en el epitelio inter-glandular elevado. (B) Una pequeña región inter-glandular de micro-invasión es observada en una lesión invasiva temprana con ulceración superficial. (C) En un estado más avanzado de invasión, numerosos trofozoítos se observan penetrando una úlcera colónica. Tomado de Espinosa-Castellano y Martínez-Palomo, 2000.

1.1.4. Patología

Amibiasis intestinal. La infección intestinal puede presentarse en fases agudas o crónicas. La fase aguda puede manifestarse en forma de: (i) disentería y síndrome diarreico, los cuales representan el 90% de los casos [Espinosa-Castellano y Martínez-Palomo, 2000]; (ii) colitis fulminante, la cual es de evolución rápida y extremadamente severa, caracterizada por lesiones ulcerosas necróticas que se extienden sobre grandes áreas del colon (en ocasiones el colon completo) [Ventura-Juárez *et al.*, 2007]; y (iii) apendicitis amibiana, poco común y de sintomatología semejante a la apendicitis bacteriana, aunque la presencia de diarrea sanguinolenta puede ser de apoyo diagnóstico. Por otro lado, la fase crónica puede manifestarse como colitis crónica o como amiboma, es la forma más rara de amibiasis y se presenta clínicamente como un cuadro obstructivo del colon [Náquira, 1997]. La Figura 2 muestra algunas etapas de la amibiasis intestinal en un modelo de laboratorio.

Amibiasis extra-intestinal. El absceso hepático amibiano es la forma más común de amibiasis extra-intestinal, aunque se han reportado casos de infección pulmonar y cerebral (en muy raras ocasiones). Durante la invasión extra-intestinal, los trofozoítos residentes en el colon lisan la mucosa e interactúan con los enterocitos expuestos, destruyen las uniones celulares y lisan las células del hospedero logrando atravesar la lámina basal y la matriz extracelular; posteriormente, entran al torrente sanguíneo, a

través del sistema porta, dirigiéndose hasta la vénula hepática y sinusoides, donde la amiba atraviesa el endotelio para acceder al parénquima, iniciando el proceso inflamatorio y formación del absceso (debido a la destrucción del tejido hepático) [Santi-Rocca *et al.*, 2009].

1.1.5. Diagnóstico

El diagnóstico de *E. histolytica* es importante para el manejo y tratamiento del paciente. *E. histolytica* es un parásito invasivo, mientras que las especies morfológicamente idénticas: *E. dispar* y *E. moshkovskii*, no lo son; sin embargo, las tres especies pueden llegar a confundirse durante el diagnóstico microscópico. De ocho amibas que pueden infectar humanos (*E. histolytica*, *E. dispar*, *E. moshkovskii*, *E. coli*, *E. hartmanni*, *E. polecki*, *Iodamoeba butschlii*, *Endolimax nana* y *Dientamoeba fragilis*), sólo *E. histolytica* es patógena, mientras que el resto se consideran comensales [Tanyuksel y Petri, 2003].

Actualmente, existe una variedad de técnicas que son utilizadas para el diagnóstico de *E. histolytica*. La microscopía es la técnica más empleada, pero es poco confiable; la detección de anticuerpos circulantes IgG anti-amiba está siendo ampliamente utilizada; sin embargo, no es recomendable en áreas endémicas, ya que son incapaces de reconocer entre infecciones pasadas o actuales. Para discernir el estado de la infección se han desarrollado técnicas que determinan los niveles circulantes de IgM anti-amiba, los cuales apoyan el diagnóstico de abscesos hepáticos amibianos. Por otro lado, muy frecuentemente se utilizan pruebas inmunológicas para detectar antígenos amibianos en heces (*p.e.* *EhHgl-Lgl*, *Ehp29*). Paralelamente, se han desarrollado pruebas moleculares que presentan una mayor sensibilidad y especificidad, comparadas con los inmuno-ensayos, tales como *Dot Blot*, *PCR*, *PCR* en tiempo real y micro-arreglos, entre otras. Aunque son poco accesibles para países en vías de desarrollo (por su alto costo), las pruebas moleculares representan una aproximación válida para el diagnóstico y control de infecciones en países con alta prevalencia de amibiasis [Fotedar *et al.*, 2007; Paul *et al.*, 2007].

1.1.6. Tratamiento

El tratamiento de elección contra la amibiasis, ya sea intestinal o extra-intestinal, es el metronidazol (MTZ), debido a su acción letal contra los trofozoítos de *E. histolytica*, favorable farmacocinética, excelente biodisponibilidad y amplia distribución en la pared intestinal y en la mayoría de los tejidos. Ocasionalmente, en pacientes con múltiples abscesos, la cloroquina (CLQ) puede utilizarse conjuntamente con MTZ, ya que además de ser un fármaco efectivo contra el parásito, presenta una excelente distribución en tejidos, manteniendo altas concentraciones en el parénquima hepático [Salles *et al.*, 2007].

1.2. Diana de rapamicina (target of rapamycin, TOR)

1.2.1. Rapamicina y el descubrimiento de las proteínas TOR

A inicios de la década de los 1970's, se purificó el componente activo rapamicina a partir de extractos de la bacteria *Streptomyces hygroscopicus*. La rapamicina es un macrólido al cual inicialmente se le atribuyó actividad antimicótica, después se le determinó capacidad inmunosupresora (debido a que bloquea el crecimiento y proliferación de linfocitos B y T) y recientemente ha demostrado actividad anti-cancerígena [Crespo y Hall, 2002].

Los primeros análisis de los efectos de rapamicina en la levadura *Saccharomyces cerevisiae* revelaron la presencia de un receptor celular: una proteína de 12 kDa llamada FKBP12 (codificada por el gen FPR1), la cual es una peptidil-prolil(*cis/trans*) isomerasa (PPIasa) que participa en el plegamiento de proteínas. Al unirse la rapamicina a FKBP12, se inhibe la actividad PPIasa y el complejo formado actúa sobre otro blanco celular inhibiendo el crecimiento. Además, se determinó que la presencia de FKBP12 (más no su función) es necesaria para el efecto anti-proliferativo de la rapamicina [Fingar y Blenis, 2004].

Posteriormente, se identificaron mutaciones puntuales que rescataban a la levadura de los efectos letales de la rapamicina. En estos ensayos, se identificaron dos genes que al estar mutados conferían resistencia al macrólido: *tor1* y *tor2*. De esta manera se descubrieron las proteínas Tor1p y Tor2p, cuyos fenotipos silvestres interactúan de manera ternaria con el complejo rapamicina-FKBP12; sin embargo, ninguna es capaz de formar complejos binarios con rapamicina o FKBP12. Las mutaciones puntuales Tor1p: S1972R y Tor2p: S1975I se localizan en el dominio que participa en la unión al complejo rapamicina-FKBP12 (RBD, dominio de unión a rapamicina-FKBP12); sorprendentemente, estas mutaciones evitan la formación del complejo ternario, permitiendo la proliferación celular en presencia de rapamicina [Fingar y Blenis, 2004].

1.2.2. Organización estructural de las proteínas TOR

Tor1p y Tor2p son proteínas multi-dominio de 281 y 282 kDa, respectivamente, presentando entre ellas una homología del 67% y la sección C-Terminal, que contiene el dominio de actividad cinasa (PIKK), es intercambiable (Tor1-Tor2 y Tor2-Tor1), por lo tanto es considerado como equivalentemente funcional [Helliwell *et al.*, 1994]. En la Figura 3 se ilustra la organización estructural de las proteínas TOR así como el complejo de unión rapamicina-FKBP12.

Repetidos HEAT. Son dos dominios localizados en el extremo N-terminal, caracterizados por la presencia de motivos repetidos en tándem y su nombre se deriva de cuatro proteínas donde se identificó originalmente: Huntingtina, Factor de Elongación 3, la subunidad A de la proteína fosfatasa 2A y Tor. Cada repetido *HEAT* forma una hélice anti-paralela y se le atribuye un papel funcional como mediador de interacciones proteína-proteína [Crespo y Hall, 2002].

Dominios FAT/FATC. El dominio FAT se encuentran sólo en los miembros de la familia de las cinasas relacionadas con las fosfatidil inositol cinasas (PIKK): FRAP, ATM y TRAP; y siempre se acompaña de un pequeño dominio FAT localizado en el extremo C-terminal (FATC). Se piensa que el dominio FAT puede funcionar como andamio o como

superficie de interacción proteína-proteína, similar a los repetidos HEAT; debido a que los dominios FAT/FATC sólo se encuentran en la familia de proteínas PIKK y ambos flanqueando el dominio cinasa, se infiere que pueden ser importantes para la actividad catalítica [Crespo y Hall, 2002].

Dominio PIKK. Las proteínas TOR tienen como característica común un dominio conservado, localizado en el extremo C-terminal, con una gran homología al dominio catalítico de las fosfatidil inositol cinasas (PIK), por lo que la presencia de este dominio les ha conferido su definición como cinasas relacionadas a las fosfatidil inositol cinasas (PIKK); específicamente, TOR es una Ser/Thr proteína cinasa y la integridad de este dominio es esencial para su función [Crespo y Hall, 2002]. El dominio PIKK le permite participar en la regulación del crecimiento y progresión del ciclo celular, mediante la fosforilación de proteínas involucradas en esos procesos biológicos.

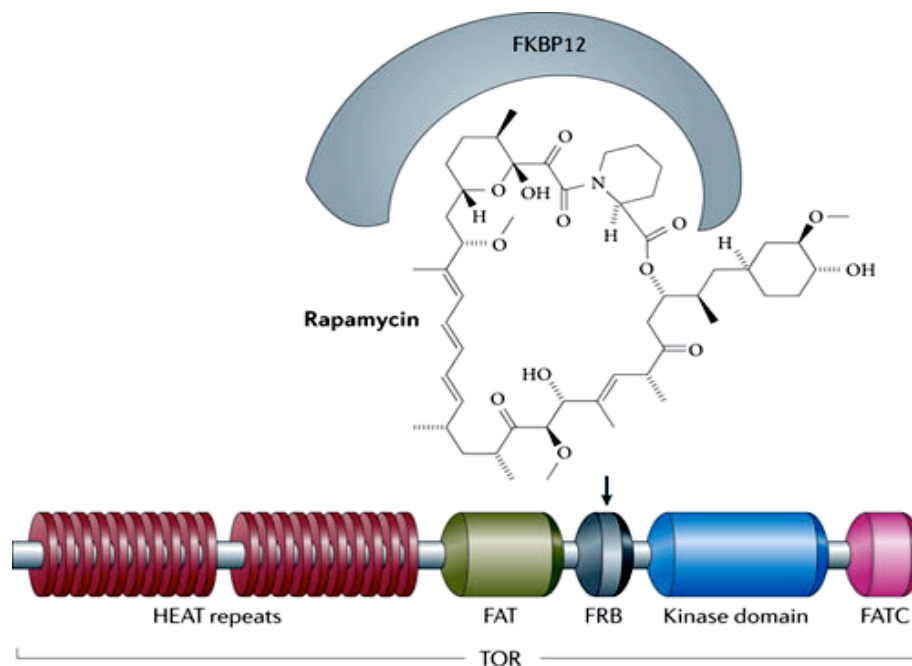


Figura 3. Organización estructural de las proteínas TOR.

Se ilustra de manera general los dominios de las proteínas de la familia TOR (abajo) así como el complejo rapamicina-FKBP12 (arriba) que se une al dominio RBD (unión a rapamicina-FKBP12). Tomado de Benjamin *et al.*, 2011.

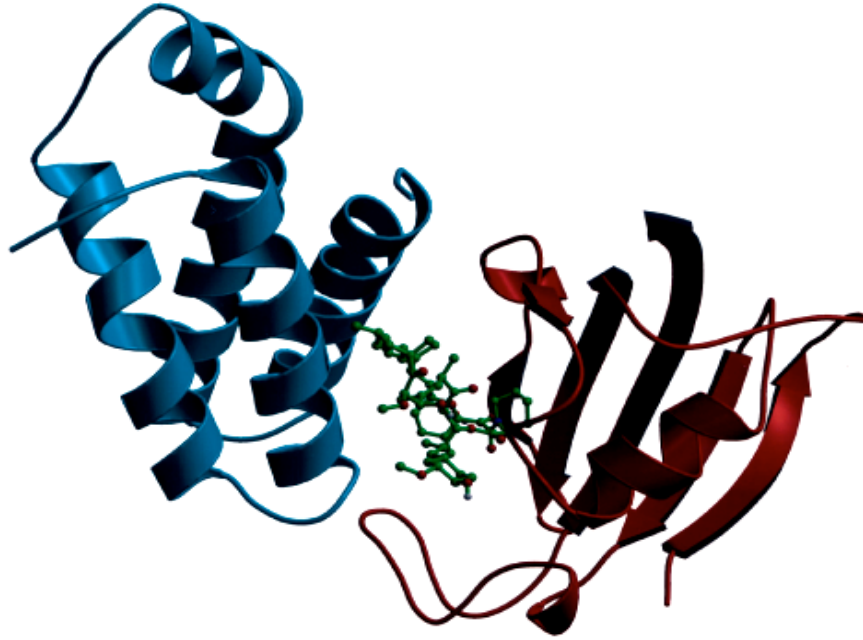


Figura 4. Estructura del complejo Tor-Rapamicina-FKBP12.

Dominio RBD de la proteína mTOR (azul), rapamicina (verde) y FKBP12 (rojo). Tomado de Cárdenas *et al.*, 1999.

Dominio RBD. Se localiza cercano al dominio cinasa, en el extremo N-terminal, y participa en la interacción de la proteína TOR con el complejo rapamicina-FKBP12 gracias a tres residuos: Ser¹⁹⁷², Trp²⁰⁴² y Phe²⁰⁴⁹ (posiciones de la proteína Tor1p, aunque también se encuentran conservados en Tor2p y mTor). Estos residuos forman un bolsillo hidrofóbico en la superficie de la proteína y participan en el anclaje del complejo binario rapamicina-FKBP12. Aún se desconoce el mecanismo mediante el cual la rapamicina inhibe a la proteína Tor; sin embargo, se sabe que es requisito para la interacción la formación del complejo binario; este patrón de inhibición se ha observado en diferentes eucariotas [Cárdenas *et al.*, 1999; Crespo y Hall, 2002].

1.2.3. Familia de proteínas TOR

Actualmente, se han encontrado homólogos de la familia TOR en diferentes organismos (hongos, mamíferos, moscas, gusanos y plantas), sugiriendo que es una

proteína conservada en todos los eucariotas; aunque, a diferencia de la mayoría de los eucariotas inferiores que contienen dos genes TOR, los eucariotas superiores parecen tener sólo uno.

En *D. melanogaster*, *C. elegans* y *A. thaliana* se han caracterizado los genes que codifican para las proteínas TOR: *DmTOR*, *CeTOR* y *AtTOR*, respectivamente, las cuales exhiben una homología entre 28 y 37% a las proteínas TOR de *S. cerevisiae* [Crespo y Hall, 2002]. En humanos, la proteína mTOR (también llamada RAFT1) es una proteína de 2549 residuos de aminoácidos y comparte identidades de 39% y 43% con TOR1 y TOR2 de *S. cerevisiae*, respectivamente. Se ha observado también, que los híbridos de proteínas provenientes de levadura y humano (ScTOR2-RAFT1 y ScTOR1-RAFT1) que contienen la porción C-terminal (donde se encuentra el dominio cinasa de la proteína mTOR), complementan a las mutantes *tor2* y *tor1* de levadura [Alarcón *et al.*, 1996].

1.2.4. Complejos TORC1 Y TORC2

Diversas mutaciones en los genes que codifican para Tor1p y Tor2p han permitido demostrar que éstas participan en dos complejos funcionalmente distintos: TORC1 y TORC2. Las células de *S. cerevisiae* que pierden la función de ambas, presentan un bloqueo en la fase G1 del ciclo celular desde la primera generación, debido a que se inhibe la síntesis proteínica; este fenómeno también se observa después del tratamiento con rapamicina en levaduras con fenotipo silvestre para Tor1p y Tor2p [Helliwell *et al.*, 1998].

Interesantemente, la levadura con la mutación puntual S1972R en Tor1p no sufre bloqueo en la fase G1 en presencia de rapamicina. Por otra parte, la pérdida de la función de TOR1 es complementada por la función de TOR2; sin embargo, la pérdida de la función de TOR2 es letal, generándose de manera aleatoria un bloqueo total en el ciclo celular y, adicionalmente, las células presentan una distribución anormal de la polarización del citoesqueleto. Estos datos revelan que Tor1p y Tor2p comparten una función que controla la progresión de la fase G1 del ciclo celular y que es sensible a la rapamicina; adicionalmente, Tor2p tiene una función (que no comparte con Tor1p) en

la organización del citoesqueleto y que es resistente a rapamicina [Helliwell *et al.*, 1998; De Virgilio y Loewith, 2006].

El complejo TORC1 (sensible a rapamicina) está formado por LST8p, KOG1p, TCO89p (no es esencial para la formación del complejo) y por Tor1p ó Tor2p. Por otra parte, el complejo TORC2 (resistente a rapamicina) está formado por AVO1p, AVO2p, AVO3p, BIT61p, BIT2p, LST8p y TOR2 pero no por TOR1 (AVO2p y las proteínas BIT no son esenciales para la formación del complejo). La función de cada proteína participante aún no se han esclarecido; sin embargo, se sugiere que pueden participar modulando la actividad cinasa de TOR, además de brindar estabilidad al complejo y a los sustratos diana [Wullschleger *et al.*, 2006; De Virgilio y Loewith, 2006].

Ambos complejos pueden asociarse en multímeros y se cree que esta característica les brinda cierta potenciación de la actividad catalítica, ya que los dímeros TORC2 presentan mayor actividad cinasa que el monómero TORC2, así, la pérdida de la dimerización no implica una pérdida de la función [Wullschleger *et al.*, 2006].

1.2.5. Tor y la regulación del ciclo celular

En condiciones favorables (como la disponibilidad de nutrientes y factores de crecimiento), los complejos TOR regulan el ciclo celular a nivel temporal y espacial: TORC1 participa en la modulación del inicio de la traducción, en la biogénesis de ribosomas, en el metabolismo del ARNm, así como en la actividad de permeasas de alta afinidad que bombean aminoácidos para su uso inmediato en la maquinaria de traducción; y TORC2 se encarga de la organización del citoesqueleto [De Virgilio y Loewith, 2006].

Inicio de la traducción. Se ha observado que algunos factores eucarióticos de iniciación de la traducción son blanco de TORC1: eIF4E, eIF4G, y eIF2. Aunque se desconoce el mecanismo de regulación, se ha sugerido que eIF4E puede ser activado indirectamente mediante la fosforilación de una proteína llamada EAP1 (probable regulador negativo de eIF4E). Por otra parte, TORC1 fosforila la Ser⁵⁷⁷ de la proteína

cinasa GCN2 (un regulador negativo de eIF2) inhibiendo su actividad y promoviéndose el inicio de la traducción [De Virgilio y Loewith, 2006].

Biogénesis de ribosomas. El complejo TORC1 activa la transcripción de los genes codificantes para los ARNr dependientes de la ARN polimerasa I, de los genes codificantes para las proteínas ribosomales (RP) dependientes de la ARN polimerasa II, así como de genes codificantes para los ARNt dependientes de la ARN polimerasa III. En el primer caso, TOR activa al factor de iniciación de la transcripción 1A (TIF1A), el cual se asocia a la ARN polimerasa I. En el segundo caso, las moléculas blanco de TOR son: (i) CRF1, un represor del factor FHL1, el cual se une a promotores de los genes codificantes para RP; (ii) el factor de transcripción SFP1, que también se une a promotores de RP; y (iii) factores de modificación de histonas que afectan a los mismos genes. Adicionalmente, otro blanco de TORC1 es una proteína llamada URI/BUD27, que interactúa con la proteína RPB5 (una subunidad compartida por las tres ARN polimerasas), aunque el mecanismo aún es desconocido [De Virgilio y Loewith, 2006; Wullschleger *et al.*, 2006].

Metabolismo de ARN mensajero. Esta actividad celular es de gran importancia para el control de la expresión génica. De manera general, la desadenilación de la molécula del ARN mensajero [acortamiento de la cola de poli-(A)] es seguida por su degradación en sentido 3' → 5' en el exosoma o en sentido 5' → 3' por la exonucleasa XRN1 (previa pérdida de la capucha del extremo 5'). Se ha observado que el tratamiento de las células con rapamicina o expuestas a un medio pobre en nutrientes genera un decremento de diversos ARNm, lo que sugiere que la proteína TOR también participa en la regulación del metabolismo del ARNm, aunque los posibles mecanismos involucrados aún están en estudio [De Virgilio y Loewith, 2006].

Regulación de la actividad permeasa. Las proteínas TOR regulan la concentración intracelular de aminoácidos modulando la actividad de dos tipos de permeasas: (i) permeasa de baja afinidad (GAP1), activada en condiciones pobres de nutrientes y degradada en condiciones opuestas; y (ii) permeasas de alta afinidad (*p.e.*, HIP y TAT2, específicas para His y Trp, respectivamente), activadas en condiciones ricas en

nutrientes y degradadas en condiciones opuestas. TOR participa específicamente mediante fosforilación (en condiciones ricas en nutrientes) de la proteína Npr1, la cual se inhibe al ser fosforilada, propiciando la degradación de GAP1 y viceversa [Inoki *et al.*, 2005].

Organización del citoesqueleto. Esta función se le atribuyó específicamente al complejo TORC2, ya que después de la mutación nula del gen *tor2* (pero no de *tor1*) se genera un bloqueo aleatorio del ciclo celular, además de una despolarización del citoesqueleto (letal para la célula). La señalización de TORC2 es mediada por la activación de la GTPasa RHO1 por medio de la proteína ROM2. La activación de la proteína RHO1 lleva a la fosforilación de la proteína cinasa C1 (PKC1) que, consecuentemente, activa la cascada de las proteínas cinasas activadas por mitógeno (MAPK), la cual mantiene la integridad de la pared celular, al activar la transcripción de los genes requeridos para la biosíntesis de la pared celular [Crespo y Hall, 2002].

1.3. *Saccharomyces cerevisiae* como modelo de estudio de proteínas TOR

1.3.1. *S. cerevisiae* como modelo de célula eucariota

La levadura *S. cerevisiae* presenta una mayor complejidad genética que la bacteria *E. coli* y comparten muchas ventajas técnicas como modelos en biología molecular y celular. *S. cerevisiae* ofrece las ventajas de un sistema eucariótico que ha conservado diversas funciones de eucariotas superiores. Algunas de las propiedades que la hacen idónea como modelo de célula eucariota son: fácil crecimiento, tiempo de duplicación de 2.0 h (a 30 °C), no es patógena, posee un sistema genético bien definido, las réplicas y el aislamiento de mutantes son fáciles de realizar, son viables con diferentes marcadores que permiten una selección específica, son de bajo costo, presentan un ciclo de vida haploide/diploide y, además, son accesibles a las técnicas de ingeniería genética, contribuyendo significativamente a la comprensión de la función de ciertas proteínas *in vivo* [Sherman, 1998].

1.3.2. Complementación funcional de *S. cerevisiae* Δ Tor2

El descubrimiento de las proteínas TOR en la levadura *S. cerevisiae* representó el punto de partida para la búsqueda de homólogos en diversas especies (incluyendo humano y diferentes patógenos para el hombre) y lograr entender los mecanismos moleculares mediante los cuales participa en el crecimiento y en la progresión del ciclo celular, así como su posible papel en la génesis de diversas patologías, lo que podría llevar al desarrollo de nuevos fármacos.

De manera específica, los estudios de complementación de la función de ScTOR2 se valen del ciclo de vida diploide de la levadura *S. cerevisiae* debido a que el fenotipo Δ tor2 es letal, por lo tanto, antes de la obtención de la célula haploide, es necesaria la transfección con un plásmido de supervivencia que le provea de la función de ScTOR2.

Interesantemente, la levadura ha sido utilizada ampliamente como modelo para el estudio de mTOR (el homólogo en humano), que al igual que las proteínas de la familia TOR se encuentra asociada a dos complejos funcionalmente distintos (mTORC1 y mTORC2); sin embargo, la proteína mTOR completa ya sea silvestre o mutante no es funcional en el modelo de levadura (Δ tor1 y Δ tor2) ni confiere resistencia a rapamicina. Sólo el extremo C-terminal es intercambiable por sus homólogos de levadura siendo las proteínas recombinantes equivalentemente funcionales a ScTOR1 y ScTOR2, evidenciando que el dominio cinasa se encuentra conservado en mamíferos lo que puede observarse *in-vitro* mediante un análisis bioinformático en donde se muestra que la región de mayor homología de mTOR con las proteínas ScTor1p y ScTor2p se encuentra en la región de 660 aminoácidos del extremo C-terminal donde aumenta hasta cerca del 60% ; adicionalmente, esta región también presenta una homología del 21% (en promedio) con diversas fosfatidil inositol cinasas, dicha actividad incorpora mTOR a la familia de las fosfatidil inositol cinasas [Alarcón *et al.*, 1996; Brown *et al.*, 1994].

2. JUSTIFICACIÓN

El parásito protozooario *Entamoeba histolytica*, causante de amibiasis en humanos, continúa siendo de importancia para la salud pública en países en vías de desarrollo. En México, la amibiasis es una de las 20 causas principales de morbilidad, ocupando entre el quinto y sexto lugar; aunque puede infectar a cualquier persona, es más prevalente en personas que viven en condiciones sanitarias precarias.

Mediante estudios *in vitro*, se ha observado que cepas de *E. histolytica* (como HM1: IMSS) pueden generar resistencia a metronidazol, fármaco de elección utilizado por más de 4 décadas para tratar la amibiasis, haciendo evidente la posible aparición de cepas resistentes en la población por el uso indiscriminado de fármacos anti-amibianos. Con esto, cobra particular importancia la investigación básica que conduzca a la identificación de posibles blancos farmacológicos; específicamente, moléculas que participen en mecanismos biológicos del parásito que soportan su ciclo vital y su virulencia.

Siendo las proteínas de la familia Tor/FRAP de importancia para la sobrevivencia de otros eucariotas debido a su participación en el crecimiento y progresión del ciclo celular, es primordial conocer si estas proteínas amibianas juegan un papel similar a las proteínas TOR funcionales de otras especies, en cuyo caso pueden ser un blanco farmacológico para el diseño de nuevos agentes terapéuticos.

El presente trabajo se enfoca de manera específica en la proteína EhFRAP (EHI_155160) realizando un análisis bioinformático además de un estudio funcional preliminar mediante un ensayo de complementación de la mutante Δ tor2 de la levadura *S. cerevisiae*.

3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

3.1. Hipótesis

La proteína homóloga a FRAP de *E. histolytica* (*EhFRAP*) presenta una organización de dominios similar a las proteínas TOR y es funcionalmente activa en un modelo de levadura.

3.2. Objetivos

3.2.1. Objetivo general

Analizar el arreglo estructural de la proteína homóloga a FRAP de *E. histolytica* por medio de herramientas bioinformáticas, así como realizar un estudio funcional preliminar mediante un ensayo de complementación de la mutante $\Delta\text{tor}2$ de *S. cerevisiae*.

3.2.2. Objetivos específicos

1. Realizar un análisis bioinformático de la secuencia polipeptídica inferida de la proteína *EhFRAP* por medio del uso de servidores en línea.
2. Obtener el plásmido de expresión en levadura que contenga *EhFRAP* mediante una estrategia de ingeniería de plásmidos.
3. Comprobar el papel funcional de la proteína *EhFRAP* mediante complementación de la mutante $\Delta\text{tor}2$ de *S. cerevisiae*, utilizando el plásmido pYEhFRAP2.
4. Analizar de manera preliminar la función de la proteína *EhFRAP* mediante rescate del fenotipo letal de la mutante $\Delta\text{tor}2$ de *S. cerevisiae* transfectada.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Análisis bioinformático

Para la realización del análisis bioinformático se utilizaron diversos servidores disponibles en línea. La identificación de las secuencias amibianas parecidas a TOR se realizó mediante una búsqueda en la base de datos *AmoebaDB* (<http://amoebadb.org/amoeba/>) usando la palabra clave “*rapamycin*”. El análisis comparativo e identificación de dominios fue realizado utilizando los programas *BLAST* y *CD Search* del servidor NCBI™ (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), *PFam* (<http://pfam.sanger.ac.uk/>) y *Superfamily* (<http://supfam.cs.bris.ac.uk/SUPERFAMILY/>). Las secuencias repetidas *HEAT* fueron identificadas usando el programa en línea *REP* (<http://www.embl.de/~andrade/papers/rep/>). Los alineamientos fueron obtenidos usando los programas *ClustalX* y *BioEdit*, en versiones locales para PC. La predicción de la estructura secundaria fue realizada mediante el servidor *PSIPRED* (<http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/>). Las estructuras tridimensionales fueron inferidas usando los servidores en línea *Swiss-Model* (<http://swissmodel.expasy.org/>) y *Modeller* (<http://salilab.org/modeller/>). Los modelos tridimensionales fueron obtenidos de la base de datos del servidor *RCSB Protein DataBank* (<http://www.rcsb.org/pdb/>). La visualización de los modelos tridimensionales inferidos fue realizada usando la versión para PC del programa *UCSF Chimera*, instalado de manera local.

4.2. Reactivos biológicos y químicos

4.2.1. Células de *Escherichia coli* y medios de cultivo

La cepa XL1-Blue MRF' de *E. coli* (*Stratagene*) fue utilizada de manera rutinaria en las técnicas de biología molecular. Las bacterias competentes para transformación por choque térmico fueron preparadas mediante un tratamiento con CaCl_2 , siguiendo el

protocolo estándar de laboratorio [Sambrook *et. al.*, 2001]. Las bacterias se cultivaron en medios complejos líquidos y sólidos (1.7% de agar). Los medios de cultivo Luria-Bertani (LB) [10 g/L de triptona; 5 g/L de extracto de levadura; 10 g/L de NaCl] y 2X *Yeast-Tryptone* (2X YT) [16 g/L de triptona; 10 g/L de extracto de levadura; 5 g/L de NaCl] fueron preparados de acuerdo a los procedimientos estándar de laboratorio [Sambrook *et. al.*, 2001].

4.2.2. Células de *S. cerevisiae* y medios de cultivo

La cepa MH346-1a de *S. cerevisiae* [Mata *leu2-3,112 ura3-52 rme1 trp1 his4 GAL⁺ HMLa ade2 Δtor2::ade2-3/pSEY18::TOR2*] (amablemente proporcionada por el Dr. Michael N. Hall, Departamento de Bioquímica, Universidad de Basilea, Suiza) presenta una mutación nula del gen *tor2*. Esta mutación es letal; por lo tanto, MH346-1a se mantiene viable gracias a que porta el plásmido pSEY18, el cual expresa de manera Gal-inducida la proteína ScTOR2. Para la propagación de estas células, se utilizó el medio complejo YPGG líquido [1% de extracto de levadura; 2% de peptona; 2% de galactosa; 2% de glicerol]. Para los ensayos de transfección y selección auxotrófica, se utilizó el medio SCGG sólido (sintético completo conteniendo como fuente de carbono 2% de galactosa y 2% de glicerol) suplementado con 20 mg/L de histidina, 20 mg/L de triptófano y 60 mg/L de leucina, de acuerdo a los requerimientos nutricionales. Para el intercambio de plásmidos, SCGG se suplementó con 20 mg/mL de uracilo y 0.1% de ácido 5-fluoro-orótico (FOA).

4.2.3. Plásmidos

pBluescript SK(-) (Stratagene, Figura 5) es un plásmido de clonación en bacteria que contiene los orígenes de replicación f1

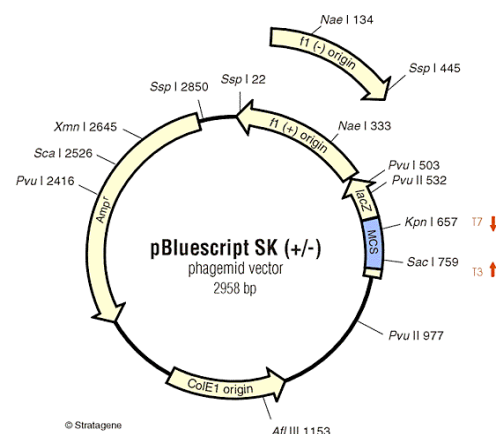


Figura 5. pBluescript SK(-).

(bacteriófago) y ColE1 (bacteria), el gen que confiere resistencia a ampicilina (β -lactamasa) y, además, un sitio de clonaciones múltiples (MCS) que se encuentra interrumpiendo el gen *lacZ* (β -galactosidasa).

pRS245 (New England BioLabs, Figura 6) es plásmido de expresión en levadura que contiene los orígenes de replicación f1 (bacteriófago), pMB1 (bacteria) y 2 μ (levadura), el gen que codifica para la β -lactamasa (para selección en bacterias), y el gen que codifica para LEU2 (que complementa la auxotrofia a leucina en células de levadura $\Delta leu2$).

pYES2 (Invitrogen, Figura 7) es un plásmido de expresión en levadura que contiene los orígenes de replicación f1 (bacteriófago), pUC (bacteria) y 2 μ (levadura), el gen que codifica para la β -lactamasa (para selección en bacterias) y el gen que codifica para URA3 (que complementa la auxotrofia a uracilo en células de levadura $\Delta ura3$); además, contiene un sitio de clonaciones múltiples (flanqueado por el promotor GAL1 y el terminador CYC1).

pSEY18 es un plásmido de expresión en levadura que contiene los orígenes de replicación ColE1 (bacteria) y 2 μ (levadura), el gen que codifica para la β -lactamasa (para selección en bacterias) y el gen que codifica para URA3 (que complementa la auxotrofia a uracilo en células de levadura $\Delta ura3$); además, contiene el gen que codifica para ScTOR2 bajo el control del promotor de GAL1.

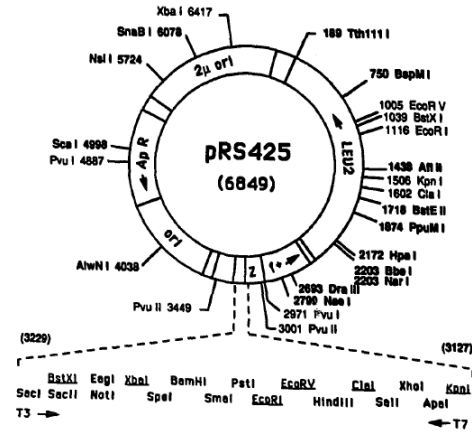


Figura 6. pRS425

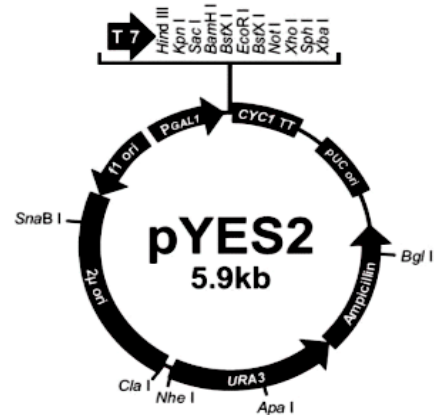


Figura 7. pYES2.

4.2.4. Enzimas y otros reactivos biológicos

Las amplificaciones de las regiones promotora y terminadora; PGAL1 y CYC1TT, respectivamente, se llevaron a cabo mediante un ensayo de *PCR*, utilizando a la enzima ADN polimerasa de *Thermus aquaticus* (*Taq* ADN pol) (*Roche*). La amplificación de la región codificante del gen *EhFRAP* se llevó a cabo mediante un ensayo de *PCR* largo, utilizando el estuche comercial *Expand™ Long Template PCR System* (*Roche*).

Las reacciones de ligación se realizaron utilizando la enzima ADN ligasa del bacteriófago T4 (*New England Biolabs*). Para las reacciones de desfosforilación se usó la enzima fosfatasa alcalina de intestino de becerro recombinante (*bCIP*) (*New England Biolabs*). Las digestiones nucleolíticas se llevaron a cabo utilizando las siguientes endonucleasas de restricción: *XhoI*, *EagI*, *Apal*, *SacII*, *Scal*, *NdeI*, *PstI*, *Clal*, *EcoRI*, *HincII* (*New England Biolabs*) y *HindIII* (*Fermentas*). Para las reacciones de fosforilación de productos de *PCR* se utilizó la enzima polinucleótido cinasa del bacteriófago T4 (*Fermentas*). En las reacciones de rellenado de ADN para generar extremos romos se usó el fragmento grande de la ADN polimerasa I de *E. coli* (fragmento *Klenow*) (*New England Biolabs*). Los marcadores de peso molecular (*Low MW Ladder* y λ -DNA/*HindIII*) y la mezcla de desoxirribonucleótidos trifosfatados (*dNTPs*) fueron adquiridos de la compañía *New England Biolabs*. La enzima β -glucoronidasa del molusco *Helix pomatia* fue adquirida de la compañía *Sigma* de México.

Tabla 1. Oligonucleótidos sintéticos.

NOMBRE	SECUENCIA (5' A 3')
PGAL1F ¹	catcat <i>gggccc</i> acggattagaagccgccc
PGAL1R ²	ggcggg <i>ctcgag</i> gttttttctccttgacgttaaagtataga
EHFRAPF ^{3,6}	caccatg <u>gcttaccatcacgatgttccagattacgct</u> <i>ctgcag ggatcc actagt</i> tcaagtgaagtgttcattgagaagc
EHFRAPR ⁴	cagctg <i>cgcccg</i> ttaccaatatggataccatccttga
CYC1TTF ⁴	cagctg <i>cgcccg</i> gggccgcacatcatgtaattag
CYC1TTR ⁵	cagctg <i>ccgcgg</i> gcaaattaaagccttcgagc

Adaptadores (itálicas): (1) *Apal*; (2) *XhoI*; (3) *PstI*-*BamHI*-*SpeI*; (4) *EagI*; (5) *SacII*.

Epítipo (subrayado): (6) Hemoaglutinina (HA).

4.2.5. Oligonucleótidos sintéticos

Los oligonucleótidos fueron adquiridos a través del servicio de síntesis química de la compañía *Operon Technologies* (Tabla 1).

4.2.6. Reactivos químicos

Todos los reactivos químicos empleados fueron grado BM (Biología Molecular). Agarosa, Tris base (tris-[hidroxietil]-aminometano), SDS (dodecil sulfato de sodio), EDTA (ácido etilendiamino tetra-acético), glicina y glicerol fueron adquiridos de la compañía *IBI*; Cloruro de Calcio, Cloruro de Sodio, Bromuro de Etidio, Triton™ X-100, Tween 20, β -mercaptoetanol, ampicilina, *YNB w/o aminoacids* (mezcla base de fuentes de nitrógeno sin aminoácidos), las perlas de vidrio tratadas con ácido, bis-acrilamida (N, N'-metilen-bis-acrilamida), acetato de sodio, azul de xilencianol y azul de bromofenol fueron obtenidos de la compañía *Sigma* en México. El ácido 5-fluoro-orótico (5-FOA) de *Toronto Research Chemicals*, la galactosa de la compañía *Amresco*, el reactivo TEMED (N,N,N',N'-tetra-metilen-etilendiamina) de la compañía *Bio-Rad*. La acrilamida se adquirió de la compañía *EMD* y el persulfato de amonio de *J.T. Baker Inc.* Los sustratos para la enzima fosfatasa alcalina *BCIP* (fosfato de 5-bromo-4-cloro-3-indol) y *NBT* (nitroazul de tetrazolio) fueron adquiridos de la compañía *Zymed*. De Productos Químicos de Monterrey fue comprado el isopropanol.

4.2.7. Sistemas de purificación

Los diferentes estuches comerciales utilizados para la purificación fueron adquiridos de la compañía *Qiagen*. Para la purificación de los productos de *PCR* se utilizó el estuche *QIAprep™ PCR Purification Kit*, para la extracción de ADN a partir de gel de agarosa se usó el estuche *QIAquick™ Gel Extraction Kit* y para la purificación de ADN plasmídico se utilizó el estuche *QIAprep™ Spin Miniprep Kit*. El estuche comercial *CellLytic™* Y fue utilizado para purificación de proteínas totales a partir de células de *S. cerevisiae*, siguiendo las sugerencias del proveedor.

4.3. Equipo

Las reacciones de amplificación se llevaron a cabo utilizando el equipo *Gradient Thermal Cycler MultiGene* (Labnet International, Inc). Las determinaciones de absorbancia fueron realizadas utilizando el espectrofotómetro UV/Visible *SmartSpec™ Plus* (Bio-Rad). La visualización y digitalización de los geles de agarosa teñidos con bromuro de etidio se llevaron a cabo usando el fotodocumentador *GelDoc™ 2000* (Bio-Rad). Para la transfección celular se utilizó el electroporador *Electro-Cell™ Manipulator 630* (BTX Harvard Apparatus).

4.4. Protocolos generales

4.4.1. Condiciones típicas de amplificación (PCR)

Las mezclas de reacción se llevaron a cabo en un volumen final de 50 µL, con las cantidades siguientes de reactivos: 0.5 a 5.0 ng de ADN molde, 10-20 pmol de oligonucleótidos y 2.5 U de ADN polimerasa, en una solución amortiguadora 1X para reacciones de *PCR* (de acuerdo a las recomendaciones del proveedor).

La amplificación del promotor de Gal1 se llevó a cabo mediante las siguientes condiciones de termociclado: 1 ciclo de desnaturalización inicial [2:00 a 94 °C]; 35 ciclos de amplificación exponencial [0:20 a 94 °C, 0:20 a 55 °C, 1:00 a 72 °C]; y 1 ciclo de extensión final [7:00 a 72 °C].

La amplificación del gen *EhFRAP* se llevó a cabo mediante las siguientes condiciones de termociclado: 1 ciclo de desnaturalización inicial [2:00 a 94 °C]; 10 ciclos de amplificación exponencial [0:10 a 92 °C, 0:15 a 55 °C, 8:00 a 68 °C]; 25 ciclos de amplificación exponencial [0:10 a 92 °C, 0:15 a 55 °C, 8:20 a 68 °C]; y un ciclo de extensión final [7:00 a 68 °C].

La amplificación del terminador CYC1 se llevó a cabo mediante las siguientes condiciones de termociclado: 1 ciclo de desnaturalización inicial [2:00 a 94 °C], 35 ciclos

de amplificación exponencial [0:20 a 94 °C, 0:20 a 55 °C, 1:00 a 72 °C] y un ciclo de extensión final [7:00 a 72 °C].

4.4.2. Purificación de productos de la reacción de PCR

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

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

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

4.4.4. Purificación de ADN plasmídico

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

QIAprepTM Spin Column. La columna fue lavada con 500 μ L de amortiguador PB y 750 μ L del amortiguador PE. El ADN plasmídico fue recuperado en 100 μ L de agua destilada estéril mediante centrifugación a 14,500 rpm durante 1 min.

4.4.5. Análisis de ADN mediante electroforesis en gel de agarosa

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

4.4.6. Transformación bacteriana

Las bacterias fueron transformadas mediante choque térmico. Las células competentes de *E. coli* fueron preparadas a partir de 1 mL de cultivo, siguiendo el protocolo estándar de laboratorio [Sambrook *et al.*, 2001]. 2 μ L de la muestra de ADN (plásmido o ligación) fueron mezclados con 100 μ L de células competentes y mantenidos en hielo durante 30 min. Posteriormente, la mezcla fue colocada en un termobloque a 42 °C, mantenida durante 1.5 min, inmediatamente regresada a hielo y mantenida durante 5 min. Las células fueron recuperadas en 1 mL de medio 2X YT e incubadas durante 1 h a 37 °C. La pastilla celular fue obtenida mediante centrifugación a 14,000 rpm durante 1 min. Las células fueron sembradas en medio LB sólido, suplementado con ampicilina a 150 μ g/mL (como marcador de selección) e incubadas durante la noche a 37 °C. Al día siguiente, las unidades formadoras de colonias capaces de crecer en presencia del antibiótico fueron consideradas como estables.

4.5. Estrategia de construcción del plásmido pBEhFRAP

El plásmido pBEhFRAP, portador del gen *EhFRAP* completo, fue construido en tres etapas secuenciales. La Figura 8 muestra de manera simple el esquema de clonación y unión de los fragmentos de restricción. A continuación se describe la metodología utilizada durante cada una de las etapas.

4.5.1. Construcción del plásmido pBEhFRAP/Frag1

Análisis y separación de los fragmentos de digestión de EhFRAP. Inicialmente, se amplificó el gen *EhFRAP* (Protocolo general 4.4.1), usando oligonucleótidos específicos como iniciadores (Tabla 1) y ADN genómico de *E. histolytica* HM1-IMSS como molde (reserva de ADN del laboratorio de biotecnología de la FCQI, UABC). El producto de PCR fue purificado (Protocolo general 4.4.2) y digerido con las endonucleasas de restricción *Hind*III y *Eco*RI. Una mezcla de reacción fue preparada en un volumen total 50 µL, conteniendo 45 µL del producto de PCR, 10 U de *Hind*III y 20 U de *Eco*RI en una solución amortiguadora 1X, compatible para ambas enzimas (de acuerdo a las recomendaciones del proveedor). La mezcla fue incubada durante 2 h a 37 °C y los fragmentos de digestión fueron separados mediante electroforesis en gel de agarosa (Protocolo general 4.4.5).

La Figura 8-A muestra una representación esquemática del gen *EhFRAP*. Tanto la predicción como el análisis de los fragmentos de digestión mostraron tres segmentos: el fragmento *EhFRAP*f1 (Frag1), que comprende del extremo 5' al sitio *Hind*III (1966 pb); fragmento *EhFRAP*f2 (Frag2), que comprende del sitio *Hind*III al *Eco*RI (3760 pb); y fragmento *EhFRAP*f3 (Frag3), que comprende del sitio *Eco*RI al extremo 3' (1780 pb).

Los fragmentos *EhFRAP* fueron purificados a partir de gel de agarosa (Protocolo general 4.4.3); cabe mencionar que Frag1 y Frag3 fueron co-purificados (ya que presentan una talla molecular muy similar). La pureza de los productos de digestión fue verificada mediante electroforesis en gel de agarosa (Protocolo general 4.4.5).

Preparación del plásmido pBluescript SK(-). El plásmido de clonación bacteriana pBluescript SK(-) (Figura 5) fue purificado (Protocolo general 4.4.4) y digerido para generar extremos compatibles con el fragmento *EhFRAP*f1 (Frag1). La mezcla de reacción se llevó a cabo en un volumen total de 20 µL, conteniendo 8 µL del plásmido, 5 U de *Hinc*II y 5 U de *Hind*III en una solución amortiguadora 1X, compatible con ambas enzimas (considerando las recomendaciones del proveedor). La mezcla fue incubada durante 1.5 h a 37 °C; posteriormente, el plásmido fue desfosforilado con 10 U de fosfatasa alcalina (*bCIP*) e incubado durante 0.5 h a 37 °C. El plásmido pBluescript SK(-)

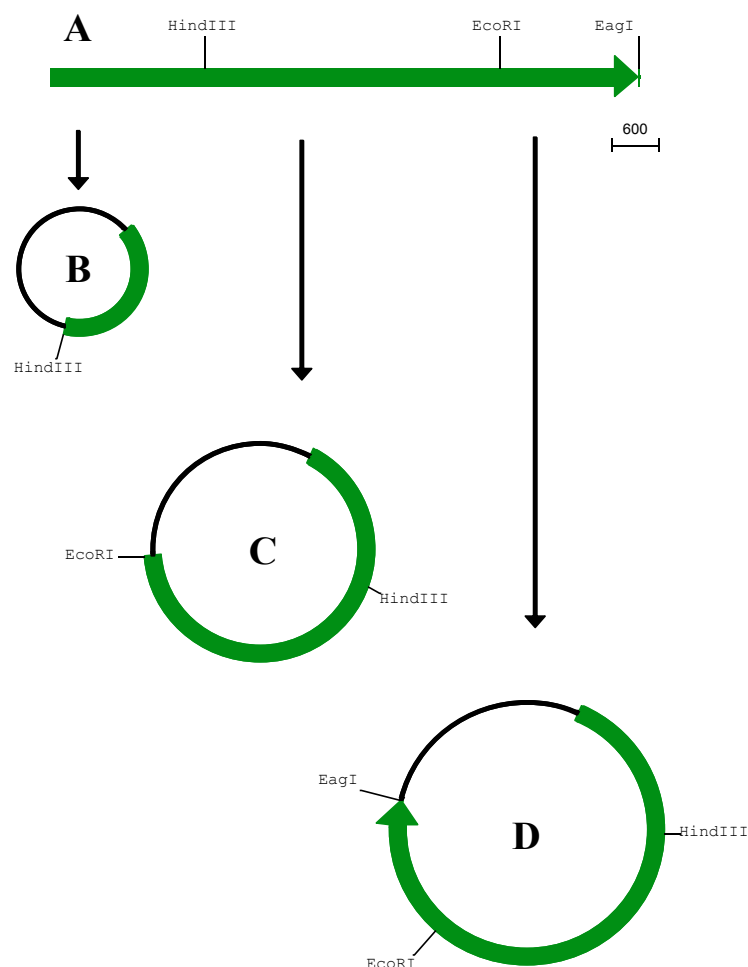


Figura 8. Estrategia de construcción de pBEhFRAP.

(A) Producto de la amplificación de *EhFRAP*, 7527; (B) pBEhFRAP/Frag1, 4912;
(C) pBEhFRAP/Frag1-Frag2, 8664; (D) pBEhFRAP, 10414. Escala en pb.

digerido con *HincII* y *HindIII*, defosforilado, fue purificado (Protocolo general 4.4.2) y analizado mediante electroforesis en gel de agarosa (Protocolo general 4.4.5).

Construcción de pBEhFRAP/Frag1. La reacción de ligación del fragmento *EhFRAPf1* (con extremos romo/cohesivo-*HindIII*) y el plásmido pBluescript SK(-) (con extremos romo-*HincII*/cohesivo-*HindIII*) fue realizada utilizando la enzima ADN ligasa del bacteriófago T4. Una mezcla de ligación de 10 uL se preparó conteniendo 7 µL de la mezcla *EhFRAPf1*/*EhFRAPf3*, 1 µL de plásmido desfosforilado, 1 µL de la enzima ADN

ligasa y 1 μ L de una solución amortiguadora 10X para ligaciones (de acuerdo a las recomendaciones del proveedor). La mezcla se incubó a 16 °C durante la noche. El producto de ligación fue transfectado en células competentes de *E. coli* Top 10 F' mediante choque térmico (Protocolo general 4.4.6). Aleatoriamente, se prepararon cultivos de varias unidades formadoras de colonia y se aisló el plásmido mediante una mini-purificación (Protocolo general 4.4.4). La identificación de las clonas positivas (es decir, que contengan el fragmento *EhFRAPf1*) se realizó mediante un análisis de restricción con las endonucleasas *HindIII*, *XhoI* y *NcoI* (considerando la variabilidad de la longitud de los fragmentos de restricción). Los productos de digestión fueron analizados mediante electroforesis en gel de agarosa (Protocolo general 4.4.5). Las clonas positivas fueron nombradas pBEhFRAP/Frag1 (Figura 8-B).

4.5.2. Construcción del plásmido pBEhFRAP/Frag1-Frag2

Preparación del plásmido pBEhFRAP/Frag1. Para la incorporación del fragmento *EhFRAPf2*, el plásmido pBEhFRAP/Frag1 fue digerido con las endonucleasas de restricción *HindIII* y *EcoRI* para generar extremos cohesivos compatibles. La reacción de digestión se llevó a cabo en un volumen total de 20 μ L, conteniendo 17 μ L del plásmido y 5 U de *EcoRI* en una solución amortiguadora 1X, compatible con la enzima (tomando en cuenta las consideraciones del proveedor). La reacción fue incubada durante 1 h a 37 °C. Posteriormente, la mezcla fue suplementada con 5 U de *HindIII* y se diluyó a un volumen final de 40 μ L con una solución amortiguadora 1X, compatible con la enzima (considerando las recomendaciones del proveedor). La mezcla se incubó durante 1 h a 37 °C. Finalmente, el plásmido fue desfosforilado con 10 U de fosfatasa alcalina (*bCIP*) e incubado durante 0.5 h a 37 °C. El plásmido pBEhFRAP/Frag1 digerido con *EcoRI* y *HindIII*, defosforilado, fue purificado (Protocolo general 4.4.2) y se analizó mediante electroforesis en gel de agarosa (Protocolo general 4.4.5).

Construcción de pBEhFRAP/Frag1-Frag2. La reacción de ligación del fragmento *EhFRAPf2* (con los extremos cohesivo-*HindIII*/cohesivo-*EcoRI*) y el plásmido pBEhFRAP/Frag1 (con los mismos extremos cohesivos) fue llevada a cabo utilizando la

enzima ADN ligasa del bacteriófago T4. Una mezcla de ligación de 10 µL se preparó conteniendo 7 µL del fragmento *EhFRAPf2*, 1 µL de plásmido desfosforilado, 1 µL de la enzima ADN ligasa y 1 µL de una solución amortiguadora 10X para ligaciones (de acuerdo a las recomendaciones del proveedor). La mezcla se incubó a 16 °C durante la noche. El producto de ligación fue transfectado en células competentes de *E. coli* XL1-Blue MRF' mediante choque térmico (Protocolo general 4.4.6). Aleatoriamente, se prepararon cultivos de varias unidades formadoras de colonia y se aisló el plásmido mediante una mini-purificación (Protocolo general 4.4.4). La identificación de las clonas positivas (es decir, que contengan los fragmentos *EhFRAPf1* y *EhFRAPf2*) se realizó mediante un análisis de restricción con las endonucleasas *HindIII*, *EcoRI*, *XhoI* y *XbaI* (considerando la variabilidad de la longitud de los fragmentos de restricción). Los productos de digestión fueron analizados mediante electroforesis en gel de agarosa (Protocolo general 4.4.5). Las clonas positivas fueron nombradas pBEhFRAP/Frag1-Frag2 (Figura 8-C).

4.5.3. Construcción del plásmido pBEhFRAP

Preparación del fragmento EhFRAPf3. Para la facilitar la clonación, el fragmento *EhFRAPf3* fue digerido con la enzima *EagI*. Una reacción de 15 µL fue preparada conteniendo 10 µL de la mezcla *EhFRAPf1/EhFRAPf3* y 5 U de *EagI* en una solución amortiguadora 1X, compatible con la enzima (considerando las recomendaciones del proveedor). La reacción se llevó a cabo durante 2 h a 37 °C y, posteriormente, la enzima fue inactivada a 65 °C durante 20 min.

Preparación del plásmido pBEhFRAP/Frag1-Frag2. Para la incorporación del fragmento *EhFRAPf3*, el plásmido pBEhFRAP/Frag1-Frag2 fue digerido con las endonucleasas de restricción *EcoRI* y *EagI* para generar extremos cohesivos compatibles. La reacción de digestión se llevó a cabo en un volumen de 20 µL, conteniendo 17 µL del plásmido y 5 U de *EcoRI* en una solución amortiguadora 1X, compatible con la enzima (considerando las recomendaciones del proveedor). La reacción fue incubada durante 1 h a 37 °C. Posteriormente, la mezcla fue suplementada

con 10 U de *EagI* y se diluyó a un volumen final de 40 μ L con una solución amortiguadora 1X, compatible con la enzima (tomando en cuenta las consideraciones del proveedor). La mezcla se incubó durante 1 h a 37 °C. Finalmente, el plásmido fue desfosforilado con 10 U de fosfatasa alcalina (*bCIP*) e incubado durante 0.5 h a 37 °C. El plásmido pBEhFRAP/Frag1-Frag2 digerido con *EcoRI* y *EagI*, desfosforilado, fue purificado (Protocolo general 4.4.2) y se analizó mediante electroforesis en gel de agarosa (Protocolo general 4.4.5).

Construcción de pBEhFRAP. La reacción de ligación del fragmento *EhFRAPf3* (con los extremos cohesivo-*EagI*/cohesivo-*EcoRI*) y el plásmido pBEhFRAP/Frag1-Frag2 (con los mismos extremos cohesivos) fue llevada a cabo utilizando la enzima ADN ligasa del bacteriófago T4. Una mezcla de ligación de 10 μ L se preparó conteniendo 7 μ L del fragmento *EhFRAPf3*, 1 μ L de plásmido desfosforilado, 1 μ L de la enzima ADN ligasa y 1 μ L de una solución amortiguadora 10X para ligaciones (de acuerdo a las recomendaciones del proveedor). La mezcla se incubó a 16 °C durante la noche. El producto de ligación fue transfectado en células competentes de *E. coli* XL1-Blue MRF' mediante choque térmico (Protocolo general 4.4.6). Aleatoriamente, se prepararon cultivos de varias unidades formadoras de colonia y se aisló el plásmido mediante una mini-purificación (Protocolo general 4.4.4). La identificación de las clonas positivas (es decir, que contengan los fragmento *EhFRAPf1*, *EhFRAPf2* y *EhFRAPf3*) se realizó mediante un análisis de restricción con las endonucleasas *HindIII*, *EagI* y *EcoRI* (considerando la variabilidad de la longitud de los fragmentos de restricción). Los productos de digestión fueron analizados mediante electroforesis en gel de agarosa (Protocolo general 4.4.5). Las clonas positivas fueron nombradas pBEhFRAP (Figura 8-D).

4.6. Estrategia de construcción del plásmido pYEhFRAP2

El plásmido de expresión en levadura pYEhFRAP2, portador del gen *EhFRAP* y controlado por el promotor Gal1 y el terminador CYC1, fue construido en varias etapas. A continuación se describe la metodología utilizada durante cada una de las etapas.

4.6.1. Construcción del plásmido pRS425/EhFRAP

Preparación de pRS425 y EhFRAP. El plásmido pBEhFRAP fue utilizado como donador de la secuencia de *EhFRAP*. Los plásmidos pBEhFRAP (Figura 9-D) y pRS425 (Figura 9-E) fueron digeridos con las endonucleasas de restricción *XhoI* y *EagI* para generar extremos cohesivos compatibles. Se prepararon dos mezclas independientes conteniendo 17 μ L del plásmido (pBEhFRAP o pRS425), 5 U de *EagI* y 5 U de *XhoI* en una solución amortiguadora 1X, compatible con ambas enzimas (considerando las recomendaciones del proveedor). Las reacciones se incubaron durante 2 h a 37 °C. El plásmido pRS425 fue desfosforilado utilizando 10 U de fosfatasa alcalina (*bCIP*) durante 0.5 h a 37 °C. El fragmento correspondiente a *EhFRAP* fue purificado a partir de gel de agarosa (Protocolo general 4.4.3) y el plásmido linearizado fue purificado directamente (Protocolo general 4.4.2). Ambos productos fueron analizados mediante electroforesis

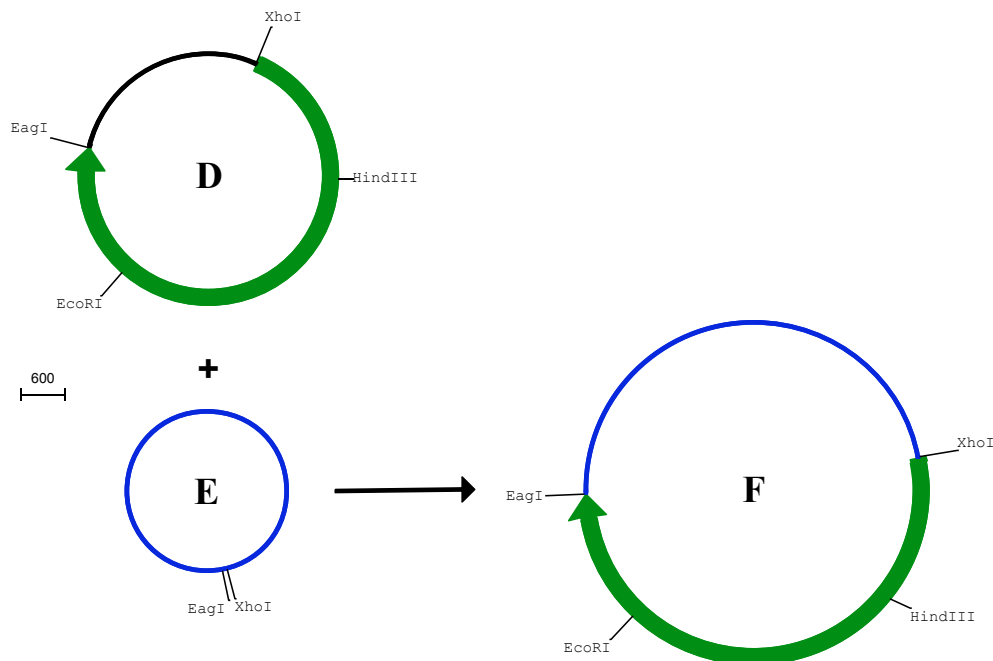


Figura 9. Estrategia de construcción de pRS425/EhFRAP.

(D) pBEhFRAP, 10414; (E) pRS425, 6849; (F) pRS425/EhFRAP, 14305. Escala en pb.

en gel de agarosa (Protocolo general 4.4.5).

Construcción de pRS425/EhFRAP. La reacción de ligación del fragmento *EhFRAP* (con los extremos cohesivo-*XhoI*/cohesivo-*EagI*) y el plásmido pRS425 (con los mismos extremos) fue llevada a cabo utilizando la enzima ADN ligasa del bacteriófago T4. Una mezcla de ligación de 10 µL se preparó conteniendo 7 µL del fragmento *EhFRAP*, 1 µL del plásmido desfosforilado, 1 µL de ADN ligasa y 1 µL de una solución amortiguadora 10X para ligaciones (de acuerdo a las recomendaciones del proveedor). La mezcla fue incubada durante la noche a 16 °C. El producto de ligación fue transfectado en células competentes de *E. coli* XL1-Blue MRF' mediante choque térmico (Protocolo general 4.4.6). Aleatoriamente, se prepararon cultivos de varias unidades formadoras de colonia y se aisló el plásmido mediante una mini-preparación (Protocolo general 4.4.4). La identificación de las clonas positivas (es decir, que contengan el fragmento *EhFRAP*) se realizó mediante un análisis de restricción con las endonucleasas *XhoI*, *SacII*, *ScaI*, *NdeI*, *HindIII* y *EcoRI* (considerando la variabilidad de la longitud de los fragmentos de restricción). Los productos de la digestión fueron analizados mediante electroforesis en gel de agarosa (Protocolo general 4.4.5). Las clonas positivas fueron designadas como pRS425/EhFRAP (Figura 9-F).

4.6.2. Construcción del plásmido pRS425/EhFRAP-CYC1TT

Preparación de *CYC1TT* y pRS425/EhFRAP. Inicialmente, se amplificó la secuencia *CYC1TT* (Protocolo general 4.4.1), usando oligonucleótidos específicos como iniciadores (Tabla 1) y el plásmido pYES2 como molde (reserva de plásmidos del laboratorio de biotecnología de la FCQI, UABC), y posteriormente fue purificado (Protocolo general 4.4.2) y analizado (Protocolo general 4.4.5). Tanto el producto de PCR *CYC1TT* (Figura 10-G) como el plásmido pRS425/EhFRAP (Figura 10-F) fueron digeridos con las endonucleasas de restricción *EagI* y *SacII*. Dos mezclas de reacción independientes fueron preparadas en un volumen total de 20 µL, conteniendo 17 µL del producto de PCR o del plásmido y 10 U de *EagI* en una solución amortiguadora 1X, compatible con la enzima (de acuerdo a las recomendaciones del proveedor). Las mezclas fueron

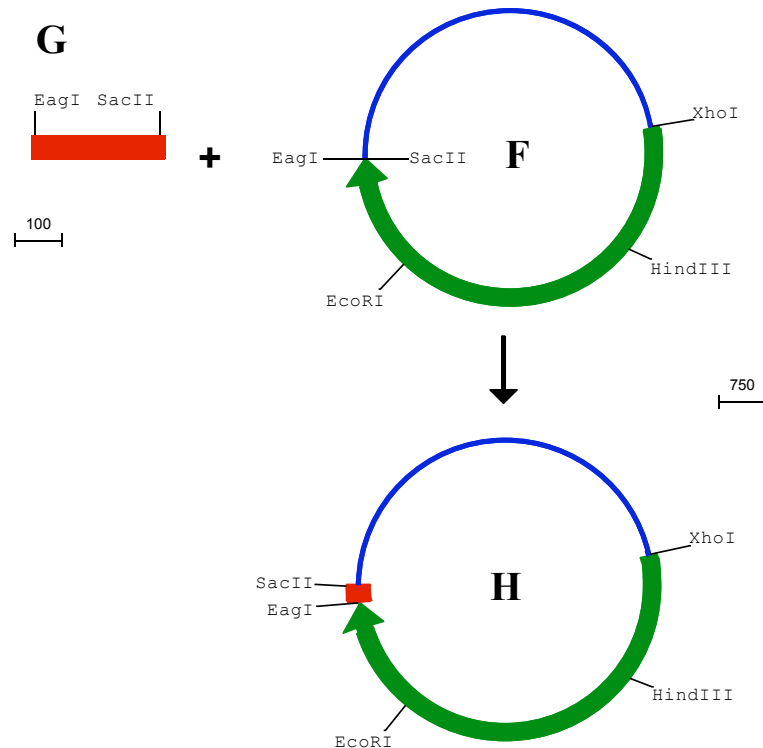


Figura 10. Estrategia de construcción de pRS425/EhFRAP-CYC1TT.

(F) pRS425/EhFRAP, 14305; (G) Producto de la amplificación de CYC1TT, 280; (H) pRS425/EhFRAP-CYC1TT, 14558. Escala en pb.

incubadas durante 1 h a 37 °C. Posteriormente, ambas mezclas fueron suplementadas con 20 U de *SacII* y diluidas a un volumen final de 40 µL con una solución amortiguadora 1X, compatible con la enzima (tomando en cuenta las consideraciones del proveedor). La mezcla se incubó durante 1 h a 37 °C. Finalmente, el plásmido fue desfosforilado con 10 U de fosfatasa alcalina (*bCIP*) e incubado durante 0.5 h a 37 °C. Ambas preparaciones fueron purificadas (Protocolo general 4.4.2) y se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa (Protocolo general 4.4.5).

Construcción de pRS425/EhFRAP-CYC1TT. La reacción de ligación del fragmento CYC1TT (con los extremos cohesivo-*SacII*/cohesivo-*EagI*) y el plásmido pRS425/EhFRAP (con los mismos extremos) fue realizada utilizando la enzima ADN ligasa del

bacteriófago T4. Una mezcla de ligación de 10 μ L se preparó mezclando 7 μ L del inserto CYC1TT, 1 μ L del plásmido desfosforilado, 1 μ L de ADN ligasa y 1 μ L de una solución amortiguadora 10X para ligaciones (de acuerdo con las recomendaciones del proveedor). La mezcla fue incubada durante la noche a 16 °C. El producto de ligación fue transfectado en células competentes de *E. coli* XL1-Blue MRF' mediante choque térmico (Protocolo general 4.4.6). Aleatoriamente, se prepararon cultivos de varias unidades formadoras de colonia y se aisló el plásmido mediante una mini-preparación (Protocolo general 4.4.4). La identificación de las clonas positivas (es decir, que contengan el fragmento *EhFRAP-CYC1TT*) se realizó mediante un análisis de restricción con las endonucleasas *EcoRI* y *SacII* (considerando la variabilidad de la longitud de los fragmentos de restricción). Los productos de digestión fueron analizados mediante electroforesis en gel de agarosa (Protocolo general 4.4.5). Las clonas positivas fueron designadas como pRS425/*EhFRAP-CYC1TT* (Figura 10-H).

4.6.3. Construcción de los plásmidos pBPGAL1 y pRS425/PGAL1

Preparación de PGAL1. Inicialmente, se amplificó la secuencia PGAL1 (Protocolo general 4.4.1), usando oligonucleótidos específicos como iniciadores (Tabla 1) y el plásmido pYES2 como molde (reserva de plásmidos del laboratorio de biotecnología de la FCQI, UABC), y posteriormente fue purificado (Protocolo general 4.4.2). El producto de PCR PGAL1 fue rellenado y fosforilado en una reacción de 30 μ L, conteniendo 8 μ L del PGAL1, 1 μ L de 2.5 mM dNTPs, 2.5 U de Klenow y 10 U de PNK en una solución amortiguadora compatible con ambas enzimas (considerando las recomendaciones del proveedor). La mezcla fue incubada durante 0.5 h a 25 °C. El producto PGAL1 preparado fue purificado (Protocolo general 4.4.2) y analizado mediante electroforesis en gel de agarosa (Protocolo general 4.4.5).

Construcción de pBPGAL1. La secuencia del promotor PGAL1 preparada (Figura 11-I) fue clonada en el plásmido pBluescript SK(-) (con los extremos romos y desfosforilado) utilizando la enzima ADN ligasa del bacteriófago T4. Una mezcla de ligación de 10 μ L se preparó agregando 7 μ L del inserto PGAL1, 1 μ L del plásmido, 1 μ L

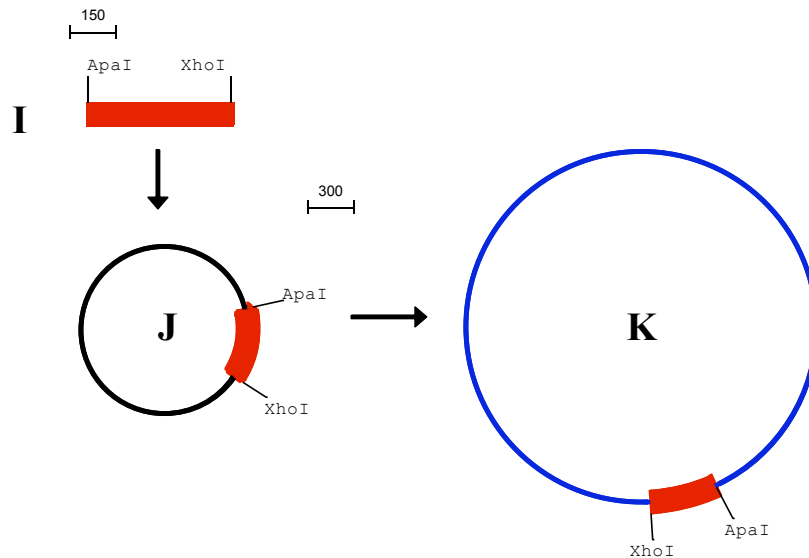


Figura 11. Estrategia de construcción de pBPGAL1 y pRS425/PGAL1.

(I) Producto de la amplificación de PGAL1, 474; (J) pBPGAL1, 3432;
(K) pRS425/PGAL1, 7296. Escala en pb.

de ADN ligasa y 1 μ L de una solución amortiguadora 10X para ligaciones (de acuerdo a las recomendaciones del proveedor). La mezcla fue incubada durante la noche a 16 °C. El producto de esta ligación fue transfectado en células competentes de *E. coli* XL1-Blue MRF' mediante choque térmico (Protocolo general 4.4.6). Aleatoriamente, se prepararon cultivos de varias unidades formadoras de colonia y se aisló el plásmido mediante una mini-preparación (Protocolo general 4.4.4). La identificación de clonas positivas (aquellas que contienen el inserto PGAL1) se realizó mediante una amplificación de PGAL1 usando los oligonucleótido universales M13 (Protocolo general 4.4.1). Los productos obtenidos se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa (Protocolo general 4.4.5). Una clona positiva (con la orientación requerida) fue nombrada pBPGAL1 (Figura 11-K).

Preparación de PGAL1 y pRS425. Inicialmente, se amplificó la secuencia PGAL1 (Protocolo general 4.4.1), usando oligonucleótidos universales M13 como iniciadores y el plásmido pBPGAL1 como molde (obtenido previamente), y posteriormente fue

purificado (Protocolo general 4.4.2) y analizado (Protocolo general 4.4.5). Tanto el producto de PCR PGAL1 como el vector pRS425 fueron digeridos con la endonucleasa de restricción *Xho*I. La digestión PGAL1 se llevó a cabo en una mezcla de 20 μ L, conteniendo 17 μ L del producto de PCR y 10 U de *Xho*I en una solución amortiguadora 1X, compatible con la enzima (de acuerdo a las recomendaciones del proveedor). La mezcla se incubó durante 1 h a 37 °C. Por otro lado, la digestión de pRS425 se realizó en un volumen de 10 μ L, conteniendo 8 μ L del plásmido y 10 U de *Xho*I en una solución amortiguadora 1X, compatible con la enzima (considerando las recomendaciones del proveedor). La mezcla se incubó durante 1.5 h a 37 °C. De manera adicional, el vector fue desfosforilado con 10 U de fosfatasa alcalina (*bCIP*) e incubado durante 0.5 h a 37 °C. Ambas preparaciones, producto de PCR y plásmido, fueron purificadas (Protocolo general 4.4.2) y analizadas mediante electroforesis en gel de agarosa (Protocolo general 4.4.5).

Construcción de pRS425/PGAL1. La reacción de ligación del fragmento PGAL1 (con ambos extremos cohesivos-*Xho*I) y el plásmido pRS425 (con los mismos extremos) se realizó utilizando la enzima ADN ligasa del bacteriófago T4. Una mezcla de ligación de 10 μ L se preparó mezclando 7 μ L del inserto PAGL1, 1 μ L del plásmido desfosforilado, 1 μ L de ADN ligasa y 1 μ L de una solución amortiguadora 10X para ligaciones (considerando las recomendaciones del proveedor). La mezcla se incubó durante la noche a 16 °C. El producto fue transfectado en células competentes de *E. coli* Top 10 F' mediante choque térmico (Protocolo general 4.4.6). Aleatoriamente, se prepararon cultivos de varias unidades formadoras de colonia y se aisló el plásmido mediante una mini-preparación (Protocolo general 4.4.4). La identificación de clonas positivas (es decir, aquellas que contienen PGAL1) se llevó a cabo mediante un análisis de restricción, utilizando las enzimas *Hind*III, *Xho*I y *Pst*I (considerando la variabilidad de la longitud de los fragmentos de restricción). Los productos de digestión fueron analizados mediante electroforesis en gel de agarosa (Protocolo general 4.4.5). Las clonas positivas fueron designadas como pRS425pBPGAL1. Enseguida, para eliminar remanentes del plásmido pBluescript SK(-), el plásmido pRS425pBPGAL1 fue digerido con la endonucleasa de

restricción *Apal* y autoligado con la enzima ADN ligasa del bacteriófago T4. La reacción fue llevada a cabo en una mezcla de 10 μ L, conteniendo 2 μ L del plásmido y 25 U de *Apal* y en una solución amortiguadora 1X, compatible con la enzima (de acuerdo a las recomendaciones del proveedor). La mezcla fue incubada durante 1 h a 25 °C e inactivada durante 20 min a 65 °C. La reacción de autoligación fue llevada a cabo añadiendo, a la mezcla de reacción anterior, 8 μ L de agua destilada estéril, 1 μ L de ADN ligasa y 1 μ L de una solución amortiguadora 10X para ligaciones (de acuerdo con las recomendaciones del proveedor). La mezcla se incubó durante la noche a 16 °C. El producto de esta autoligación fue transfectado en células competentes de *E. coli* TOP 10 F' mediante choque térmico (Protocolo general 4.4.6). Aleatoriamente, se prepararon cultivos de varias unidades formadoras de colonia y se aisló el plásmido mediante una mini-preparación (Protocolo general 4.4.4). La identificación de clonas positivas (es decir, aquellas que ya no portaban remanentes de pBPGAL1) se realizó mediante un análisis de restricción utilizando las enzimas *XhoI* y *Clal* (considerando la variabilidad de la longitud de los fragmentos de restricción). Los productos de digestión fueron analizados mediante electroforesis en gel de agarosa (Protocolo general 4.4.5). Se identificó una clona positiva nombrada como pRS425/PGAL1 (Figura 11-K).

4.6.4. Construcción del plásmido pYEhFRAP2

Preparación de pRS425/PGAL1 y pRS425/EhFRAP-CYC1TT. La última parte de la clonación para obtener el plásmido pYEhFRAP2 fue la introducción del PGAL1 (Figura 12-K) en el plásmido pRS425/EhFRAP-CYC1TT (Figura 12-H). Tanto pRS425/PGAL1 (donador del promotor) como pRS425/EhFRAP-CYC1TT (aceptor) fueron digeridos con las endonucleasas de restricción *XhoI* y *Clal*. Se prepararon dos reacciones independientes de 20 μ L, conteniendo 17 μ L del plásmido (donador o receptor), 10 U de *XhoI* y 10 U de *Clal* en una solución amortiguadora 1X (considerando las recomendaciones del proveedor). Las mezclas se incubaron durante 2 h a 37 °C. Posteriormente, ambas preparaciones fueron purificadas (Protocolo general 4.4.3) y analizadas en electroforesis en gel de agarosa (Protocolo general 4.4.5).

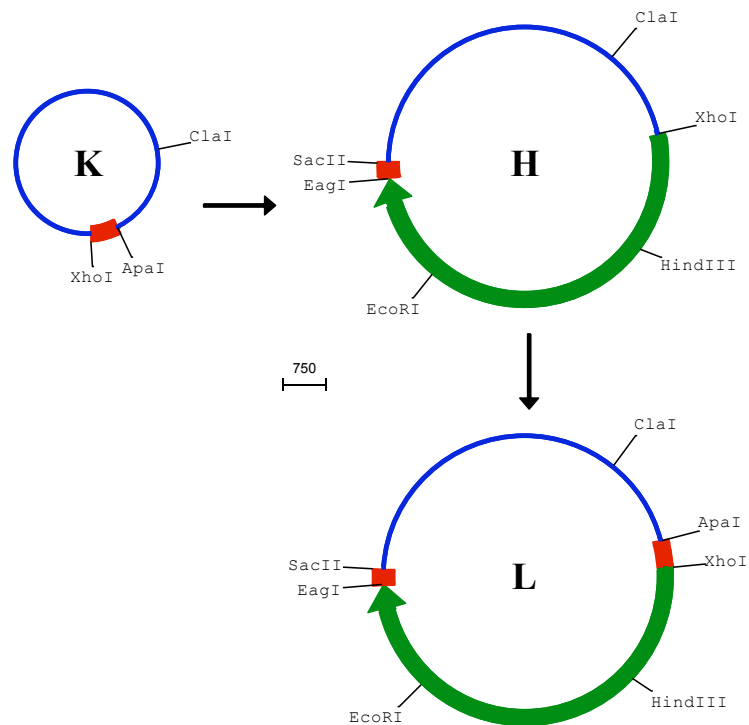


Figura 12. Estrategia de construcción de pYEhFRAP2.

(K) pRS425/PGAL1, 7296; (H) pRS425/EhFRAP-CYC1TT, 14558;
(L) pYEhFRAP2 (pRS425/PGAL1-EhFRAP-CYC1TT), 15005. Escala en pb.

Construcción de pYEhFRAP2. Para la reacción de ligación del fragmento pRS425/PGAL1 (con los extremos cohesivo-*ClaI*/cohesivo-*XhoI*) y el plásmido pRS425/EhFRAP-CYC1TT (con los mismos extremos), se preparó una mezcla de ligación de 10 μ L conteniendo: 7 μ L del fragmento, 1 μ L del vector, 1 μ L de ADN ligasa y 1 μ L de una solución amortiguadora 1X para ligaciones (de acuerdo a las recomendaciones del proveedor). La mezcla de reacción fue incubada durante la noche a 16 °C. El producto de ligación fue transfectado en células competentes de *E. coli* TOP 10 F' mediante choque térmico (Protocolo general 4.4.6). Aleatoriamente, se prepararon cultivos de varias unidades formadoras de colonia y se aisló el plásmido mediante una mini-preparación

(Protocolo general 4.4.4). La identificación de clonas positivas (aquellas que contenían PGAL1) se llevó a cabo mediante un análisis endonucleolítico con las enzimas *EcoRI* y *BamHI* (considerando la variabilidad de la longitud de los productos de restricción). Los productos de digestión fueron analizados mediante electroforesis en gel de agarosa (Protocolo general 4.4.5). Una clona positiva fue designada como pYEhFRAP2 (Figura 12-L). Esta clona fue posteriormente caracterizada mediante un patrón de restricción con nueve reacciones de digestión (*KpnI-SacI*, *KpnI-EagI*, *PstI-SacI*, *PstI-EagI*, *KpnI-HindIII*, *SacI-HindIII*, *HindIII*, *EcoRI*, *NdeI*). Los productos fueron analizados en electroforesis en gel de agarosa (Protocolo general 4.4.5).

4.7. Aislamiento de MH346-1a(pSEY18)/pYEhFRAP2 y MH346-1a(pSEY18)/pRS425

4.7.1. Preparación de MH346-1a(pSEY18) competentes

A partir de una caja de cultivo joven de MH346-1a (pSEY18), se seleccionó una unidad formadora de colonia y se inoculó en 20 mL de medio SCGG suplementado con 20 mg/L de triptófano, 60 mg/L de leucina y 20 mg/L de histidina. El cultivo fue incubado durante 24 h a 30 °C, con agitación vigorosa (300 rpm). Posteriormente, las células fueron cosechadas, lavadas y resuspendidas en un volumen final de 0.2 mL de 1M sorbitol estéril, frío.

4.7.2. Transfección de MH346-1a(pSEY18)

Preparación de pYEhFRAP2 y pRS425 a alta concentración. A partir de las pastillas celulares de cultivos bacterianos (10 mL de *E. coli* TOP 10 F' portadora de pYEhFRAP2 o 5 mL de *E. coli* XL1 Blue MRF' portadora de pRS425), se realizó una mini-purificación (Protocolo general 4.4.4) y se determinó la concentración de ADN mediante espectrofotometría UV (260/280 nm).

Transformación de células de levadura. Los plásmidos pYEhFRAP2 y pRS425 fueron transfectados de manera independiente en las células competentes de MH346-1a(pSEY18) mediante electroporación. Se preparó una mezcla conteniendo 1 µg de ADN

y 200 µL de suspensión celular, se mantuvo en hielo durante 5 min y posteriormente se transfirió a una celda de electroporación (2 mm). La introducción del plásmido fue facilitada mediante un pulso de choque eléctrico, utilizando las siguientes condiciones: 25 µF de capacitancia, 200 ohms de resistencia y 2.5 KV de voltaje. Después, las células se recuperaron mediante la adición de 1 mL de 1 M sorbitol estéril e incubación durante 15 min a 30 °C, con agitación suave (100 rpm).

Selección de transformantes. Las transfectantes URA⁺ LEU⁺ fueron seleccionadas en medio selectivo (SCGG suplementado con 20 mg/L de triptófano y 20 mg/L de histidina). A partir de la suspensión de células recuperadas, 200 µL fueron sembrados en la superficie del medio selectivo y se incubó durante 48 h a 30 °C. Las unidades formadoras de colonias capaces de crecer en ausencia de uracilo y leucina fueron consideradas como transfectantes estables.

4.8. Intercambio de plásmidos y análisis preliminar de la función de EhFRAP

4.8.1. Intercambio de plásmidos y análisis de auxotrofías

Las transfectantes estables MH346-1a(pSEY18)/pYEhFRAP2 fueron sometidas a un ensayo de intercambio de plásmidos y rescate del fenotipo letal para conocer si la proteína EhFRAP complementa la función de la proteína ScTOR2. Tres unidades formadoras de colonia de cada transfectante (MH346-1a(pSEY18)/pYEhFRAP2 y MH346-

Tabla 2. Medios de cultivo utilizados para el ensayo de complementación funcional.

COMPONENTES	SCGG +W +H	SCGG +W +H + Ura/FOA
<i>Yeast Nitrogen Base (YNB)</i>	0.67%	0.67%
<i>Dropout Mix w/o His-Leu-Trp-Ura</i>	0.14%	0.14%
Galactosa	2.0%	2.0%
Glicerol	2.0%	2.0%
Histidina	20 mg/L	20 mg/L
Triptófano	20 mg/L	20 mg/L
Uracilo	--	20 mg/L
Ácido 5-Fluoro-Orótico (FOA)	--	0.10%

Tabla 3. Medios de cultivo utilizados para la caracterización de auxotrofías.

COMPONENTES	SCGG	SCGG	SCGG
	+W +H	+W +H +Ura	+W +H +L
<i>Yeast Nitrogen Base (YNB)</i>	0.67%	0.67%	0.67%
<i>Dropout Mix w/o His-Leu-Trp-Ura</i>	0.14%	0.14%	0.14%
Galactosa	2.0%	2.0%	2.0%
Glicerol	2.0%	2.0%	2.0%
Histidina	20 mg/L	20 mg/L	20 mg/L
Leucina	--	--	60 mg/L
Triptófano	20 mg/L	20 mg/L	20 mg/L
Uracilo	--	20 mg/L	--

1a(pSEY18)/pRS425) fueron sembradas en los medios selectivos (Tabla 2). Los cultivos fueron incubados durante 96-120 h a 30 °C. Aquellas unidades formadoras de colonia capaces de crecer en presencia de uracilo y ácido fluoro-orótico (FOA) fueron consideradas como tentativamente complementantes. Para confirmar la segregación del plásmido pSEY18, una muestra de cada colonia fue sometida a un análisis de auxotrofías, mediante crecimiento en medios selectivos (Tabla 3). Las células complementantes verdaderas (MH346-1a/pYEhFRAP2) exhiben un fenotipo URA⁻ LEU⁺; es decir, requieren uracilo y sobreviven en ausencia de leucina. Una muestra de cada complementante potencial fue sembrada y se incubaron durante 48 h a 30 °C.

4.8.2. Análisis de expresión de *EhFRAP* mediante inmunodetección

Extracción de proteínas totales. Se prepararon extractos proteicos a partir de cultivos de MH346-1a(pSEY18)/pYEhFRAP2 (crecidos en medios YPGG y SCGG +H +W, incubadas durante 48 h). Las pastillas celulares fueron colectadas mediante centrifugación a 3000 x g a 4 °C durante 5 min. Las pastillas fueron resuspendidas en 1.0 - 1.5 mL del reactivo de *CellLytic*TM *Y* (*Sigma*) suplementado con 5 mM de DTT y un coctel 1X de una mezcla de inhibidores de proteasas (*Complete*TM, *Roche*). De manera adicional, se agregaron 0.15 g de perlas de vidrio tratadas con ácido (*Sigma*). La lisis celular se llevó a cabo durante 25 min con agitación a 200 rpm. El lisado fue centrifugado durante 10 min a 14,500 rpm. El sobrenadante fue mantenido en hielo hasta su aplicación en los ensayos de electroforesis en gel de poliacrilamida e inmunodetección.

Electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) y electrotransferencia. La separación de proteínas se llevó a cabo en condiciones desnaturalizantes y reductoras. 10 µL de los extractos proteicos fueron utilizados en un protocolo estándar de SDS-PAGE [Sambrook, *et al.*, 2001]. Posteriormente, las proteínas fueron electrotransferidas a una membrana de nitrocelulosa, utilizando el sistema *Criterion™ Blotter* (Bio-Rad) y siguiendo las instrucciones proporcionadas por el proveedor.

Inmunodetección del epítipo HA. 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 NaCl; 0.05 % de *Tween®* 20; 5 % de leche *Svelty™* [*Nestle®*]). Al día siguiente, la membrana fue lavada con TBST (10 mM de Tris-HCl, pH 7.5; 150 mM de NaCl; 0.05 % de *Tween®* 20) durante 30 minutos (3 lavados de 10 min cada uno). El reconocimiento primario fue realizado utilizando un anticuerpo policlonal de conejo anti-HA (dilución 1:2000 en TBST) durante 1 h. La membrana fue lavada nuevamente con TBST durante 30 min. El reconocimiento secundario fue realizado utilizando un anticuerpo policlonal de cabra anti-conejo 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 agregando una solución 5 mM de EDTA, pH 8.0.

5. RESULTADOS Y DISCUSIONES

5.1. Las proteínas TOR como diana para el desarrollo de agentes anti-parasitarios

Las proteínas TOR juegan un papel importante en la biología celular de organismos eucarióticos; específicamente, mediante la participación en diferentes mecanismos de control del ciclo celular en respuesta a la disponibilidad de nutrientes y factores de crecimiento [De Virgilio y Loewith, 2006]. Al igual que algunos otros factores que controlan el ciclo celular, las proteínas TOR representan dianas potenciales para el diseño y desarrollo de moléculas con actividad terapéutica contra patologías en humanos, como el cáncer [Morgensztern y McLeod, 2005]. Aún más, la identificación de proteínas homólogas, su caracterización funcional y participación en el ciclo de vida de algunos parásitos de importancia clínica como *Trypanosoma*, ha abierto la posibilidad del desarrollo de fármacos con actividad anti-parasitaria [Barquilla *et al.*, 2008; Diaz-Gonzalez *et al.*, 2011].

5.2. El genoma de E. histolytica codifica para dos proteínas parecidas a TOR

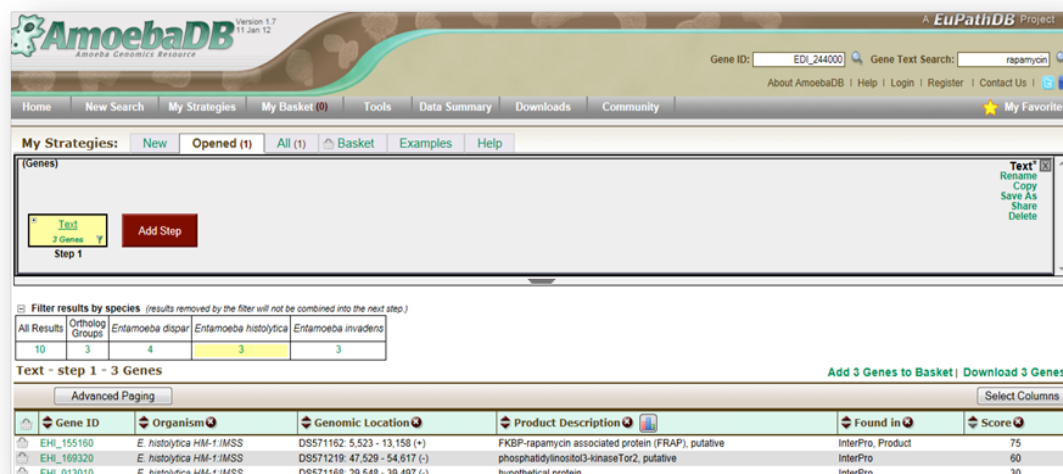
En nuestro país, la amibiasis sigue siendo un problema de salud pública prevalente [Ramos *et al.*, 2005], por lo que el desarrollo de tecnologías que apoyen al diagnóstico y tratamiento de la infección es de gran utilidad para asegurar el éxito terapéutico [Ondarza, 2007, Gonzales *et al.*, 2009; Ximénez *et al.*, 2011]. Diferentes estrategias experimentales han sido desarrolladas para identificar moléculas con posible actividad anti-amibiana, desde el uso de extractos de productos naturales [Calzada *et al.*, 2010] hasta el escrutinio de inhibidores sintéticos de la proliferación celular [Siddiqui *et al.*, 2012].

Por otro lado, algunas proteínas amibianas han sido identificadas como posibles moléculas diana para el diseño racional de fármacos, como la gliceraldeído-3-fosfato

deshidrogenasa (*EhG3PDH*) [Singh, *et al.*, 2008], la cisteína proteinasa 4 (*EhCP4*) [He *et al.*, 2010], la proteína disulfuro isomerasa (*EhPDI*) [Ramos *et al.*, 2011] y la O-acetil-L-serina sulfhidralasa (*EhOASS*) [Nagpal *et al.*, 2012]. Con excepción de *EhCP4* (considerada como un factor de virulencia), estas proteínas participan en diferentes mecanismos celulares, importantes para el crecimiento y supervivencia de *E. histolytica*.

Con el fin de identificar una nueva molécula diana, particularmente una proteína parecida a proteínas TOR, se realizó una búsqueda en la base de datos del genoma de *E. histolytica*, depositada y anotada en el servidor *AmoebaDB*, del portal *EuPathDB* [Aurrecoechea *et al.*, 2010]. Como resultado, tres secuencias amibianas fueron inicialmente identificadas: EHI_155160, EHI_169320 y EHI_013010 (Figura 13).

La secuencia EHI_155160, localizada en el fragmento cromosómico DS571162 (desde el nucleótido 5,523 a 13,158) y anotada como posible proteína FRAP, codifica para un polipéptido de 292 KDa. Además, la comparación funcional mediante ontología génica le asignó las siguientes funciones: (i) proceso biológico, GO:0051056, regulación de la transducción de señales mediada por pequeñas GTPasas; (ii) componente celular, GO:0005622, proteína intracelular; (iii) función molecular, GO:0005096, actividad como



AmoebaDB Version 1.7
A EuPathDB Project

Gene ID: EDI_244000 Gene Text Search: rapamycin

Home New Search My Strategies My Basket (0) Tools Data Summary Downloads Community

My Strategies: New Opened (1) All (1) Basket Examples Help

(Genes)

Text 3 Genes Add Step

Filter results by species (results removed by the filter will not be combined into the next step)

All Results	Ortholog Groups	Entamoeba dispar	Entamoeba histolytica	Entamoeba invadens
10	3	4	3	3

Text - step 1 - 3 Genes

Advanced Paging Select Columns

Gene ID	Organism	Genomic Location	Product Description	Found in	Score
EHI_155160	<i>E. histolytica</i> HM-1 IMSS	DS571162: 5,523 - 13,158 (+)	FKBP-rapamycin associated protein (FRAP), putative	InterPro, Product	75
EHI_169320	<i>E. histolytica</i> HM-1 IMSS	DS571219: 47,529 - 54,617 (-)	phosphatidylinositol3-kinaseTor2, putative	InterPro	60
EHI_013010	<i>E. histolytica</i> HM-1 IMSS	DS571168: 29,548 - 39,497 (-)	hypothetical protein	InterPro	30

Figura 13. Resultados de la búsqueda de secuencias homólogas a proteínas TOR en la base de datos del genoma de *E. histolytica*.

activador de GTPasa; (iv), función molecular, GO:0005488, unión a otras proteínas; (v) función molecular, GO:0016773, actividad fosfotransferasa hacia un grupo alcohol como aceptor.

La secuencia EHI_169320, localizada en el fragmento cromosómico DS571219 (desde el nucleótido 47,529 a 54,617) y anotada como posible proteína Tor2, codifica para un polipéptido de 270 KDa. Además, la comparación funcional mediante ontología génica le asignó las siguientes funciones: (i) función molecular, GO:0005488, unión a otras proteínas; (ii) función molecular, GO:0016773, actividad fosfotransferasa hacia un grupo alcohol como aceptor.

La secuencia EHI_013010, localizada en el fragmento cromosómico DS571168 (desde el nucleótido 29,548 a 39,497) y anotada como proteína hipotética, codifica para un polipéptido de 386 KDa. Además, la comparación funcional mediante ontología génica le asignó las siguientes funciones: (i) proceso biológico, GO:0006260, replicación de ADN; (ii) función molecular, GO:0003677, unión a ADN.

Como se puede observar, las secuencias EHI_155160 y EHI_169320 exhiben características similares, en talla y función, a proteínas parecidas a TOR; sin embargo, la secuencia EHI_013010 carece de cualquier similitud, por lo que fue considerada como un error de la máquina de búsqueda.

Por otro lado, mediante un análisis comparativo múltiple (Figura 14), se puede observar que las secuencias amibianas parecidas a TOR son homólogas a las proteínas TOR1 y TOR2 de levadura, con un alto grado de conservación en el extremo carboxilo-terminal (a partir del residuo 1300). Además, el análisis de homología, mediante

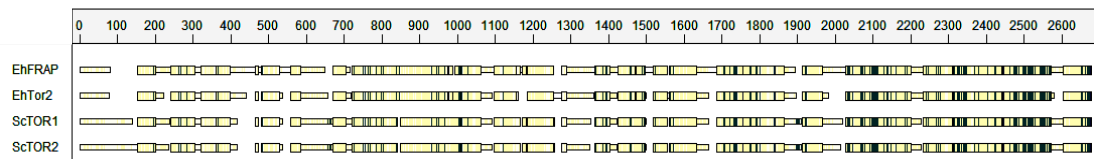


Figura 14. Representación esquemática del análisis comparativo de las secuencias amibianas homólogas a TOR1 y TOR2 de levadura.

Tabla 4. Análisis de homología de las secuencias amibianas parecidas a TOR con respecto a las proteínas TOR1 y TOR2 de levadura.

		Similitud (%)			
		<i>EhFRAP</i>	<i>EhTor2</i>	<i>ScTOR1</i>	<i>ScTOR2</i>
Identidad (%)	<i>EhFRAP</i>		58	51	53
	<i>EhTor2</i>	39		53	54
	<i>ScTOR1</i>	32	33		82
	<i>ScTOR2</i>	34	35	68	

comparación binaria global (Tabla 4), muestra una identidad de 32-35% y una similitud 51-54%.

Además, mediante un análisis comparativo global con la proteína mTOR de humano, se observaron valores de 33 y 53% de identidad y similitud, respectivamente, muy parecidos a los mostrados con respecto a la proteína TOR2 de levadura. Interesantemente, mediante el análisis proteómico del fagosoma amibiano se identificó a un péptido de 15 aminoácidos (AEM*ITELEEIIEM*KK) con homología a la proteína *EhFRAP* (residuos 1600-1614).

Ante el conjunto de evidencias descritas, se consideró a *EhFPAP* (No. de acceso EHI_155160, XP_650639) como candidato para el estudio de la relación estructura-función de una proteína amibiana parecida a TOR2, la cual pudiera ser una excelente molécula diana para el desarrollo racional de fármacos anti-amibianos.

5.3. La proteína *EhFRAP* presenta una arquitectura estructural similar a las proteínas TOR

Una característica estructural de la familia de proteínas TOR es la conservación de la arquitectura de dominios. La proteína *EhFRAP* (anexo 1) no es la excepción, ya que presenta un arreglo de dominios similar a sus homólogos (Figura 15). Mediante el análisis bioinformático, fue posible identificar: (i) los repetidos HEAT, (ii) los dominios



Figura 15. Representación esquemática de la organización de dominios de *EhFRAP*.

Los repetidos HEAT se muestran en gris, los dominios FAT y FATC se muestran en azul, en tanto los dominios de unión a rapamicina (RBD) y Ser/Thr-cinasa (PI3Kc) se indican en color naranja y verde, respectivamente. Un repetido HEAT no fue esquematizado ya que se localiza en el extremo C-terminal del dominio FAT.

FAT y FATC, (iii) el dominio de unión a rapamicina [RBD], y (iv) el dominio catalítico Ser/Thr proteína cinasa [PI3Kc].

Previo al análisis estructura-función de los dominios RBD y PI3Kc, se realizó una búsqueda de repetidos HEAT (ya que su estructura es poco conservada) usando un algoritmo iterativo basado en estimaciones estadísticas [Andrade *et al.*, 2000]. Interesantemente, se determinó un patrón de repeticiones HEAT en la proteína *EhFRAP* (desde el residuo 193 al 1957) muy similar al observado en sus homólogos de levadura (*ScTOR2*, del residuo 765 al 1919; y *ScTOR1*, del residuo 124 a 1916) y humano (*mTOR/HuFRAP*, del residuo 25 al 1980).

5.3.1. *EhFRAP* posee un dominio RBD aparentemente funcional

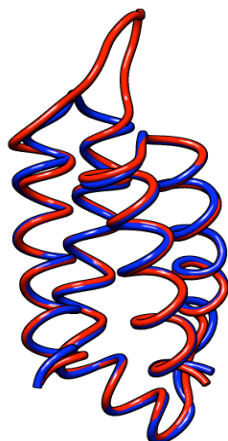
Mediante una búsqueda y comparación (en línea) en diferentes bases de datos, como *CDD* [Sayers, *et al.*, 2012], *PFam* [Punta *et al.*, 2012] y *Superfamily* [Wilson *et al.*, 2009], se identificó una secuencia de 105 residuos (de Glu2002 a Asn2106) en *EhFRAP* con características estructurales similares a dominios de unión a rapamicina (Figura 16A). El alineamiento binario mostró una conservación del 40% (identidad), en la que resaltaron los tres residuos conservados (Ser2022, Trp2094, y Tyr2101) presumiblemente importantes para la unión a rapamicina [Choi *et al.*, 1996]. Además, el análisis y predicción de la estructura secundaria proyectó el patrón altamente conservado de 4 α -hélices, donde destaca la presencia de una horquilla (entre las α -hélices 3 y 4) más larga de lo común.

La predicción de la estructura terciaria basada en homología de secuencias ratificó algunas de las características estructurales ya descritas (Figuras 16B y 16C).

	<--- hélice 1 --->	<-- hélice 2 -->	<----->	
<i>EhFRAP</i>	ELVGAAIIPYEMWKEAIELASKEFYINKNFKQ	MMEVLKPLMKLEK-PNT	PRDES	FRLIY
<i>HuFRAP</i>	ELIRVAIILWHEMWHEGLEEASRLYFGERNVKG	MFEVLEPLHAMMERGP	QTLKETS	SFNQAY
		*		
	hélice 3 ----->	<--- hélice 4 --->		
<i>EhFRAP</i>	GKELKEAFEYCLRYEKEYKEGEEIQYIDDLAIAWEIYSRIYNRLNN-			
<i>HuFRAP</i>	GRDLMEAQEWCRKYMKS---GN-----VKDLTQAWDLYYHVFRISKQ			
		*	*	

A

B



C

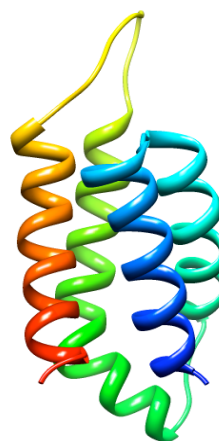


Figura 16. Predicción de la estructura terciaria del dominio de unión a rapamicina (RBD) de la proteína *EhFRAP*.

A. Alineamiento binario de las secuencias FRAP homólogas de amiba y humano. Los residuos conservados se muestran sombreados en gris. Las cuatro alfa-hélices inferidas se muestran en la parte superior. Además, los residuos aparentemente implicados en la unión a rapamicina se indican con un asterisco.

B. Representación tubular del trayecto seguido por los carbonos alfa de la estructura terciaria de *EhFRAP* (inferida) en comparación con la estructura cristalográfica de *HuFRAP* (modelo, PDB No. 1AUE_A). La secuencia de humano se muestra en azul, en tanto la amibiana en rojo.

C. Representación en listones del plegamiento inferido de la secuencia *EhFRAP*. La secuencia (amino a carboxilo) se indica en progresión de los colores del espectro visible (azul a rojo).

Como se puede observar, el dominio RBD de *EhFRAP* exhibe un patrón de plegamiento similar a su homólogo de humano ($\pm 90\%$, juzgado visualmente). Aún más, el modelo inferido muestra una estructura de bolsillo ad hoc para la unión de rapamicina (Figura 17). Cabe mencionar que el bolsillo del homólogo humano posee un residuo de Phe en la posición equivalente al residuo Tyr2101 de *EhFRAP*; sin embargo, la similitud de estos residuos aparentemente no altera la relación estructura-función.

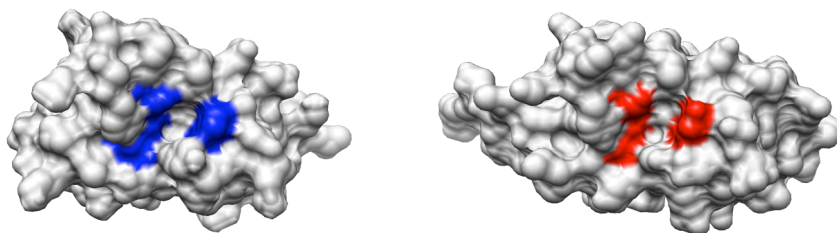


Figura 17. Predicción del bolsillo de unión a rapamicina del dominio RBD de *EhFRAP*.

Representación en relieve de los dominios RBD de las proteínas *HuFRAP* (izquierda) y *EhFRAP* (derecha). Los residuos implicados en la unión se muestran en azul y rojo, para el humano y amibiano respectivamente.

5.3.2. *EhFRAP* posee un dominio catalítico parecido al dominio PI3Kc

Por otro lado, también se identificó una secuencia de 278 residuos (de Ile2146 a Ile2422) en *EhFRAP* con características estructurales similares a los dominios catalíticos de la familia de proteínas fosfoinosítido 3-cinasa (PI3Kc).

<i>HuFRAP</i>	IQSIAPSLQVITSKQRPRKLTLMGSNGHEFVFLKGHEDLRQDERVMQLF
<i>EhFRAP</i>	IKSIYPILEVIPSQRPRKLTIIIGSNGKEYQYVLKGHEDLRQDERVMQLF
<i>HuFRAP</i>	GLVNTLLANDPTSLRKNLSIQRYAVIPLSTNSGLIGWVPHCDTLHALIRD
<i>EhFRAP</i>	GLVNDLLASNSETSKIHLFIHCYDVIPLSPMSGILGWVPHSITIHQFVKE
<i>HuFRAP</i>	YREKKKILLNIEHRIMLRMAPDYDHLTLMQKVEVFEHAVNNTAG--DDLA
<i>EhFRAP</i>	YRNGKNVQVDTEKILCNRIAPRYDNLTTLQKLEVFERVVKDTKEREMDLA
<i>HuFRAP</i>	KLLWLKSPSSEVWFDRRTNYTRSLAVMSMGYILGLGDRHPSNMLDRLS
<i>EhFRAP</i>	NAMWLKSWTSEIWLERRTNFTRSVLMSMGYILGLGDRHPQNLMLQKFT
	<- cat ->
<i>HuFRAP</i>	GKILHIDFGDCFEVAMTREKFPEKIPFRLTRMLTNAMEVTGLDGNRIT
<i>EhFRAP</i>	GDVVHIDFGDCFEVAMNREKFPEKIPFRLTRMIVNAMEVSGIEGTFRMT
	<----- act ----->

Figura 18. Análisis de la estructura primaria del dominio PI3Kc de la proteína *EhFRAP*.

Alineamiento binario de las secuencias FRAP homólogas de amiba y humano. Los residuos conservados se muestran sombreados en gris. Los residuos aparentemente implicados en la unión a ATP se indican en rojo. Las firmas estructurales de los motivos de activación (*act*) y catalítico (*cat*) se demarcan con flechas.

Para el análisis de la estructura primaria, se realizó un alineamiento binario entre el dominio PI3Kc de EhFRAP y el dominio PIKKc-TOR de HuFRAP (Figura 18). Como es posible observar existe una similitud mayor al 85% (identidad), en la que destacan varios residuos altamente conservados, presumiblemente importantes para la unión a ATP.

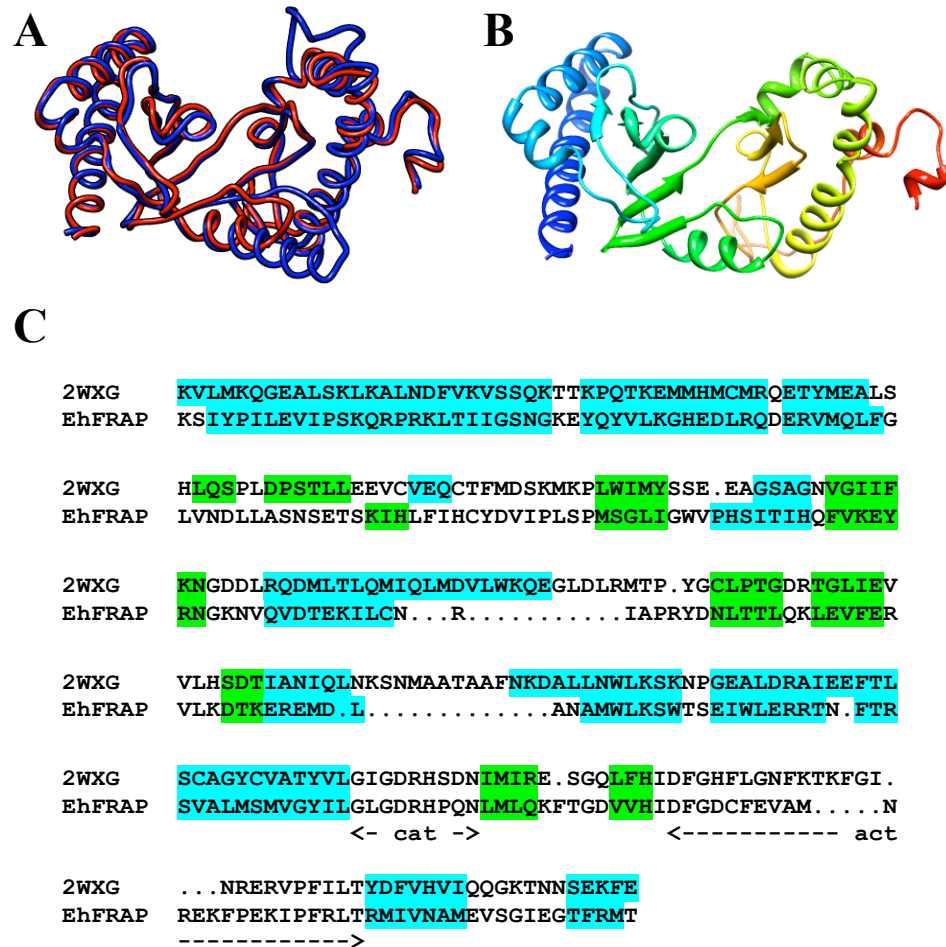


Figura 19. Predicción de la estructura terciaria del dominio PIK3c de la proteína EhFRAP.

A. Representación tubular del trayecto seguido por los carbonos alfa de la estructura terciaria de EhFRAP (inferida) en comparación con la estructura cristalográfica de p110δ. La secuencia de murino se muestra en azul, en tanto la amibiana en rojo.

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

C. Alineamiento estructural binario de las secuencias PIK3c homólogas de amiba y de murino. Los residuos conformando estructuras secundarias α-helice y β-plegada se muestran sombreados en azul y verde, respectivamente. Además, las horquillas implicadas en funciones catalíticas también son señaladas (ver Figura 18).

Además, también se evidenció la presencia de dos horquillas funcionales (una de activación y otra de catálisis).

Por otro lado, el análisis de la estructura secundaria y terciaria se llevó a cabo mediante la predicción de la estructura tridimensional basada en homología de secuencias (Figura 19), usando como modelo al dominio PI3Kc de la proteína p110δ de murino (PDB No. 2WXG) [Berndt *et al.*, 2010]. Como se puede observar en las Figuras 19A y 19B, el plegamiento exhibido por la predicción del dominio PIK3c de *EhFRAP* muestra un alto nivel de conservación en las estructuras secundarias (α -hélices y β -plegadas), sin embargo, es evidente una amplia divergencia en las horquillas (“*loops*”). Por otro lado, el alineamiento de estructuras secundarias, basado en el modelo y la predicción, muestra un patrón altamente conservado, incluso se observa la presencia de las horquillas funcionales antes mencionadas [Figura 18].

5.4. *EhFRAP* no complementa la mutante Δ TOR2 de levadura

5.4.1. Construcción de un plásmido de expresión de *EhFRAP* en levadura

Con el fin de contrastar la hipótesis que relaciona la estructura con la función de *EhFRAP*, se consideró como etapa inicial (para de la caracterización funcional *in vivo*) un ensayo de complementación de la mutante Δ TOR2 de la levadura *S. cerevisiae*, ya que ésta posee un fenotipo letal [Helliwell *et al.*, 1998].

Inicialmente, se realizó la construcción de un plásmido de expresión en levadura, pYEhFRAP2 (Figura 20), el cual contiene el gen completo de *EhFRAP* (etiquetado en el extremo N-terminal con el epítipo HA) bajo el control del promotor de GAL1 (inducible por galactosa).

La descripción completa de la estrategia de construcción de pYEhFRAP está enunciada en la sección de materiales y métodos. Los resultados más relevantes se discuten brevemente:

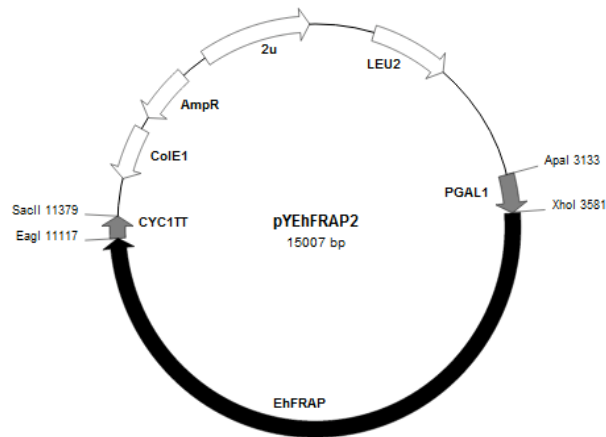


Figura 20. Representación esquemática del plásmido de expresión en levadura pYEhFRAP2.

1. Mediante una reacción de *PCR* largo, un fragmento de 7500 pb fue amplificado a partir de ADN genómico de *E. histolytica* HM1: IMSS, consistente con el tamaño esperado para el gen *EhFRAP* (7528 pb).
2. Después intentos fallidos de clonar la secuencia amplificada en una sola etapa, el producto amplificado fue digerido con las endonucleasas *HindIII*, *EcoRI* y *EagI*, rindiendo tres fragmentos: (i) extremo 5' (romo) a *HindIII*, (ii) *HindIII* a *EcoRI*, y (iii) *EcoRI* a extremo 3' (extremo cohesivo *EagI*).
3. Estos fragmentos fueron subclonados en el plásmido pBluescript SK(-) entre los sitios *HincII*, *HindIII*, *EcoRI* y *EagI*. El análisis de restricción con diversas endonucleasas (datos no mostrados) permitió identificar y caracterizar al vector pBEhFRAP (10414 pb).
4. El gen *EhFRAP* (7526 pb), extraído de plásmido pBEhFRAP mediante digestión con las endonucleasas *XhoI* y *EagI*, fue clonado en el plásmido pRS425. El análisis de restricción (datos no mostrados) permitió identificar y caracterizar al plásmido pRS425/*EhFRAP* (14305 pb).

5. Mediante una reacción de *PCR* típica, un fragmento de 280 pb fue amplificado a partir del plásmido comercial pYES2, consistente con la talla molecular esperada para el terminador del gen *cyc1* de levadura (CYC1TT).
6. El producto de *PCR* CYC1TT fue digerido con las endonucleasas *EagI* y *SacII* y subclonado en el plásmido pRS425EhFRAP. El análisis de restricción (datos no mostrados) con diferentes endonucleasas permitió identificar y caracterizar al plásmido pRS425/EhFRAP-CYC1TT (14558 pb).
7. Mediante una reacción de *PCR* típica, un fragmento de 476 pb fue amplificado a partir del plásmido comercial pYES2, consistente con la talla molecular esperada para el promotor del gen *gal1* de levadura (PGAL1).
8. El producto de *PCR* PGAL1 fue subclonado en el plásmido pBluescript SK(-), obteniéndose el plásmido pBPGAL1 (2436 pb).
9. El promotor GAL1 fue amplificado, mediante una reacción de *PCR* típica, digerido y subclonado en el plásmido pRS425. El plásmido obtenido fue digerido con *Apal* y autoligado (para eliminar remanentes del plásmido anterior). El análisis de restricción (datos no mostrados) con diferentes endonucleasas permitió identificar y caracterizar al plásmido pRS425/PGAL1 (7362 pb).
10. Un fragmento de 1986 pb, que contiene el promotor GAL1 y parte del plásmido pRS425, fue extraído de plásmido pRS425/PGAL1 mediante digestión con las endonucleasas *XhoI* y *Clal*, el cual fue, posteriormente, subclonado en el plásmido pRS425/EhFRAP-CYC1TT. El análisis de restricción con diversas endonucleasas (Tabla 5) permitió identificar y caracterizar al plásmido pYEhFRAP2 (15007 pb).

En la Figura 21 se puede observar que el patrón de fragmentos de restricción obtenido corresponde al esperado, a

Tabla 5. Fragmentos esperados del análisis de restricción del plásmido pYEhFRAP2.

ENDONUCLEASAS	FRAGMENTOS ESPERADOS (pb)
<i>KpnI-SacI</i>	8260, 5126, 1621
<i>KpnI-EagI</i>	7790, 5396, 1621pb
<i>PstI-SacI</i>	7749, 7258
<i>PstI-EagI</i>	7528, 7479
<i>KpnI-HindIII</i>	10947, 2439, 1621
<i>SacI-HindIII</i>	9186, 5821
<i>HindIII</i>	15007
<i>EcoRI</i>	8214, 6793
<i>NdeI</i>	11860, 1950, 1197

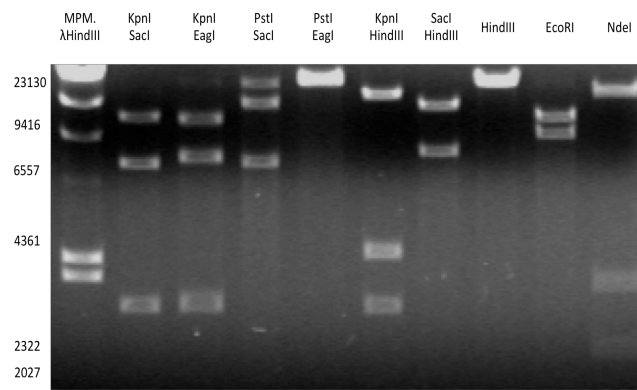


Figura 21. Caracterización molecular de pYEhFRAP2.

Fragmentos de restricción separados mediante electroforesis en gel de agarosa al 1 % (peso molecular en pb).

excepción de las mezclas que contienen la endonucleasa *PstI* (carriles 4 y 5), lo cual sugiere que el tamaño del plásmido favorece la formación de estructuras secundarias que pueden estar generando una inaccesibilidad del sitio para el corte nucleolítico. Para asegurar que el patrón de restricción del plásmido fuera adecuado, se llevaron a cabo dos digestiones posteriores, *BamHI-SacI* y *BamHI-EagI*, las cuales producen el mismo patrón que las digestiones con *PstI-SacI* y *PstI-EagI*, obteniéndose el resultado esperado (datos no mostrados).

5.4.2. Complementación funcional de la mutante Δ TOR2 con pYEhFRAP2

La mutante Δ TOR2 de levadura MH346-1a/pSEY18 (mantenida viable con TOR2, presente en el plásmido) fue transfectada con el plásmido pYEhFRAP2 con el objetivo de evaluar la función de la proteína *EhFRAP* mediante un ensayo de complementación y rescate del fenotipo letal. Como control negativo se utilizó al plásmido pRS425 (parental de pYEhFRAP2). Las transfectantes estables Ura⁺ Leu⁺ fueron seleccionadas en medio completo sintético, suplementado con galactosa (como inductor) y glicerol (como fuente de carbono adicional). Las unidades formadoras de colonias obtenidas fueron

nombradas como MH346-1a/pSEY18/pYEhFRAP2 (MH346-1a/pSEY18/pRS425 para el control).

Las transfectantes Ura⁺ Leu⁺ fueron sometidas a un ensayo de intercambio de plásmidos ("*plasmid shuffling*") para expulsar al vector URA3 (pSEY18) mediante segregación e identificar el fenotipo resultante del vector LEU2 (pYEhFRAP2 y pRS425). Como agente selectivo se utilizó el ácido 5-fluoro-orótico (FOA). El FOA es convertido a un compuesto tóxico por acción de la enzima orotidina-5'-fosfato descarboxilasa (URA3), ocasionando que aquellas células que porten el plásmido pSEY18 mueran o lo segreguen durante la mitosis (proliferación celular). De esta manera, se purga el plásmido que favorece la viabilidad y se analiza el papel funcional de la proteína contenida en el plásmido pYEhFRAP2, mediante evaluación del fenotipo letal.

Los resultados del "*plasmid shuffling*" se muestran en la Figura 22. Como se puede observar, existe crecimiento en ausencia de FOA y URA (lado izquierdo), lo que confirma la presencia de ambos plásmidos. Sin embargo, no se observó crecimiento evidente en presencia de FOA y URA (lado derecho). Este resultado era esperado para el control negativo (pRS415, superior derecha), ya que no se cuenta con la copia genómica de TOR2 y el plásmido de rescate se ha purgado. Lamentablemente, este resultado sugiere que EhFRAP2 (inferior derecha) no complementa la función de ScTOR2.

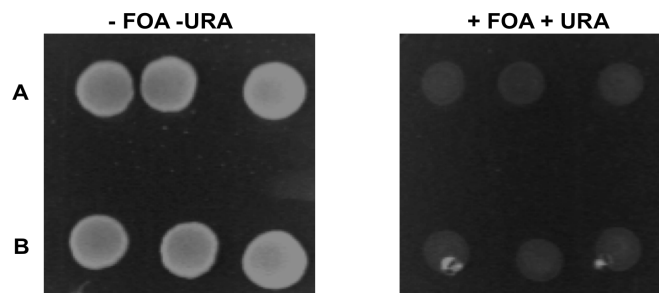


Figura 22. Complementación funcional de la mutante Δ TOR2 de *S. cerevisiae* con la proteína EhFRAP.

(A) MH346-1a/pSEY18/pRS425; (B) MH346-1a/pSEY18/pYEhFRAP2. "spots" por triplicado.

Cabe mencionar, que se desarrollaron dos unidades formadoras de colonia en la periferia en los “spots” de las posibles complementantes (Figura 22, superior derecha); sin embargo, después de un análisis de auxotrofías se demostró que este evento corresponde a un falso positivo (resultado no mostrado).

5.4.3. Inmunodetección de la expresión de la proteína *EhFRAP* en levadura

La expresión de la proteína *EhFRAP* en las células MH346-1a/pSEY18/pYEhFRAP2 fue evaluada mediante inmunodetección de la etiqueta HA. Desafortunadamente, ninguna proteína del tamaño esperado (289 KDa) fue reconocida por los anticuerpos anti-HA (resultado no mostrado). Este dato resulta interesante, ya que la incapacidad de complementar funcionalmente a la mutante Δ TOR2 y rescatar el fenotipo letal puede ser una deficiencia en el mecanismo de traducción de *EhFRAP*, ya que se ha reportado que el uso preferencial de codones de la levadura *S. cerevisiae* puede ser un inconveniente para la expresión heteróloga de genes eucarióticos [Sharp et al., 1986]. Por tal motivo, el ensayo de complementación representa sólo una aproximación preliminar para el estudio funcional de *EhFRAP*, dejando abierta la posibilidad para realizar otros estudios genético-funcionales; *p.e.* el uso de proteínas quiméricas, como se realizó con el homólogo de humano [Alarcón et al., 1996].

5.5. La levadura *S. cerevisiae* como modelo heterólogo para el estudio de *EhFRAP*

El modelo eucariótico *S. cerevisiae* ha sido de gran importancia para el descubrimiento, estudio y comprensión de la función de proteínas de la familia TOR/FRAP, sin embargo, falta un largo camino por recorrer para conocer completamente la participación de éstas en el ciclo celular [De Virgilio y Loewith, 2006; Inoki et al., 2005]. Aunque los resultados indican que *EhFRAP* no es funcionalmente activa en levadura, el análisis bioinformático muestra que tiene un gran potencial como proteína de la familia TOR/FRAP. Resultados similares fueron reportados para la proteína homóloga de humano [Alarcon et. al., 1996]. Sin embargo, mediante la

generación de proteínas quiméricas (específicamente, intercambiando los dominios presentes en el extremo C-terminal [*ScTOR2-HuFRAP*]) fue posible la complementación de la levadura Δ TOR2, evidenciando la conservación funcional del dominio Ser/Thr-proteína cinasa. Esta observación apoya la hipótesis que considera el uso de quimeras (levadura-amiba) de los dominios altamente conservados en *EhFRAP*, tal como RBD y PI3Kc, en el ensayo de complementación funcional de la mutante Δ TOR2 de levadura como una alternativa viable para el estudio del homólogo amibiano.

6. CONCLUSIONES

El genoma de *E. histolytica* codifica para un gen, EhFRAP, con alta homología a proteínas de la familia TOR/FRAP. La estructura y organización de dominios de EhFRAP son muy similares a los observados en proteínas homólogas de humano y levadura. Adicionalmente, tanto el dominio de unión a rapamicina como el dominio catalítico Ser/Thr-proteína cinasa muestran un plegamiento muy similar al adquirido por dominios ortólogos.

Mediante un ensayo de complementación funcional de la mutante Δ TOR2 de la levadura *S. cerevisiae*, se demostró (de manera preliminar) que la proteína EhFRAP no complementó la función de la proteína ScTOR2. Aunque hay que reconocer que los resultados no son contundentes, ya que es posible que ésta observación sea el resultado de un mecanismo de traducción ineficiente debido a las diferencias en el uso preferencial de codones de ambos organismos.

Considerando que hacen falta más estudios para establecer claramente la función celular de EhFRAP, el análisis bioinformático apoya la hipótesis que señala a esta proteína como un blanco potencial para el diseño de nuevos terapéuticos anti-amibianos.

7. BIBLIOGRAFÍA

- Alarcon CM, Cardenas ME, Heitman J. Mammalian RAFT1 kinase domain provides rapamycin-sensitive TOR function in yeast. *Genes Dev.* 1996; 10(3): 279-88.
- Andrade MA, Ponting CP, Gibson TJ, Bork P. Homology-based method for identification of protein repeats using statistical significance estimates. *J Mol Biol.* 2000; 298(3): 521-37.
- Aurrecoechea C, Brestelli J, Brunk BP, Fischer S, Gajria B, *et al.*, EuPathDB: a portal to eukaryotic pathogen databases. *Nucleic Acids Res.* 2010; 38(Database issue): D415-9.
- Barquilla A, Crespo JL, Navarro M. Rapamycin inhibits trypanosome cell growth by preventing TOR complex 2 formation. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2008; 105(38): 14579-84.
- Benjamin D, Colombi M, Moroni C, Hall MN. Rapamycin passes the torch: a new generation of mTOR inhibitors. *Nat Rev Drug Discov.* 2011; 10(11): 868-80.
- Berndt A, Miller S, Williams O, Le DD, Houseman BT, *et al.* The p110 delta structure: mechanisms for selectivity and potency of new PI(3)K inhibitors. *Nat Chem Biol.* 2010;6(2): 117-24.
- Bhattacharya A, Satish S, Bagchi A, Bhattacharya S. The genome of *Entamoeba histolytica*. *Int J Parasitol.* 2000; 30(4):401-10.
- Bracha R, Nuchamowitz Y, Wender N, Mirelman D. Transcriptional gene silencing reveals two distinct groups of *Entamoeba histolytica* Gal/GalNAc-lectin light subunits. *Eukaryot Cell.* 2007; 6(10): 1758-65.
- Brown E, Albers Mark, Shin T, Ichikawa K, Keith C, Lane W, Schreiber S. A mammalian protein targeted by G1-arresting rapamycin-receptor complex. *Nature.* 1994; 369: 756-758.
- Bruchhaus I, Loftus BJ, Hall N, Tannich E. The intestinal protozoan parasite *Entamoeba histolytica* contains 20 cysteine protease genes, of which only a small subset is expressed during in vitro cultivation. *Eukaryot Cell.* 2003; 2(3): 501-9.
- Bruckner DA. Amebiasis. *Clin Microbiol Rev.* 1992; 5(4): 356-69.
- Calzada F, Yepez-Mulia L, Tapia-Contreras A, Bautista E, Maldonado E, Ortega A. Evaluation of the antiprotozoal activity of neo-clerodane type diterpenes from

Salvia polystachya against *Entamoeba histolytica* and Giardia lamblia. Phytother Res. 2010; 24(5): 662-5.

Cardenas ME, Cruz MC, Del Poeta M, Chung N, Perfect JR, Heitman J. Antifungal activities of antineoplastic agents: Saccharomyces cerevisiae as a model system to study drug action. Clin Microbiol Rev. 1999; 12(4): 583-611.

Centro para el control y prevención de enfermedades de E.U.A. (CDC, Centers for Disease Control and Prevention). Amebiasis (also known as *Entamoeba histolytica* infection). Fecha de última modificación: 2009. Fecha de consulta: noviembre 2011. www.cdc.gov/parasites/amebiasis/biology.html.

Choi J, Chen J, Schreiber SL, Clardy J. Structure of the FKBP12-rapamycin complex interacting with the binding domain of human FRAP. Science. 1996; 273(5272): 239-42.

Choi MH, Sajed D, Poole L, Hirata K, Herdman S, Torian BE, Reed SL. An unusual surface peroxiredoxin protects invasive *Entamoeba histolytica* from oxidant attack. Mol Biochem Parasitol. 2005; 143(1): 80-9.

Crespo JL, Hall MN. Elucidating TOR signaling and rapamycin action: lessons from *Saccharomyces cerevisiae*. Microbiol Mol Biol Rev. 2002; 66(4): 579-91.

De Virgilio C, Loewith R. Cell growth control: little eukaryotes make big contributions. Oncogene. 2006; 25(48): 6392-415.

Debnath A, Tashker JS, Sajid M, McKerrow JH. Transcriptional and secretory responses of *Entamoeba histolytica* to mucins, epithelial cells and bacteria. Int J Parasitol. 2007; 37(8-9): 897-906.

Diaz-Gonzalez R, Kuhlmann FM, Galan-Rodriguez C, Madeira da Silva L, Saldivia M, Karver CE, Rodriguez A, Beverley SM, Navarro M, Pollastri MP. The susceptibility of trypanosomatid pathogens to PI3/mTOR kinase inhibitors affords a new opportunity for drug repurposing. PLoS Negl Trop Dis. 2011; 5(8):e1297.

Ehrenkaufer GM, Haque R, Hackney JA, Eichinger DJ, Singh U. Identification of developmentally regulated genes in *Entamoeba histolytica*: insights into mechanisms of stage conversion in a protozoan parasite. Cell Microbiol. 2007; 9: 1426-44.

Eichinger D. A role for a galactose lectin and its ligands during encystment of *Entamoeba*. J Eukaryot Microbiol. 2001; 48(1): 17-21.

Espinosa-Cantellano M, Martínez-Palomo A. Pathogenesis of intestinal amebiasis: from molecules to disease. Clin Microbiol Rev. 2000; 13(2): 318-31.

- Fingar DC, Blenis J. Target of rapamycin (TOR): an integrator of nutrient and growth factor signals and coordinator of cell growth and cell cycle progression. *Oncogene*. 2004; 23(18): 3151-71.
- Fotedar R, Stark D, Beebe N, Marriott D, Ellis J, Harkness J. Laboratory diagnostic techniques for *Entamoeba* species. *Clin Microbiol Rev*. 2007; 20(3): 511-32.
- Gingras A, Raught B, Sonenberg N. Regulation of translation initiation by FRAP/mTOR. *Genes Dev*. 2001; 15: 807-26.
- Gonzales ML, Dans LF, Martinez EG. Antiamoebic drugs for treating amoebic colitis. *Cochrane Database Syst Rev*. 2009; (2): CD006085.
- He C, Nora GP, Schneider EL, Kerr ID, Hansell E, Hirata K, Gonzalez D, Sajid M, Boyd SE, Hruz P, Cobo ER, Le C, Liu WT, Eckmann L, Dorrestein PC, Houpt ER, Brinen LS, Craik CS, Roush WR, McKerrow J, Reed SL. A novel *Entamoeba histolytica* cysteine proteinase, EhCP4, is key for invasive amebiasis and a therapeutic target. *J Biol Chem*. 2010; 285(24): 18516-27.
- Helliwell SB, Howald I, Barbet N, Hall MN. TOR2 is part of two related signaling pathways coordinating cell growth in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*. 1998; 148(1): 99-112.
- Helliwell SB, Wagner P, Kunz J, Deuter-Reinhard M, Henriquez R, Hall MN. TOR1 and TOR2 are structurally and functionally similar but not identical phosphatidylinositol kinase homologues in yeast. *Mol Biol Cell*. 1994; 5(1): 105-18.
- Inoki K, Ouyang H, Li Y, Guan KL. Signaling by target of rapamycin proteins in cell growth control. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2005; 69(1): 79-100.
- Lorenzi HA, Puiu D, Miller JR, Brinkac LM, Amedeo P, Hall N, Caler EV. New assembly, reannotation and analysis of the *Entamoeba histolytica* genome reveal new genomic features and protein content information. *PLoS Negl Trop Dis*. 2010; 4(6): e716.
- Meléndez-López SG, Herdman S, Hirata K, Choi MH, Choe Y, Craik C, Caffrey CR, Hansell E, Chávez-Munguía B, Chen YT, Roush WR, McKerrow J, Eckmann L, Guo J, Stanley SL Jr, Reed SL. Use of recombinant *Entamoeba histolytica* cysteine proteinase 1 to identify a potent inhibitor of amebic invasion in a human colonic model. *Eukaryot Cell*. 2007; 6(7): 1130-6.
- Morgensztern D, McLeod HL. PI3K/Akt/mTOR pathway as a target for cancer therapy. *Anticancer Drugs*. 2005; 16(8): 797-803.

- Nagpal I, Raj I, Subbarao N, Gourinath S. Virtual screening, identification and in vitro testing of novel inhibitors of O-acetyl-L-serine sulfhydrylase of *Entamoeba histolytica*. PLoS One. 2012; 7(2): e30305.
- Náquira C. Amebiosis. Rev Gastroenterol Peru. 1997; 17: 92-99.
- Ondarza RN. Drug effects on drug targets: inhibition of enzymes by neuroleptics, antimycotics, antibiotics and other drugs on human pathogenic amoebas and their anti-proliferative effects. Recent Pat Antiinfect Drug Discov. 2007; 2(3): 206-16.
- Paul J, Srivastava S, Bhattacharya S. Molecular methods for diagnosis of *Entamoeba histolytica* in a clinical setting: an overview. Exp Parasitol. 2007; 116(1): 35-43.
- Punta M, Coggill PC, Eberhardt RY, Mistry J, Tate J, Boursnell C, Pang N, Forslund K, Ceric G, Clements J, Heger A, Holm L, Sonnhammer EL, Eddy SR, Bateman A, Finn RD. The Pfam protein families database. Nucleic Acids Res. 2012; 40 (Database issue): D290-301.
- Que X, Reed SL. Cysteine proteinases and the pathogenesis of amebiasis. Clin Microbiol Rev. 2000; 13(2): 196-206.
- Ramos F, Morán P, González E, García G, Ramiro M, Gómez A, de León Mdel C, Melendro EI, Valadez A, Ximénez C. *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar*: prevalence infection in a rural Mexican community. Exp Parasitol. 2005; 110(3): 327-30.
- Ramos MA, Mares RE, Magaña PD, Rivas ID, Meléndez-López SG. *Entamoeba histolytica*: biochemical characterization of a protein disulfide isomerase. Exp Parasitol. 2011; 128(1): 76-81.
- Salles JM, Salles MJ, Moraes LA, Silva MC. Invasive amebiasis: an update on diagnosis and management. Expert Rev Anti Infect Ther. 2007; 5(5): 893-901.
- Sambrook J, Fritsch E, Maniatis T. Molecular cloning: A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press. 3rd edition. 2001.
- Santi-Rocca J, Rigotherier MC, Guillén N. Host-microbe interactions and defense mechanisms in the development of amoebic liver abscesses. Clin Microbiol Rev. 2009; 22(1): 65-75.
- Santi-Rocca J, Weber C, Guigon G, Sismeiro O, Coppée JY, Guillén N. The lysine- and glutamic acid-rich protein KERP1 plays a role in *Entamoeba histolytica* liver abscess pathogenesis. Cell Microbiol. 2008; 10(1): 202-17.

- Sayers EW, Barrett T, Benson DA, Bolton E, Bryant SH, *et al.*, Database resources of the National Center for Biotechnology Information. *Nucleic Acids Res.* 2012; 40 (Database issue): D13-25.
- Seigneur M, Mounier J, Prevost M, Guillen N. A lysine- and glutamic acid-rich protein, KERP1, from *Entamoeba histolytica* binds to human enterocytes. *Cell Microbiol.* 2005; 7(4): 569–79.
- Sharp P, Tuohy T, Mosurski K. Codon usage in yeast: cluster analysis clearly differentiates highly and lowly expressed genes. *Nucleic Acids Research.* 1986; 14(13): 5125-43.
- Sherman F. An introduction to the genetics and molecular biology of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *The Encyclopedia of Molecular Biology and Molecular Medicine.* 1998; 6: 302-25.
- Siddiqui S, Salahuddin A, Azam A. Thiosemicarbazone fragment embedded within 1,2,4-triazole ring as inhibitors of *Entamoeba histolytica*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters.* 2012; 22: 2768–71.
- Singh S, Malik BK, Sharma DK. Molecular modeling and docking analysis of *Entamoeba histolytica* glyceraldehyde-3 phosphate dehydrogenase, a potential target enzyme for anti-protozoal drug development. *Chem Biol Drug Des.* 2008; 71(6): 554-62.
- Solaymani-Mohammadi S, Petri WA Jr. Intestinal invasion by *Entamoeba histolytica*. *Subcell Biochem.* 2008; 47: 221-32.
- Tanyuksel M, Petri WA Jr. Laboratory diagnosis of amebiasis. *Clin Microbiol Rev.* 2003; 16(4): 713-29.
- 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.
- Ventura-Juárez J, Barba-Gallardo LF, Muñoz-Fernández L, Martínez-Medina L, Márquez-Díaz F, Sosa-Díaz SJ, Gerardo-Rodríguez M, González-Romo R, Campos-Rodríguez R. Immunohistochemical characterization of human fulminant amoebic colitis. *Parasite Immunol.* 2007; 29(4): 201-9.
- Wilson D, Pethica R, Zhou Y, Talbot C, Vogel C, Madera M, Chothia C, Gough J. SUPERFAMILY--sophisticated comparative genomics, data mining, visualization and phylogeny. *Nucleic Acids Res.* 2009; 37(Database issue): D380-6.
- Wullschlegel S, Loewith R, Hall MN. TOR signaling in growth and metabolism. *Cell.* 2006; 124(3): 471-84.

Ximénez C, Morán P, Rojas L, Valadez A, Gómez A, Ramiro M, Cerritos R, González E, Hernández E, Oswaldo P. Novelties on amoebiasis: a neglected tropical disease. *J Glob Infect Dis.* 2011; 3(2): 166-74.

ANEXO 1. Secuencia de la proteína EhFRAP (NCBI No. XP_650639)

LOCUS XP_650639 2526 aa linear INV 31-OCT-2008
 DEFINITION FKBP-rapamycin associated protein (FRAP) [*Entamoeba histolytica* HM-1:IMSS].
 ACCESSION XP_650639
 VERSION XP_650639.2 GI:183230839
 DBSOURCE REFSEQ: accession [XM_645547.2](#)
 KEYWORDS .
 SOURCE *Entamoeba histolytica* HM-1:IMSS
 ORGANISM *Entamoeba histolytica* HM-1:IMSS
 Eukaryota; Amoebozoa; Archamoebae; Entamoebidae; Entamoeba.
 REFERENCE 1 (residues 1 to 2526)
 AUTHORS Loftus,B., Anderson,I., Davies,R., Alsmark,U.C., Samuelson,J., Amedeo,P., Roncaglia,P., Berriman,M., Hirt,R.P., Mann,B.J., Nozaki,T., Suh,B., Pop,M., Duchene,M., Ackers,J., Tannich,E., Leippe,M., Hofer,M., Bruchhaus,I., Willhoeft,U., Bhattacharya,A., Chillingworth,T., Churcher,C., Hance,Z., Harris,B., Harris,D., Jagels,K., Moule,S., Mungall,K., Ormond,D., Squares,R., Whitehead,S., Quail,M.A., Rabinowitsch,E., Norbertczak,H., Price,C., Wang,Z., Guillen,N., Gilchrist,C., Stroup,S.E., Bhattacharya,S., Lohia,A., Foster,P.G., Sicheritz-Ponten,T., Weber,C., Singh,U., Mukherjee,C., El-Sayed,N.M., Petri,W.A. Jr., Clark,C.G., Embley,T.M., Barrell,B., Fraser,C.M. and Hall,N.
 TITLE The genome of the protist parasite *Entamoeba histolytica*
 JOURNAL Nature 433 (7028), 865-868 (2005)
 PUBMED [15729342](#)
 REFERENCE 2 (residues 1 to 2526)
 AUTHORS Lorenzi,H., Amedeo,P., Inman,J., Schobel,S. and Caler,E.
 TITLE Annotation of *Entamoeba histolytica* HM-1:IMSS
 JOURNAL Unpublished
 REFERENCE 3 (residues 1 to 2526)
 AUTHORS Caler,E., Lorenzi,H., Thiagarajan,M., Schobel,S., Inman,J., Amedeo,P., Wortman,J. and Hall,N.
 TITLE Direct Submission
 JOURNAL Submitted (16-FEB-2007) The Institute for Genomic Research, 9712 Medical Center Drive, Rockville, MD 20850, USA
 REFERENCE 4 (residues 1 to 2526)
 AUTHORS Loftus,B.
 TITLE Direct Submission
 JOURNAL Submitted (30-NOV-2004) The Institute for Genomic Research, 9712 Medical Center Dr, Rockville, MD 20850, USA
 COMMENT PROVISIONAL [REFSEQ](#): This record has not yet been subject to final NCBI review. The reference sequence was derived from [EAL45252](#).
 On Apr 16, 2008 this sequence version replaced gi:[67469321](#).
 Method: conceptual translation.
 FEATURES
 Location/Qualifiers
 source 1..2526
 /organism="*Entamoeba histolytica* HM-1:IMSS"
 /strain="HM-1:IMSS"
 /db_xref="taxon:[294381](#)"
 Protein 1..2526
 /product="FKBP-rapamycin associated protein (FRAP)"
 /calculated_mol_wt=291546
 Region 500..>1126
 /region_name="TEL1"
 /note="Phosphatidylinositol kinase and protein kinases of the PI-3 kinase family [Signal transduction mechanisms / Cell division and chromosome partitioning / Chromatin

```

        structure and dynamics / DNA replication, recombination,
        and repair / Intracellular...; COG5032"
        /db_xref="CDD:34637"
Region      835..974
            /region_name="DUF3385"
            /note="Domain of unknown function (DUF3385); pfam11865"
            /db_xref="CDD:204764"
Region      <1244..>1441
            /region_name="TEL1"
            /note="Phosphatidylinositol kinase and protein kinases of
            the PI-3 kinase family [Signal transduction mechanisms /
            Cell division and chromosome partitioning / Chromatin
            structure and dynamics / DNA replication, recombination,
            and repair / Intracellular...; COG5032"
            /db_xref="CDD:34637"
Region      <1626..1895
            /region_name="FAT"
            /note="FAT domain; pfam02259"
            /db_xref="CDD:202179"
Region      2002..2106
            /region_name="Rapamycin_bind"
            /note="Rapamycin binding domain; pfam08771"
            /db_xref="CDD:149738"
Region      2146..2422
            /region_name="PIKKc_TOR"
            /note="TOR (Target of rapamycin), catalytic domain; The
            TOR catalytic domain subfamily is part of a larger
            superfamily that includes the catalytic domains of other
            kinases such as the typical serine/threonine/tyrosine
            protein kinases (PKs), aminoglycoside...; cd05169"
            /db_xref="CDD:119429"
Site        order(2156,2158..2160,2162,2178,2180,2183,2218,2230..2233,
            2238,2338,2340,2351..2352)
            /site_type="other"
            /note="ATP binding site [chemical binding]"
            /db_xref="CDD:119429"
Region      2179..2422
            /region_name="PI3Kc"
            /note="Phosphoinositide 3-kinase, catalytic domain;
            smart00146"
            /db_xref="CDD:197542"
Site        2330..2338
            /site_type="active"
            /note="catalytic loop [active]"
            /db_xref="CDD:119429"
Site        2352..2375
            /site_type="other"
            /note="activation loop (A-loop)"
            /db_xref="CDD:119429"
Region      2494..2526
            /region_name="FATC"
            /note="FATC domain; pfam02260"
            /db_xref="CDD:202180"
CDS         1..2526
            /locus_tag="EHI_155160"
            /old_locus_tag="207.t00014"
            /coded_by="XM_645547.2:1..7581"
            /note="encoded by transcript EHI_155160A"
            /db_xref="GeneID:3404928"
            /db_xref="Pathema:EHI_155160"

```

ORIGIN

1 msstdwqakl ngfiddliec ktkeqrelka eglksffmtm ssefhgeads tfielikycf
 61 kerlqmntmt gegptikvqm gmlrvidiil ksdfgemfck evckdalnql iktkdkevmm
 121 ktakyigkii rynlhdyieq elkyisvsug nnpksgigai snssnnssye elsvlakvmv
 181 lreiiwnaps tcytskkdiv siitegfker dyetrkqani aldeylknek dkirfeylya
 241 salnefkren ltesneetnh gvvlmrtil knfkessdki nyvevlslld ylilncksqt
 301 irnssilsls dmckidpekf spkeapigft keglicksek rnsrmmgrrt ggtsnskelk
 361 mfiglnendm kfisneipsf ynmkallie frngiekpsv lkvmgdfcey ipnqikryft
 421 ieglnlinkt efesikkklkn ekerkdmvyg ifyclskiiik ylkgeeeekng giekgieetk
 481 esnnksneiy tifykvysdi hecgfnpylv ellktlfesf pqtkkqyqdi likmirsvlf
 541 pdhtrpvsvi piiqfnphel tilalqtlis fefeeevsqn iipliketl qfidsediei
 601 rkevaclgkv llpknckeqd ihrydigqvv qillthglsl ldsrirsim ssfderfdyy
 661 lsqamniqkl figmndesfk vreqvicvic rltsynymyi ipsfrkiviq lvsqrlrhgve
 721 ilsveestil igdviktsgs lilpysesii evlmpkltde llanstslkr nlliaiteli
 781 slgnieekyi hqtlidaivsi lhqkgtsnqk telrltales itklvrstev aiglyqqype
 841 mveilmemi nerspikta mvsvigvlga ldplqyrqht nteivevevd esaelqipml
 901 snqpdeyyaw tiistltkll kdntmmsihv scintigntl kmmnknqhl fyplvsyifs
 961 tyvnvfktp tsirpdvik igtilplgdk tirdtylplk iglikeywdg nilgeacafc
 1021 heaassikde fkqylptiip illseltklk yskkeddskv kapmilkcfl tfaerlnidd
 1081 slyiiipvfl ellgeqvsvg lrqsimqyif rfftcvnige yagriiftts rligneelsd
 1141 svvmglstla tklgayfvf hpvvrage hpcksgivle esiekirksi sisskgngg
 1201 inggrgsgeq triisgsegn eeinkteekk kenyrkimav wdsctqrskk eewsdwveki
 1261 slvflksnps rilsrcedia nnsnstvard lfnctfysvy iaqdqkqrne liqkmkialt
 1321 qptitheavs lilnlaefle hegliepmie fgdkakaiga yakalhykei efkglknkes
 1381 qvrrntlgee etteeqaiife eliglennqk rqdaasgliq maekqnmkl nstwyaklmg
 1441 whkalnklee eskkeevkmt clyemgdwea ldevastfwd eenkkwklne keikkmgsmv
 1501 aassfyldkw erlkaiietp tfkkvegfev tiyniisih lideidkkqg igesekiemr
 1561 ekeiekvkri iennqkqlgn efsvlategy eriygaltka emiteleeii emkkkkssin
 1621 keivmkgwne rlmkshkdik twqkilmre iistkhenik swisftgiid kmgeeglafk
 1681 alnkiaghki egkiealpkd nfevgvkylk lmwkgtkdik ekenmyqlle eykevinkns
 1741 enkevksqiy sqlgewklm sqnkkefnke nieiilkhyq etiklnkdny kywhrwalin
 1801 fevvnyyent kkskdeini irrnikeien ntkeehnkek kiqueedkie eiikktrkde
 1861 remvtyiett vkafvqslil snnkqtlqdt lrltilfkf gkyevehai ssginelpie
 1921 iwlhvvpqii ariqsevgsv rrvtkellti igkahpqaiv yaltvasksp nkdrkdvais
 1981 iiekikkessg hlvqqamlvs eelvgaaip yemwkeaiel askefyinkn fkqmmevlvp
 2041 lmkklekpnt prdesfrliy gkelkeafey clryekeyke geeiqyiddl aiaaweiysri
 2101 ynrlntink isrlslia prlseahld iavpgtykan sgiitiksiy pilevipskq
 2161 rprklitiigs ngkeyqyvlk ghedlrqder vmqlfglvnd llansetst ihlfihcydv
 2221 iplspmsgli gvwphsiti qfvkeyrngk nvqvdtakil cnriaprydn ltlqklevf
 2281 ervlkdtker emdlanamwl kswtseiwl rrtntfrsva lmsmvgiylg lgdrhpqnlm
 2341 lqkftgdvvh idfgdcfeva mnrekfpeki pfrlrmivn amevsiegte frmtcenvmt
 2401 vlrenkdslm avleafvydp livtilggkd rteqtpilsq dnqttekeik viekqdekel
 2461 fsdnddmtga yntkagnvtq rvlkdltgkd fgneeldvhn qvdkliqqai shenlcqcyq
 2521 gwypyw