

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON  
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



QUITINA SINTASAS DE *Entamoeba histolytica*:  
CLONACION Y ANALISIS DE LA  
ESTRUCTURA PRIMARIA

POR:

EDUARDO CAMPOS GONGORA

Como requisito parcial para obtener el grado de  
DOCTOR EN CIENCIAS en el área de Microbiología

Octubre, 2002

QUITINA SINTASAS DE *Entamoeba histolytica*:

EDUARDO CAMPOS GONGORA

TD  
RC121  
.A5  
C36  
2002  
c.1

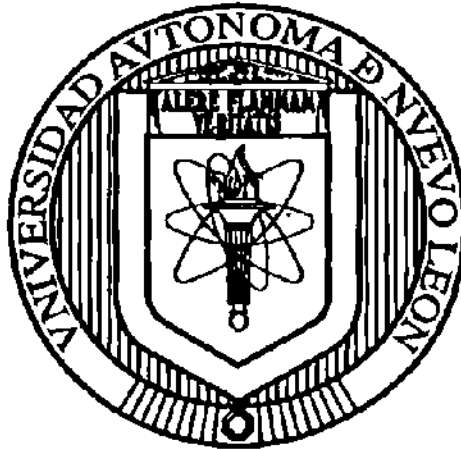




1080124469

**UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON**

**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**



**QUITINA SINTASAS DE *Entamoeba histolytica*:  
CLONACION Y ANALISIS DE LA  
ESTRUCTURA PRIMARIA**

**POR**

**EDUARDO CAMPOS GÓNGORA**

Como requisito parcial para obtener el Grado de  
**DOCTOR EN CIENCIAS** en el área de  
Microbiología

Octubre, 2002

TD  
RC121  
.AS  
C36  
2002



**QUITINA SINTASAS DE *Entamoeba histolytica*:  
CLONACION Y ANALISIS DE LA ESTRUCTURA  
PRIMARIA**

Aprobación por Comité de Tesis.

---

Dr. Salvador Said Fernández  
Presidente

---

Dr. Juan Manuel Alcocer  
Secretario

---

Dra. Adriana Elizondo Herrera  
Vocal

---

Dr. Mario Rodolfo Morales Vallarta  
Vocal

---

Dra. Agnès Revol de Mendoza  
Vocal

---

Dra. Maria Julia Verde Star  
Subdirectora de Estudios de Postgrado

El presente trabajo se realizó en:

**Departamento de Parasitología Molecular del Instituto de Medicina Tropical “Bernhard Nocht”;** Hamburgo, Alemania.

**División de Biología Celular y Molecular del Centro de Investigación Biomédica del Noreste:IMSS.**

**Unidad de Laboratorios de Ingeniería y Expresión Genética del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina, UANL.**

Director de Tesis:

**Dr. Salvador Said Fernández**

**Centro de Investigación Biomédica del Noreste: IMSS.**

Director de Tesis:

**Dr. Prof. Egbert Tannich**

**Bernhard Nocht Institut für Tropenmedizin; Hamburg, Alemania.**

Asesores:

**Dra. Ute Willoeft**

**Departamento de Parasitología Molecular: Bernhard Nocht Institut.**

**Dra. Agnès Revol de Mendoza**

**Departamento de Bioquímica, Fac.de Medicina; UANL**

**Dra. Herminia G. Martínez Rodríguez**

**Departamento de Bioquímica, Fac. de Medicina; UANL**

## AGRADECIMIENTOS

Al **Dr. Salvador Said Fernández**, por darme la confianza y apoyo necesarios para realizar el presente trabajo. Gracias por su apoyo y ayuda en los momentos difíciles pero sobretodo, gracias por su amistad a lo largo de estos 10 años de trabajo en la investigación científica.

Al **Dr. Egbert Tannich** quien además de brindarme el apoyo necesario para realizar este trabajo en su laboratorio, ha compartido parte de sus conocimientos conmigo. De manera especial agradezco también su amistad, ayuda y consejos para el futuro.

A todos mis compañeros del Bernhard Nocht Institut: **Egbert Tannich, Sassia Touzni, Félix Asche, Ina Hennings, Heidrun Buss, Ute Willoeft, Hanna Lotter, Frank Ebert, Andreas Krugger, Iris Bruchhaus, Mattias Leipe, Britta, Susan, die Kleine Maicke, die Grosse Maicke, Nicolas, Simone, Kerstin**, por todos esos momentos compartidos, inolvidables...

gracias también por la paciencia que tuvieron para aceptar y corregir mis deficiencias del idioma alemán; especialmente tú, Sassia.

y a todos mis compañeros de otros laboratorios del BNI y personal administrativo que siempre estuvieron dispuestos a ayudarme en lo requerido.

A la **Dra. Adriana Elizondo Herrera** por sus consejos y ayuda para emprender esta maravillosa aventura. Gracias por tu amistad...

A los **Drs. Herminia G. Martínez Rodríguez, Agnès Revol de Mendoza, Adriana Elizondo Herrera, Juan Manuel Alcocer y Mario R. Morales Vallarta** por la revisión y sugerencias para incrementar la calidad de este trabajo.

Al Departamento de Graduados de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León.

Al Centro de Investigación Biomédica del Noreste:IMSS y a la ULIEG del Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, UANL; por todo el apoyo y las facilidades otorgadas para realizar este trabajo de investigación en sus etapas iniciales.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), a la UANL y al Servicio Alemán de Intercambio Académico (DAAD) porque gracias a las becas otorgadas he podido cumplir los objetivos planteados.



Y nuevamente, un agradecimiento especial para mi hermano Ricardo Zavala Góngora por que con su ayuda, consejos y apoyo en todo momento, logra que las cosas difíciles se hagan fáciles.

A mi familia por el apoyo y estímulo que siempre me han brindado, particularmente a mi madre Sra. Sabina Góngora Cerecedo, a mi hermana, su esposo e hijos, por permitirme estar lejos de Ustedes.

A la familia Muñoz- (Juan, Ana, Ale, Ana Karen) por su incondicional amistad, por el apoyo y ayuda que me brindaron para hacer más placentera mi estancia en Hamburgo al lado de mi familia.

A Enrique Martínez y su esposa, por la amistad que nos une y por su ayuda.

A la familia Lozano-Estrella por su amistad y ayuda prestada para culminar este proyecto.

A mi suegra y cuñadas por aceptar la responsabilidad del cuidado de mi esposa e hijas durante mi ausencia.

Especialmente a ti, Vera... por darme todo.

## **DEDICATORIA**

Dedico esta tesis a las personas que forman la esencia de mi Universo y mi razón de ser:

**A mi madre:**

**Sabina Góngora Cerecedo;** a quien debo todo lo que soy, y que constituye mi mejor ejemplo a seguir.

**A mi esposa:**

**Vera González Hernández;** quien con su amor, comprensión y apoyo, me ha impulsado a extender las alas para intentar volar.

**A mis hijas:**

**Miranda y Arantza;** a quicnes, en mi afán por alcanzar este objetivo, he limitado los momentos de convivencia juntos.

**A mis hermanos:**

**Ricardo y Margarita,** y a sus respectivas familias.

**A mí,**  
porque soy el centro de mi Universo...

## TABLA DE CONTENIDO

Capítulo		Página
<b>1</b>	<b>INTRODUCCION</b>	
1.1	Amibiasis	1
1.2	Ciclo de vida de <i>E. histolytica</i>	1
1.3	Desenquistamiento	2
1.4	Enquistamiento	3
1.5	Estructura del quiste	5
1.6	Síntesis de pared en <i>Entamoeba</i>	6
1.7	Quitina	6
1.8	Síntesis de quitina	9
1.9	Quitina sintasas	10
1.10	Clonación y caracterización de genes de quitina sintasas	13
1.11	Quitina sintasa y síntesis de quitina en <i>E. invadens</i> y <i>E. histolytica</i>	14
1.12	Modelo actual de la síntesis de pared en <i>E. invadens</i>	16
1.13	Justificación	17
1.14	Hipótesis	18
1.15	Objetivos	18
	1.15.1 Objetivo general	18
	1.15.2 Objetivos específicos	18
<b>2</b>	<b>MATERIAL</b>	
2.1	Origen de los reactivos	20
	2.1.1 Reactivos químicos	20
	2.1.2 Enzimas e inhibidores	21
	2.1.3 Reactivos inmunológicos	21
	2.1.4 Marcadores	21
	2.1.5 Otros materiales	22

2.2	Material Biológico	23
2.2.1	Amibas	23
2.2.2	Bacterias	23
2.2.3	Vectores de clonación	24
2.2.3.1	PCR <sup>R</sup> 2.1 (TOPO <sup>TM</sup> TA Cloning Kit, Invitrogen)	24
2.2.3.2	pBK-CMV	25
2.2.4	Vectores de expresión	25
2.2.4.1	pJC45	25
2.2.4.2	pHisT7	25
2.2.5	Bibliotecas de DNA genómico construidas en el bacteriófago $\lambda$	26
2.2.5.1	Biblioteca de DNA de <i>Entamoeba histolytica</i> construida en el bacteriófago lambda ZAP <sup>®</sup> Express (Stratagene)	26
2.2.5.2	Biblioteca de DNA de <i>Entamoeba invadens</i> construida en el bacteriófago $\lambda$ EMBL 4	27
2.3	Composición y preparación de los medios de cultivo	28
2.3.1	Medio TYI-S-33	28
2.3.2	Medio I.G (TYI-S33 sin Glucosa)	28
2.3.3	Medio LB y LB-Agar	29
2.4	Composición y preparación de las soluciones	29
2.4.1	Soluciones estándar	29
2.4.2	Soluciones amortiguadoras	30

### 3 MÉTODOS

3.1	Cultivo de Amibas	35
3.1.1	Cultivo de <i>Entamoeba histolytica</i> , cepa HM-1:IMSS	35
3.1.2	Cultivo de <i>Entamoeba invadens</i> , cepa IP-1	35
3.2	Enquistamiento	36
3.2.1	Enquistamiento de <i>E. histolytica</i>	36
3.2.2	Enquistamiento de <i>E. invadens</i>	36
3.3	Extracción de DNA genómico de amibas	37

3.4	Análisis de secuencias de quitina sintasas reportadas en los bancos de datos. Identificación de secuencias consenso	38
3.5	Diseño de los iniciadores (oligonucleótidos)	39
3.6	Reacciones de PCR con el DNA genómico de <i>E. histolytica</i>	39
3.7	Clonación de los productos de PCR en el vector PCR <sup>R</sup> 2.1 TOPO	40
3.8	Preparación y transformación de células calcio-competentes, cepas DH5 $\alpha$ y XLORL de <i>E. coli</i>	41
3.9	Selección y análisis de las clonas positivas	42
3.10	Reacciones de secuenciación de los fragmentos clonados	43
3.11	Análisis de las secuencias de DNA obtenidas	44
3.12	Tamizaje de la biblioteca de DNA de <i>E. histolytica</i> construida en el bacteriófago $\lambda$ ZAP	45
3.12.1	Preparación de la bacteria XL1-Blue MRF <sup>+</sup>	45
3.12.2	Titulación de la biblioteca de DNA de <i>E. histolytica</i> construida en $\lambda$ ZAP	46
3.12.3	Preparación de las placas para el tamizaje de la biblioteca	46
3.12.4	Preparación de las réplicas de las placas en membranas de nitrocelulosa (Transferencia del DNA)	46
3.12.5	Marcaje de la sonda de DNA con $\alpha$ <sup>32</sup> P dATP	47
3.12.6	Prehibridación de las membranas portadoras del DNA	48
3.12.7	Hibridación con la sonda radioactiva	49
3.12.8	Lavado y exposición de las membranas	49
3.12.9	Identificación y aislamiento de subpoblaciones de fagos	50
3.12.10	Aislamiento de clonas positivas de bacteriófagos	51
3.12.11	Escisión <i>in vivo</i> del vector pBK-CMV a partir de $\lambda$ ZAP	51
3.12.12	Transformación de la cepa XLORL de <i>E. coli</i> con los plásmidos pBK-CMV portadores de la secuencia EhCHS de <i>E. histolytica</i>	51
3.12.13	Secuenciación y análisis de los fragmentos de DNA de <i>E. histolytica</i> obtenidos de $\lambda$ ZAP	52
3.13	Ensayos tipo Southern blot	52
3.13.1	Digestión del DNA	52
3.13.2	Electroforesis del DNA	53
3.13.3	Transferencia del DNA	53

3.13.4	Híbridación tipo Southern blot	55
3.14	Ensayos tipo Northern blot	56
3.14.1	Obtención del RNA amibiano	56
3.14.2	Extracción del RNA	57
3.14.3	Preparación de las muestras de RNA	57
3.14.4	Separación del RNA por electroforesis	58
3.14.5	Transferencia del RNA	58
3.14.6	Híbridación tipo Northern blot	58
3.15	Ensayos de transcripción reversa	59
3.15.1	Obtención del RNA amibiano	59
3.15.2	Tratamiento del RNA con DNasa I	59
3.15.3	Síntesis de cDNA y reacciones de PCR	60
3.15.4	Terminación e inicio de la transcripción (RACE-PCR)	61
3.16	Clonación de los genes EhCHS en vectores de expresión	62
3.16.1	Clonación del gen EhCHS1 en el vector pJC45	62
3.16.2	Clonación de los genes EhCHS en el vector pHisT7	64
3.17	Expresión de las proteínas recombinantes en sistemas bacterianos	65
3.17.1	Inducción de la expresión de las proteínas recombinantes EhChS1 y EhChS2	65
3.17.2	Obtención de extractos celulares a partir de bacterias transformadas	65
3.17.3	Análisis de las proteínas recombinantes en geles SDS-PAGE	66
3.18	Transfección de <i>E. histolytica</i> con los genes EhCHS	67
3.18.1	Amplificación de los genes EhCHS por PCR	67
3.18.2	Ligación de los genes EhCHS en los vectores de transfección	67
3.18.2.1	Desfosforilación del DNA plasmídico	68
3.18.2.2	Ligación del DNA de los genes EhCHS a los vectores plasmídicos	68
3.18.3	Transfección de <i>E. histolytica</i> por medio de electroporación	69
3.18.4	Selección de las amibas transfectadas	69
3.18.5	Inducción de la expresión en las amibas transfectadas con HygtetR O Cass/EhCHS	70



3.19	Análisis de la expresión de las proteínas EhCHS en amibas transfectadas	70
3.19.1	Preparación de extractos de proteínas de <i>E. histolytica</i>	70
3.19.2	Separación de proteínas de <i>E. histolytica</i> en SDS PAGE	72
3.19.3	Transferencia de las proteínas a membrana de nitrocelulosa	72
3.20	Generación de anticuerpos anti-EhCHS de <i>E. histolytica</i>	73
3.21	Detección inmunológica de las proteínas	73
3.22	Tinción de las proteínas con plata	75

#### 4 RESULTADOS

4.1	Análisis de secuencias de quitina sintasas reportadas en bancos de datos. Identificación de secuencias consenso	76
4.2	Ensayos de PCR con el DNA genómico de <i>E. histolytica</i>	77
4.3	Tamizaje de la biblioteca de DNA de <i>E. histolytica</i> y secuenciación del gen EhCHS1	81
4.3.1	Tamizaje de la biblioteca de DNA genómico de <i>E. histolytica</i> en $\lambda$ ZAP usando como sonda el fragmento de 200 pb	82
4.4	Posición del gen EhCHS1 de <i>E. histolytica</i>	84
4.5	Ensayos tipo Southern blot	85
4.6	Inducción al enquistamiento, ensayos tipo Northern blot	87
4.7	Ensayos de transcripción reversa	88
4.8	Expresión de la proteína EhChS1 en un sistema bacteriano	89
4.9	Tamizaje virtual en TIGR-Bank para buscar otro posible gen EhCHS	91
4.10	Posición del gen EhCHS2 de <i>E. histolytica</i>	94
4.11	Análisis del gen EhCHS2 de <i>E. histolytica</i>	95
4.11.1	Análisis tipo Southern blot	95
4.11.2	Análisis tipo Northern blot	96
4.11.3	Expresión en sistemas bacterianos	96
4.12	Análisis de la estructura de los genes EhCHS1 y EhCHS2. Ensayos tipo RACE	96
4.13	Transfección de <i>E. histolytica</i> con los genes EhCHS1 y EhCHS2	98
4.13.1	Análisis tipo Northern blot de amibas trasfectadas	98
4.13.2	Análisis tipo Western blot	101

4.13.3	DetECCIÓN inmunológica de las proteínas	101
4.14	ANÁLISIS de la estructura primaria de las proteínas codificadas por los genes EhCHS1 y EhCHS2	102
4.14.1	Comparación de EhChS1 y EhChS2 con la secuencia de otras quitina sintasas	106
4.14.2	Identificación de dominios transmembranales	107
4.14.3	Identificación de dominios conservados en las secuencias EhChS1 y EhChS2	110
4.15	Resultados con <i>E. invadens</i>	111
4.15.1	Amplificación por PCR con el DNA genómico de <i>E. invadens</i>	112
4.15.2	Análisis tipo Southern blot con el DNA de <i>E. invadens</i> usando como sonda el gen EhCHS1	112
4.15.3	Tamizaje de la biblioteca de DNA de <i>E. invadens</i> construida en el bacteriófago $\lambda$ EMBL4	113
4.15.4	Análisis tipo Northern blot sobre el DNA de <i>E. invadens</i> usando como sonda el gen EhCHS1	114
5	DISCUSIÓN	
5.1	Discusión	115
	Identificación de quitina sintasas	116
	Presencia de los genes EhCHS1 y EhCHS2 en el genoma de <i>E. histolytica</i>	117
	Análisis comparativo y estructural de las proteínas	119
	Análisis de las proteínas recombinantes	123
	Análisis tipo Northern blot en trofozoitos inducidos al enquistamiento	125
	Importancia y función de los cationes en el enquistamiento de <i>E. histolytica</i>	129
	El sistema de síntesis de glucógeno como un modelo para entender el proceso desíntesis de quitina y enzimas implicadas	130

5.2	Conclusiones	133
5.3	Perspectivas	134
5.4	Contribuciones del presente trabajo	136
BIBLIOGRAFÍA		137
CURRICULUM VITAE: Eduardo Campos Góngora		

### LISTA DE TABLAS

<b>Tabla</b>	<b>Página</b>
1. Composición de la reacción típica de PCR con el DNA genómico de Entamoeba	39
2. Composición de la reacción de ligación en el vector PCR <sup>R</sup> 2.1	41
3. Composición de una reacción típica de digestión con la enzima <i>Eco</i> RI sobre el DNA plasmídico	43
4. Reacción de digestión del DNA para ensayos tipo Southern blot	53
5. Composición de la reacción de digestión para eliminar al DNA como posible contaminante del RNA	59
6. Composición de una reacción típica de RT sobre RNA total de Entamoeba	60
7. Composición de una reacción típica de ligación en los vectores de expresión	63
8. Regiones conservadas identificadas en la secuencia de aminoácidos de las quitina sintasas reportadas en los bancos de datos	76
9. Secuencia de los oligonucleótidos degenerados diseñados sobre las secuencias conservadas de los genes CHS	77
10. Comparación de secuencias entre quitina sintasa de <i>E. histolytica</i> y quitina sintasas de otros organismos	80

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura</b>	<b>Página</b>
1. Productos de PCR amplificados con los oligonucleótidos degenerados P1-P6 y P5-P8 sobre el DNA genómico de <i>E. histolytica</i>	78
2. Representación esquemática de los resultados y estrategia seguidos en la primera etapa del trabajo	79
3. Estrategia de tamizaje de la biblioteca de DNA genómico de <i>E. histolytica</i> construida en el vector $\lambda$ ZAP	83
4. Representación esquemática de la región ocupada por el gen que codifica para la quitina sintasa (EhCHS1) en el fragmento de 8 Kb secuenciado correspondiente a las clonas 5.2 y 1.1 del bacteriófago $\lambda$ ZAP	84
5. Análisis tipo Southern blot del gen EhCHS1 de <i>E. histolytica</i> y de la región ocupada por éste	86
6. Análisis tipo Northern blot del gen EhCHS1 de <i>E. histolytica</i>	88
7. Análisis de RT-PCR sobre el RNA total de <i>E. histolytica</i>	89
8. Análisis de la expresión de las proteínas recombinantes en el sistema bacteriano	90
9. Representación esquemática de la estrategia seguida para el tamizaje virtual del banco de datos TIGR-BANK usando como sonda la secuencia determinada en este trabajo correspondiente al gen EhCHS1 de <i>E. histolytica</i>	92
10. Representación esquemática de la región ocupada por el gen que codifica para la quitina sintasa (EhCHS2) en el fragmento de DNA de <i>E. histolytica</i> secuenciado	94
11. Análisis tipo Southern blot del gen EhCHS2 de <i>E. histolytica</i>	95
12. Análisis RACE-PCR del gen EhCHS1	97
13. Análisis RACE-PCR del gen EhCHS2	98
14. Análisis tipo Northern blot de <i>E. histolytica</i> transfectada con el vector Neo Cass que acarrea los genes EhCHS1 o EhCHS2	99
15. Análisis tipo Northern blot de <i>E. histolytica</i> transfectada con el vector HygtetR O Cass modificado con los genes EhCHS1 y EhCHS2	100

16. Secuencia de nucleótidos y aminoácidos deducidos del gen EhCHS1 de <i>E. histolytica</i>	103
17. Secuencia de nucleótidos y aminoácidos deducidos del gen EhCHS2 de <i>E. histolytica</i>	105
18. Perfil de hidrofobicidad de las presuntas quitina sintasas de <i>E. histolytica</i> codificadas por los genes EhCHS1 y EhCHS2	108
19. Diagrama que representa los supuestos dominios estructurales de las ChS de <i>E. histolytica</i> y proteínas relacionadas	109
20. Análisis de secuencias consenso entre las proteínas ChS de <i>E. histolytica</i> y de especies relacionadas	111
21. Análisis tipo Southern blot de <i>E. invadens</i> usando como sonda los genes EhCHS1 y EhCHS2 de <i>E. histolytica</i>	113

## NOMENCLATURA

Abs	Absorbancia
AGT	Aglutinina de germen de trigo
Amp	Ampicilina
APS	Persulfato de amonio
AS	<i>Antisense</i> (Oligonucleótido en dirección 3' a 5')
ATP	Trifosfato de adenosina
BSA	Seroalbúmina de bovino
cDNA	DNA complementario
CHS	Quitina sintasa (gen)
ChS 3	Quitina sintasa 3 (proteína codificada por el gen CHS3)
Chsp	Quitina sintasa (unidad protéica parte del complejo)
ChS III	Quitina sintasa III (complejo)
cm	Centímetros
°C	Grados Celsius
Da	Dalton
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTP	desoxi-nucleótidos trifosfatados
DTT	Ditiotreitol
E-64	L-trans-Epoxysuccinil-l-leucilamido-(4-(guanidino)-buta
Ed	<i>Entamoeba dispar</i>
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
Eh	<i>Entamoeba histolytica</i>
Ei	<i>Entamoeba invadens</i>
<i>et al.</i>	" <i>et alteri</i> " (y otros)
EtOH	Alcohol etílico
g	Gramos
gal	Galactosa
GlcNAc	N-acetil-D-glucosamina
G418	Sulfato de gentamicina G418
h	Horas
HEPES	N-(2-Hidroxiethyl) piperazina-N'-(2-ácido etansulfónico)
hyg	Fosfotransferasa de higromicina
IPTG	Isopropil-β-D-tiogalactopiranosido
kDa	Kilodaltones
kJ	Kilojoules
l	Litro
lb/pulg <sup>2</sup>	Libras por pulgada cuadrada
M	Concentración molar
mA	Miliamperios
mg	Miligramos
min	Minutos
ml	Mililitro
mm	Milímetros
mM	Concentración milimolar
MOPS	Ácido propansulfónico 3-N-Morpholino



ms	Milisegundos
$\mu$ F	Microfaraday
$\mu$ g	Microgramos
$\mu$ l	Microlitro
$\mu$ M	Concentración micromolar
neo	Fosfotransferasa de neomicina
OD	Densidad óptica
PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
pH	Potencial de hidrógeno
RNA	Ácido ribonucleico
RNasa	Ribonucleasa
rpm	Revoluciones por minuto
RT	Transcripción reversa
S	Sense (Oligonucleótido en dirección 5' a 3')
SDS	Dodecilsulfato de sodio
TA	Temperatura ambiente
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TEMED	N,N,N', N'-tetrametil etilendiamino
Tris	Tris-hidroximetil aminoetano
rpm	Revoluciones por minuto
U	Unidades enzimáticas
UDP	Difosfato de uridina
UV	Ultravioleta
V	Voltios
X	Concentración con respecto a la solución de trabajo
X-gal	5-Bromo-4-cloro-3-indolil- $\beta$ -D-galactopiranosido

## RESUMEN

Fecha de Graduación: Octubre, 2002

Eduardo Campos Góngora  
Universidad Autónoma de Nuevo León  
Facultad de Ciencias Biológicas

Título del estudio: QUITINA SINTASAS DE *Entamoeba histolytica*:  
CLONACIÓN Y ANÁLISIS DE LA  
ESTRUCTURA PRIMARIA

Núm. de páginas: 147 Candidato para el grado de Doctor en Ciencias  
con especialidad en Microbiología.

Área de estudio: Biología Celular y Molecular de protozoarios patógenos.

### Propósito y método del estudio:

*Entamoeba histolytica*, el agente causal de la amibiasis humana, es responsable de millones de casos de colitis y absceso hepático cada año; presenta 2 etapas en su ciclo de vida, el trofozoíto y el quiste. La transmisión del parásito está restringida a la etapa de quiste ya que esta forma puede sobrevivir fuera del cuerpo humano y es resistente al medio ambiente ácido del estómago. Poco se sabe acerca de los requerimientos para la formación de quistes de *E. histolytica* debido principalmente a la carencia de un protocolo que permita la inducción del enquistamiento *in vitro*. La resistencia de los quistes a choques hipotónicos y otros factores adversos es debida a su pared, la cual contiene quitina, un polímero lineal de GlcNAc con enlaces  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4). La síntesis de quitina es catalizada por las enzimas denominadas quitina sintasas (UDP-GlcNAc:chitin 4- $\beta$ -N-acetylglucosaminyltransferase, EC 2.4.1.16). En hongos, insectos y en *E. invadens*, la actividad de las quitina sintasas depende de la presencia de iones de Mg, Mn o Co. Los trofozoitos de *E. histolytica* cultivados en medio suplementado con Mg<sup>2+</sup>, Mn<sup>2+</sup> y Co<sup>2+</sup>, son capaces de diferenciarse y formar estructuras parecidas a quistes resistentes a SDS, y que además tienen una mayor proporción de GlcNAc en su pared sugiriendo que una quitina sintasa dependiente de iones está involucrada en la formación de quistes de *E. histolytica*. En este trabajo, por medio de PCR y *primers* degenerados se logró amplificar 2 fragmentos de los genes CHS de *E. histolytica* los que se usaron como sonda para tamizar una biblioteca de DNA de

*E. histolytica*. Se clonaron y secuenciaron 2 genes de *E. histolytica* (EhCHS1 y EhCHS2) que codifican para quitina sintasas. La expresión de los mRNA de las quitina sintasas no aumenta cuando los trofozoítos son inducidos a la diferenciación (por efecto de  $Mg^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$  y  $Co^{2+}$ ), lo cual sugiere que los genes que codifican para las quitina sintasas se expresan de manera constitutiva en cada una de las etapas y que posiblemente las quitina sintasas de *E. histolytica* se encuentran en forma de zimógeno.

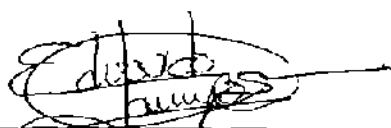
El análisis de la estructura primaria de EhCHS1 y EhCHS2 deducido a partir de la secuencia de los respectivos genes reveló que: a) estas proteínas tienen un peso molecular de 73 y 114 kDa, respectivamente; b) la identidad entre estas proteínas, al nivel de aminoácidos, es solo del 23%, sin embargo, ambas proteínas presentan hasta 35% de identidad con respecto a quitina sintasas de otros organismos; c) La similitud está restringida principalmente al área central (400 Aa) conocida como la "región catalítica"; d) la secuencia de Aa que forman el sitio activo de las quitina sintasas de levaduras está completamente conservada en *E. histolytica*; e) las dos quitina sintasas contienen segmentos transmembranales en sus extremos N-terminal y C-terminal, sugiriendo que éstas son proteínas integrales de membrana como ha sido descrito para algunas de las quitina sintasas de levaduras.

#### Contribuciones y conclusiones:

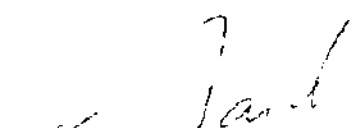
El conocimiento de los genes que codifican para las enzimas responsables de la síntesis de quitina en *E. histolytica* es un paso firme en el difícil camino hacia el conocimiento del proceso de síntesis de quitina en este protozooario parásito, y por consiguiente, al conocimiento de procesos involucrados en la diferenciación del organismo, específicamente en los aspectos concernientes a la síntesis de pared, organelo por demás importante en el ciclo de vida del parásito que lo capacita a ser una forma infectiva y responsable de la transmisión de la enfermedad.

En nuestro conocimiento, esta es la primera clonación de genes que codifican para quitina sintasas de un protozooario parásito.

Monterrey, N. L., México. Octubre del 2002



M. C. Eduardo Campos Góngora.



Dr. Salvador Said Fernández.

**ABSTRACT**

**Graduation Date: October, 2002**

**Eduardo Campos Góngora**  
**Autonomous University of Nuevo León**  
**Biological Sciences School**

**Title:** *Entamoeba histolytica* **CHITIN SYNTHASES: CLONING AND ANALYSIS OF PRIMARY STRUCTURE.**

**Page num.: 147** **Candidate to Doctor in Sciences**  
**with specialty in Microbiology.**

**Study area:** **Molecular and Cell Biology of pathogenic protozoa.**

**Goal and method of this study:**

The fecal-oral spread intestinal protozoon parasite *Entamoeba histolytica*, the causative agent of human amoebiasis, is responsible for 50 millions of cases of colitis or liver abscess each year. The *E. histolytica* life-cycle consists of two stages, trophozoite and cyst. Transmission of the parasite is restricted to the cyst stage due to only this form can survive outside the human body and is resistant to the acid environment of the stomach. At present, very little is known about the requirements for *E. histolytica* cyst formation due to the lack of suitable protocols to induce cysts *in vitro*.

The characteristic resistance of cysts to hypotonic shock and other adverse factors is due to their wall. The wall of *E. histolytica* cysts contains chitin, a linear polymer of  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4) linked GlcNAc. The synthesis of chitin is catalyzed by chitin synthases (UDP-GlcNAc:chitin 4- $\beta$ -N-acetylglucosaminyltransferase, EC 2.4.1.16). In fungi insects and *E. invadens* has been showed that chitin synthase activity is dependent on the presence of Mg, Mn or Co ions. *E. histolytica* trophozoites cultivated in a medium supplemented with Mg<sup>2+</sup>, Mn<sup>2+</sup> and Co<sup>2+</sup> are capable to form cysts-like structures resistant to SDS effect. In addition, they contain high quantities of GlcNAc, suggesting that an ion-dependent chitin synthase is involved in *E. histolytica* cyst formation.

In this work, two fragments of putative *E. histolytica* chitin synthase genes were amplified by PCR, by using degenerated primers. These fragments were used as probes for screening

an *E. histolytica*-DNA-library. Two *E. histolytica*-genes (EhCHS1 and EhCHS2) encoding putative chitin synthases were cloned and sequenced. The mRNA-EhCHS expression did not increase when the trophozoites were induced to differentiate with  $Mg^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$  and  $Co^{2+}$  in the culture medium. The above is suggestive that the chitin synthases are expressed constitutively on each *E. histolytica* differentiation stage, probably as zymogens.

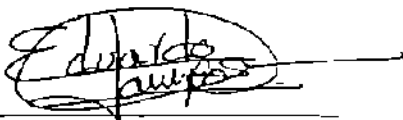
The protein primary structure, which were deduced from the EhCHS1 and EhCHS2 sequences, showed the following facts: a) The *E. histolytica* chitin synthases have a molecular weight of 73 and 114 kDa, respectively; b) the proteins showed only 23% amino acid identity each other, however, both proteins showed 35% identity with respect to chitin synthases from other organisms; c) similarity was mainly restricted to a central stretch of about 400 amino acid residues known as the "catalytic region"; d) The Aa sequence that form the active site of yeast chitin synthases is completely conserved in *E. histolytica*; e) both *E. histolytica* chitin synthases contain trans-membrane domains within their N-terminal and C-terminal parts, suggesting that these are integral membrane protein as some yeast chitin synthases.

#### Contributions and conclusions:

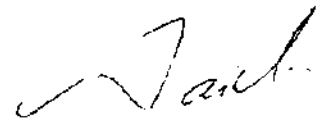
The knowledge of genes that codify for *E. histolytica* chitin synthase enzymes is a first step to understand the chitin synthesis mechanism in this parasitic protozoa, and the processes involved in the differentiation of this organism. specially the wall synthesis.

In our knowledge, this is the first time that the genes that codify for parasitic protozoa chitin synthases have been cloned.

Monterrey, N. L., México. October/2002



M. C. Eduardo Campos Góngora.



Dr. Salvador Said Fernández.