

El análisis de la secuencia de dicho fragmento con ayuda del programa BLAST, reveló una alta homología (48-50%) con respecto a secuencias correspondientes a quitina sintasas de especies diferentes a las encontradas en el análisis para el gen EhCHS1. Mientras que el alineamiento pareado con la secuencia correspondiente al gen EhCHS1 demuestra una homología del 42%.

La evidencia anterior indica que esta nueva secuencia corresponde a un nuevo gen EhCHS que posiblemente codifica para una quitina sintasa en este protozoario.

Debido a que en el análisis de la secuencia determinada (correspondiente al gen EhCHS2, con un ORF que consta de 369 Aa) no se observaron ni el codón de inicio ni el codón de terminación de este posible gen, el siguiente paso fue el diseño de oligonucleótidos específicos sobre las secuencias complementarias a las clonas ENTBZ92 y ENTJB40 (secuencias: ENTBZ92TR y ENTJB40TF), buscando con ello la amplificación por medio de PCR de las regiones correspondientes a los extremos 5' y 3' del nuevo gen (Fig. 9).

En el análisis de las secuencias obtenidas a partir de los nuevos fragmentos amplificados tampoco se encontraron los codones de inicio y terminación del gen EhCHS2, indicando que se trata de un ORF más grande que el correspondiente al gen EhCHS1.

Con la secuencia determinada hasta el momento se realizó, de manera secuencial, un nuevo tamizaje electrónico sobre las secuencias reportadas en TIGR-BANK, seleccionando las clonas cuya secuencia presenta una región de traslape con respecto a la secuencia previa determinada y diseñando sobre dichas secuencias nuevos oligonucleótidos que permitieran la amplificación de los fragmentos por PCR, a partir de DNA genómico; con los subsecuentes procesos de clonación y secuenciación.

Con esta estrategia fue posible determinar la secuencia completa del gen EhCHS2 de *E. histolytica*, desde el codon de inicio hasta el codon de término. Dicha secuencia presenta un ORF de 2943 pb (correspondientes a 981 Aa), sin regiones no-codificantes (intrones) que interrumpan dicho ORF.

El gen EhCHS2 tiene un ORF mas grande que el gen EhCHS1, lo cual va más de acuerdo a los datos que se tienen de genes de quitina sintasa de otros organismos como nemátodos (*Brugia malayi*, *Caenorabditis elegans*), e insectos (*Aedes aegypti*, *Drosophila melanogaster*, *Lucilia cuprina*) además de su mayor similitud con los genes que codifican para quitina sintasas de la clase III de hongos y levaduras.

Además, en el fragmento de 4700 pb cuya secuencia se determinó, se identificaron los ORF de los genes adyacentes al gen EhCHS2.

4.10 Posición del gen EhCHS2 de *E. histolytica*

En la Fig. 10 se puede observar la estructura del gen EhCHS2 así como la región que ocupa dicho gen en el genoma de *E. histolytica*, además de la presencia de los genes adyacentes. Hacia el extremo 5', contiguo al gen EhCHS2, se encuentra el ORF correspondiente al gen que codifica para la proteína ribosomal L39 (*Ehrp*) y adyacente a éste se encuentra el gen que codifica para la proteína calmodulina (*Ehcal*); la secuencia parcial de este gen fue reportada por Tanaka y col. en 1997 y posteriormente la secuencia completa del gen se determinó en este laboratorio (datos no publicados). Por otra parte, en el extremo 3' de la secuencia se encuentra el gen *EhbpFK506* que codifica para la proteína de unión FK506. La identificación de los genes correspondientes se hizo con base en su homología con las secuencias previamente reportadas en los bancos de datos.

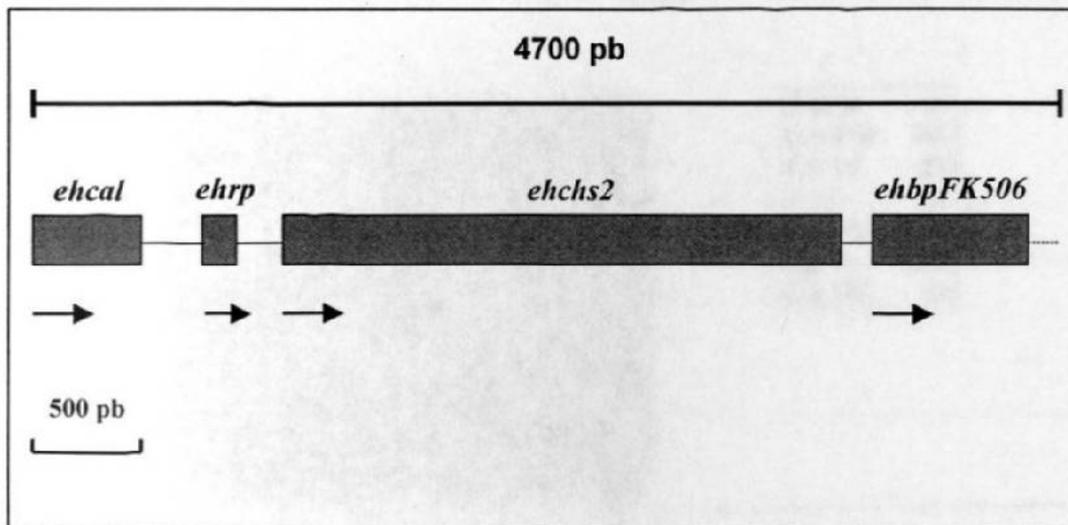


Fig. 10. Representación esquemática de la región ocupada por el gen que codifica para la quitina sintasa (EhCHS2) en el fragmento de DNA de *E. histolytica* secuenciado. Las regiones codificantes están representadas por cuadros grises y la orientación de los frentes de lectura abierto (ORF) está indicada por flechas. La asignación de los genes fue hecha con base en la homología de la secuencia deducida del DNA a la secuencia de proteínas conocidas en las bases de datos. cal, calmodulina; rp, proteína ribosomal L39; chs2, quitina sintasa; bpFK506, proteína de unión FK506.

4.11 Análisis del gen EhCHS2 de *E. histolytica*

4.11.2 Análisis tipo Northern blot

4.11.1 Análisis tipo Southern blot

Al igual que en los ensayos con el gen EhCHS1, cuando el gen EhCHS2 se usó como sonda para el análisis de Southern blot, el fragmento de DNA de 910 pb correspondiente a la región central (nucleótidos 1080 al 1989) del gen EhCHS2 se usó como sonda para realizar la hibridación con el DNA de *E. histolytica*. El análisis se hizo bajo las mismas condiciones que las usadas con el gen EhCHS1. En la Fig. 11 se muestra el resultado de dicha hibridación; se observa la presencia de una sola banda correspondiente al producto de la hibridación específica con el DNA de la sonda EhCHS2. Este resultado permite determinar la presencia de un solo gen EhCHS2 en el genoma de *E. histolytica*.

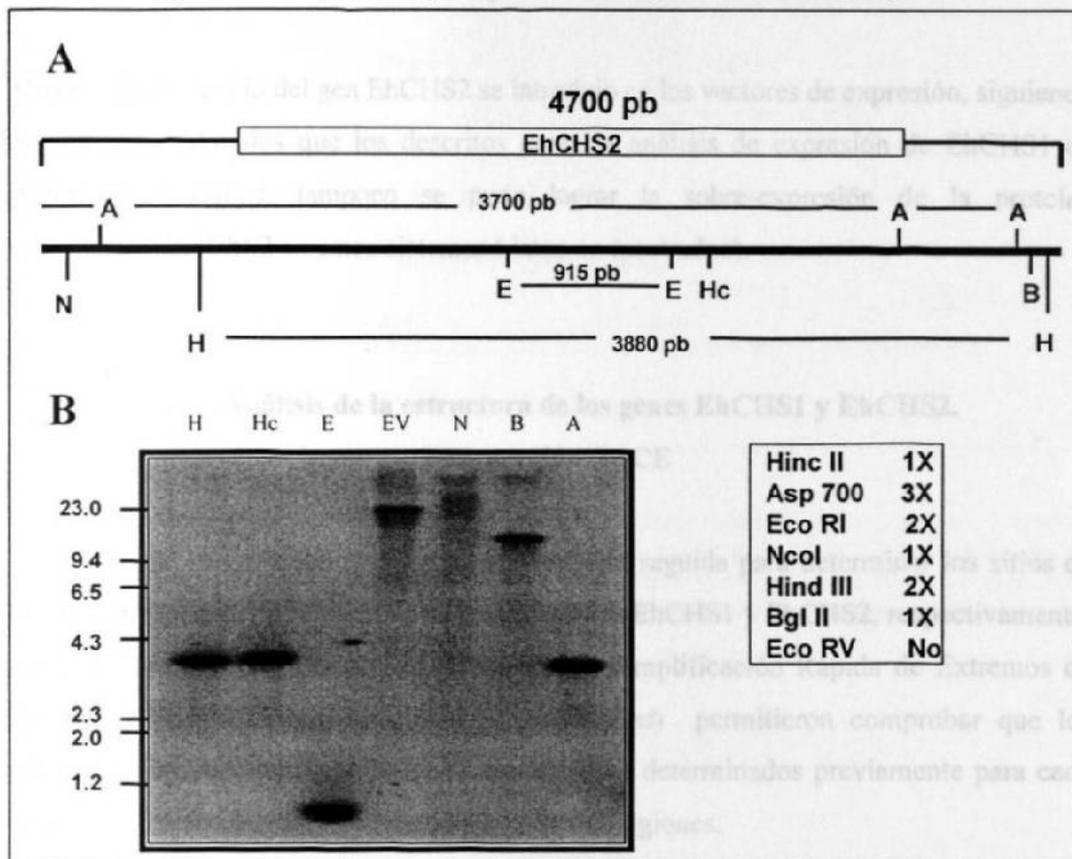


Fig. 11. Análisis tipo Southern blot del gen EhCHS2 de *E. histolytica*.

A) Representación esquemática de la secuencia total de DNA determinada (aprox. 4 Kb). Se indican los sitios de corte predichos en la secuencia (con ayuda del Programa DNASIS); también se indica el tamaño de los fragmentos esperados en la digestión con cada una de las enzimas.

B) El DNA genómico de *E. histolytica* (80 µg/línea) se digirió con cada una de las enzimas de restricción *Hinc* II, *Asp* 700, *Eco* RI, *Nco* I, *Hind* III, *Bgl* II y *Eco* RV. Después de la separación de las muestras por medio de electroforesis, se hizo la transferencia de éstas a una membrana de nitrocelulosa. Para la hibridación se usó un fragmento de DNA de 910 pb correspondiente a la región catalítica del gen EhCHS2, marcado con ³²P. En el lado izquierdo de la imagen se indica en Kb, el tamaño de los marcadores de talla molecular. En el cuadro de la derecha se indica el número (X) de sitios de corte para cada una de las enzimas. Hc=*Hinc* II, A=*Asp* 700, E=*Eco* RI, EV=*Eco* RV, N=*Nco* I, B=*Bgl* II y H=*Hind* III.

4.11.2 Análisis tipo Northern blot

Al igual que en los ensayos con el gen EhCHS1, cuando el gen EhCHS2 se usó como sonda para hacer la hibridación sobre el RNA total de *E. histolytica* obtenido a diferentes tiempos del proceso de inducción al enquistamiento (en presencia de metales divalentes), no se pudo determinar la presencia de mRNA correspondientes a quitina sintasa de este organismo en ninguna de las diferentes etapas analizadas (datos no mostrados).

4.11.3 Expresión de la proteína en sistemas bacterianos

Cuando la secuencia del gen EhCHS2 se introdujo en los vectores de expresión, siguiendo los mismos protocolos que los descritos para los análisis de expresión de EhCHS1 en sistemas bacterianos, tampoco se pudo lograr la sobre-expresión de la proteína recombinante EhChS2 en estos sistemas (datos no mostrados).

4.12 Análisis de la estructura de los genes EhCHS1 y EhCHS2.

Ensayos tipo RACE

En las Figs. 12 y 13 se esquematiza la estrategia seguida para determinar los sitios de inicio y terminación de la transcripción en los genes EhCHS1 y EhCHS2, respectivamente. Los ensayos de amplificación por el método de Amplificación Rápida de Extremos de cDNA (RACE= *Rapid amplification of cDNA End*) permitieron comprobar que los codones de inicio y terminación de la transcripción determinados previamente para cada uno de los genes, corresponden realmente a dichas regiones.

Los ensayos de PCR sobre el cDNA de *E. histolytica* permitieron la amplificación de un fragmento de aproximadamente 250 pb, para el gen EhCHS1 y un fragmento de aproximadamente 155 pb para el gen EhCHS2.

El análisis de la secuencia de dichos fragmentos permitió determinar que, para el gen EhCHS1, el inicio de la transcripción se encuentra aproximadamente a 75 pb en posición río arriba del codón ATG; mientras que para el gen EhCHS2, dicha región se localiza a

40 pb del codón de inicio. La cola de poli-A se localiza a 53 y 19 pb hacia el extremo 3' del codón de terminación de los genes EhCHS1 y EhCHS2, respectivamente.

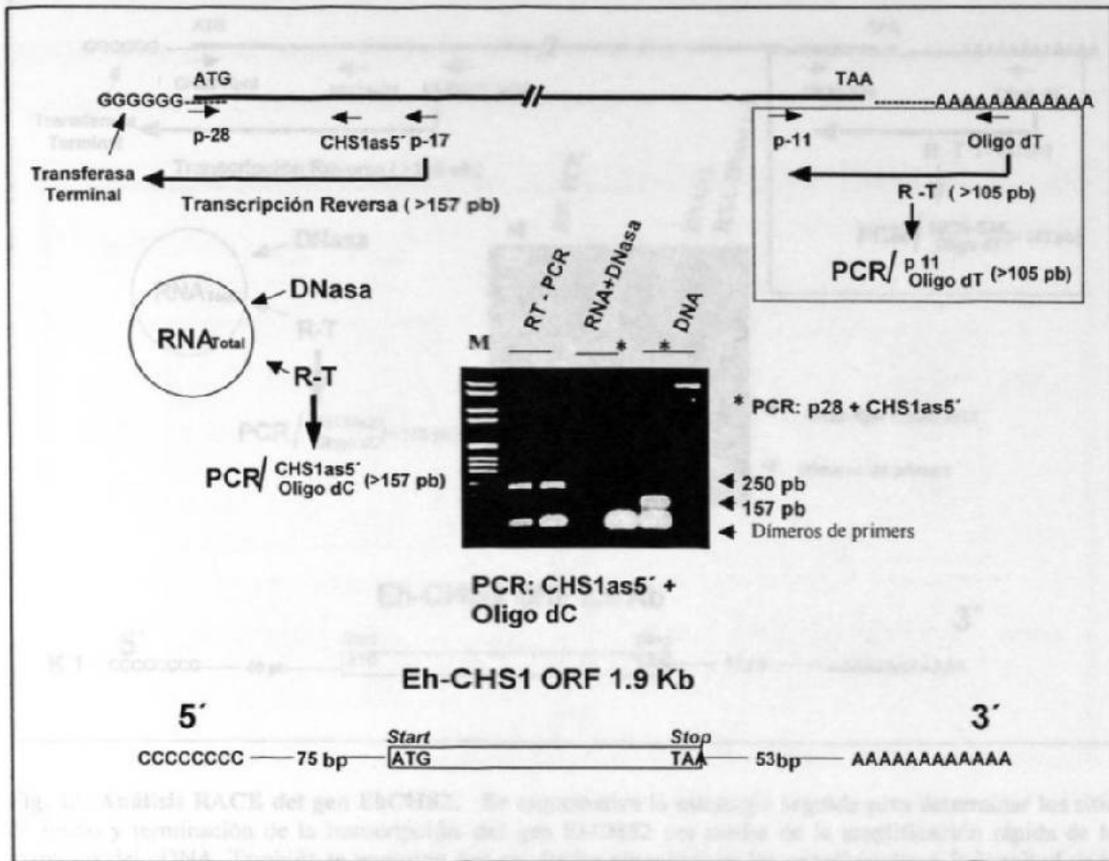


Fig. 12. Análisis RACE-PCR del gen EhCHS1. Esquema que muestra la estrategia seguida para determinar los sitios de inicio y terminación del gen EhCHS1 por medio de la amplificación rápida de los extremos del cDNA. También se muestran los resultados obtenidos en los experimentos y la longitud de las regiones no traducidas resultado del análisis posterior a la clonación y secuenciación de los productos generados por RT-PCR

4.13.1 Análisis tipo Northern blot de ambas transfectadas

Después de la transfección de *E. histolytica* con la secuencia de los genes EhCHS1 y EhCHS2, se realizó la extracción del RNA para realizar los ensayos de hibridación con las sondas respectivas; comprobado de esta manera la expresión de los mensajeros producidos por las secuencias acarreadas por los vectores plasmídicos.

En la Fig. 14 se pueden observar los resultados de la hibridación con el RNA obtenido a partir de las amibas transfectadas con el vector que acarrea el gen de resistencia a

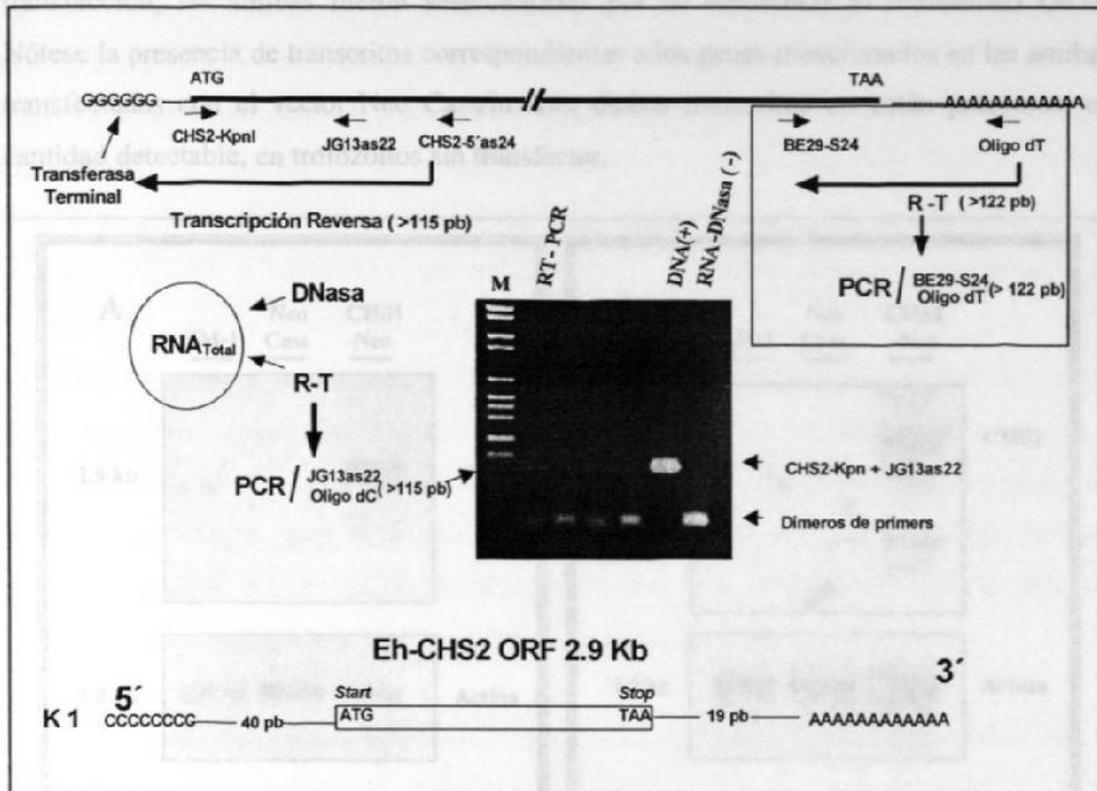


Fig. 13. Análisis RACE del gen EhCHS2. Se esquematiza la estrategia seguida para determinar los sitios de inicio y terminación de la transcripción del gen EhCHS2 por medio de la amplificación rápida de los extremos del cDNA. También se muestran los resultados obtenidos en los experimentos y la longitud de las regiones no traducidas resultado del análisis posterior a la clonación y secuenciación de los productos generados por RT-PCR

4.13 Transfección de *E. histolytica* con los genes EhCHS1 y EhCHS2

4.13.1 Análisis tipo Northern blot de amibas transfectadas

Después de la transfección de *E. histolytica* con la secuencia de los genes EhCHS1 y EhCHS2, se realizó la extracción del RNA para realizar los ensayos de hibridación con las sondas respectivas; comprobando de esta manera la expresión de los mensajeros codificados por las secuencias acarreadas por los vectores plasmídicos.

En la Fig. 14 se pueden observar los resultados de la hibridación con el RNA obtenido a partir de las amibas transfectadas con el vector que acarrea el gen de resistencia a

neomicina (vector NeoCass-) modificado con los genes EhCHS1 y EhCHS2. Posterior a la transfección, las amibas fueron seleccionadas por su resistencia al antibiótico G418. Nótese la presencia de transcritos correspondientes a los genes mencionados en las amibas transfectadas con el vector Neo Cass/inserto; dichos transcritos no están presentes, en cantidad detectable, en trofozoítos sin transfectar.

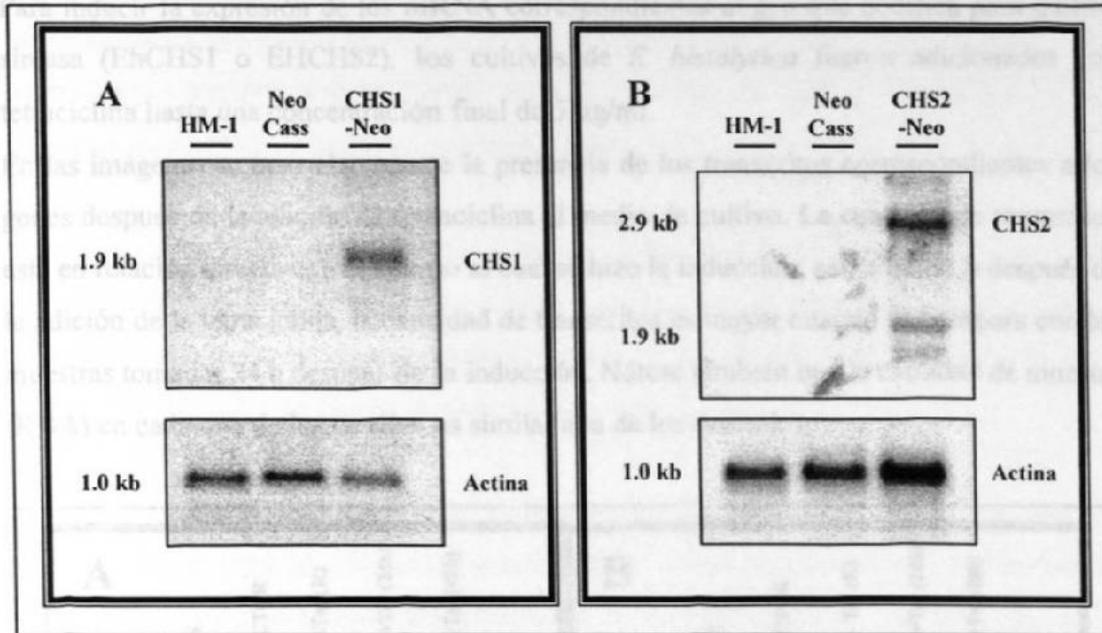


Fig. 14. Análisis tipo Northern blot de *E. histolytica* transfectada con el vector Neo Cass que acarrea los genes EhCHS1 (A) y EhCHS2 (B).

RNA total de cada una de las muestras (10 µg/línea) se depositaron en los carriles. Después de su separación por medio de electroforesis, las muestras se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa. Para la hibridación en los respectivos ensayos se usaron como sondas, el fragmento total (1.9 Kb) del gen EhCHS1 y el fragmento de 910 pb correspondiente al dominio central del gen EhCHS2, marcados con ³²P. El análisis se hizo bajo las mismas condiciones que las determinadas para los anteriores ensayos Northern blot. Para comprobar la calidad y cantidad de cada muestra de RNA, sobre la misma membrana se hizo la hibridación usando como sonda un fragmento del gen de actina de *E. histolytica*. A la derecha está indicada la posición de los genes de acuerdo a su tamaño (en pares de bases).

Lineas: HMI: RNA obtenido de trofozoítos sin transfectar.

NeoCass: RNA obtenido de trofozoítos transfectados con el vector NeoCass solo.

CHS-Neo: RNA obtenido de trofozoítos transfectados con el vector Neo Cass modificado con el gen EhCHS1 o EhCHS2

En la Fig. 15 se observan los resultados de la hibridación con el RNA obtenido a partir de las amibas transfectadas con el vector que acarrea el gen de resistencia a higromicina (vector Hyg-TetR O Cass). Después de la transfección, las amibas fueron seleccionadas de acuerdo a su resistencia al antibiótico higromicina presente en el medio de cultivo (10 µg/ml).

Para inducir la expresión de los mRNA correspondientes al gen que codifica para quitina sintasa (EhCHS1 o EhCHS2), los cultivos de *E. histolytica* fueron adicionados con tetraciclina hasta una concentración final de 5 µg/ml.

En las imágenes se nota claramente la presencia de los transcritos correspondientes a los genes después de la adición de tetraciclina al medio de cultivo. La cantidad de transcritos esta en relación directa con el tiempo al cual se hizo la inducción; así, a las 48 h después de la adición de la tetraciclina, la cantidad de transcritos es mayor cuando se compara con las muestras tomadas 24 h después de la inducción. Nótese también que la cantidad de muestra (RNA) en cada uno de los carriles es similar a la de los controles.

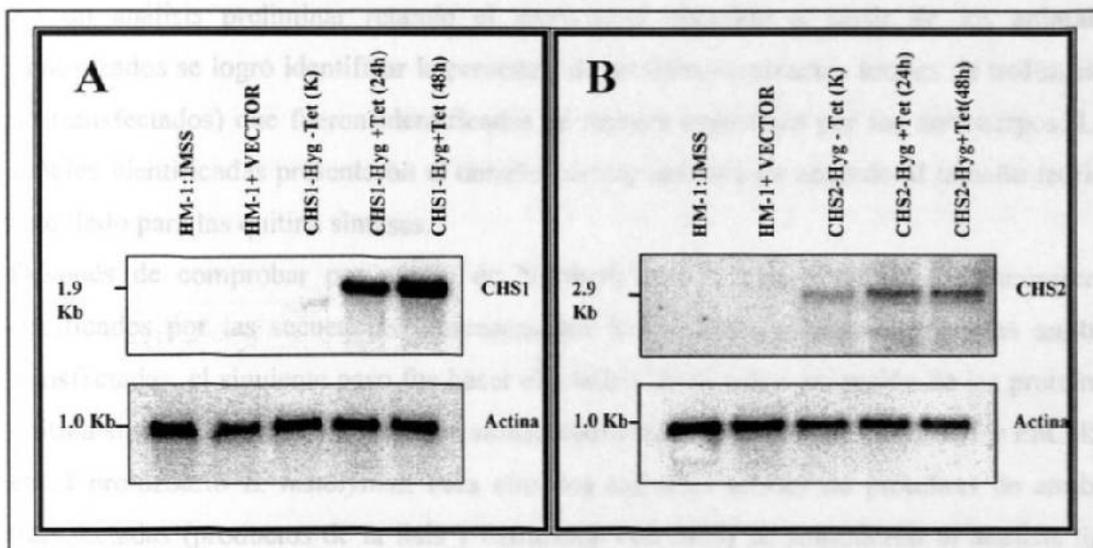


Fig. 15. Análisis tipo Northern blot de *E. histolytica* transfectada con el vector HygtetR O Cass modificado con los genes EhCHS1 (A) y EhCHS2 (B). Las condiciones experimentales son las mismas que las descritas para la Fig. 12. A la derecha está indicada la posición de los genes de acuerdo a su tamaño y a la izquierda se indica el tamaño de estos en pares de bases.

Lineas: HM1: Trofozoitos sin transfectar.

HM-1+ VECTOR: Transfectados con el vector solo

CHS1-Hyg -Tet (K): Transfectados con vector + EhCHS1

CHS1-Hyg +Tet (24h): Transfectados con vector + EhCHS1. RNA obtenido 24 h después de la inducción con tetraciclina.

CHS1-Hyg +Tet (48h): Transfectados con vector + EhCHS1. RNA obtenido 48 h después de la inducción con tetraciclina.

4.13.2 Análisis tipo Western blot

4.13.3 Detección inmunológica de las proteínas

Los anticuerpos anti-quitina sintasa de *E. histolytica* se generaron contra péptidos de 15 aminoácidos de longitud de cada una de las secuencias de los genes EhCHS; para ello, se sintetizaron las secuencias H₂N- CRLRGVERDQSYADD – CONH₂ (aminoácidos 148 al 162) y H₂N – KRIFDKYSEPPQSGC – CONH₂ (aminoácidos 291 al 305) de la secuencia de los genes EhCHS1 y EhCHS2, respectivamente.

Para facilitar el reconocimiento de las proteínas, se buscó que dichas secuencias estuvieran sobre las regiones hidrofílicas de las presuntas proteínas para evitar que los dominios que contienen las secuencias de reconocimiento para los anticuerpos quedaran inmersas en la membrana, dificultando de esta manera su reconocimiento.

En un análisis preliminar retando el suero total obtenido a partir de los animales inmunizados se logró identificar la presencia de proteínas (extractos totales de trofozoitos no transfectados) que fueron identificadas de manera específica por los anticuerpos. Las señales identificadas presentaron el tamaño correspondiente de acuerdo al tamaño teórico calculado para las quitina sintasas.

Después de comprobar por medio de Northern blot la expresión de los mensajeros codificados por las secuencias acarreadas por los vectores plasmídicos en las amibas transfectadas, el siguiente paso fue hacer el análisis de la sobre-expresión de las proteínas quitina sintasas que se presume están siendo codificadas por los genes EhCHS1 y EhCHS2 en el protozoario *E. histolytica*. Para ello, los extractos totales de proteínas de amibas transfectadas (productos de la lisis y extracción con SDS) se sometieron al análisis tipo Western blot con los anticuerpos mencionados. Desafortunadamente, después de la obtención del suero total y purificación de los anticuerpos, no fue posible reproducir los resultados obtenidos con anterioridad sobre los extractos totales de trofozoitos no transfectados, ni en los extractos de las amibas transfectadas e inducidas a la expresión de las proteínas recombinantes. No sabemos si los resultados obtenidos en los ensayos preliminares fueron artefactos de las condiciones del análisis o si durante el proceso de purificación de los anticuerpos, estos sufrieron alguna modificación que les impidió posteriormente el reconocimiento de las proteínas.

Para eliminar la hipótesis de que la falta de reconocimiento por los anticuerpos se debe al enmascaramiento de los sitios específicos en las proteínas, se obtuvieron los extractos de proteínas correspondientes al precipitado y sobrenadante en el proceso de separación durante la extracción de las proteínas solubles presentes en el citoplasma y de las proteínas unidas a membrana, estas últimas obtenidas como resultado de la extracción con el detergente octil-glicosil.

Cuando estas fracciones se retaron contra los anticuerpos anti-CHS, se obtuvo el mismo resultado que en el análisis de las proteínas totales extraídas con SDS.

4.14 Análisis de la estructura primaria de las proteínas que presuntamente son codificadas por los genes EhCHS1 y EhCHS2

La secuencia del gen EhCHS1 presenta un ORF potencial de 643 Aa mientras que el ORF deducido para EhCHS2 comprende 981 Aa.

En las Figs. 16 y 17 se observan las secuencias completas de los genes EhCHS1 y EhCHS2, respectivamente. En cada figura también se presenta la secuencia de Aa deducida con base en la secuencia de nucleótidos determinada para cada gen; se indica también la posición de la secuencia usada para generar los anticuerpos.

EhERD2 ←	
<u>cataaactaattctttgtagatttaatttt</u>	[+1
laagtttttctgaaataaaaLaataaaatttaataaaaaagaaaaaaattctcaccaaaacaa <u>ggaaagt</u> aa	
tcttttcgtttttgagaaagatacatttggttcbaatgaatataaattgaaatgaatagtcatagaccttaata	
<u>atgag</u> taatcaaggagagaaattgaagagttccctcactactctcctgatgatcaagaagttaatttaacg	24
M S N Q G E E I E E F P S L L P D D Q E V N L T	
aaagaacaaaagaaactgctaagctttagaacaacccctggttatagaaattattgatggaataaatat	48
K E T K E T A K A L E Q P P V I E I I D G N K Y	
gaagcataccgagaaaaaatgaaactgtttgggatttttggttgctattaacgttatttttattgtattcgtt	72
E A Y R E K M K L F G I F V A I N V I F I V F V	
caaaccgcttcactctcttggctgttcaattagttttcttatggttatatcatattttcagcatttccaaaattt	96
Q T A S S L A V Q L V F L C Y I I F S A F P K F	
ttatttgggtctatacttcaaaaatgtaagcctcagctcogtgcaccaccaatfaataaaactgatgttgat	120
L F G S I L Q K C K P H V R A P P I N K T D V D	
gaayaagatgggaaacaglatggcacttltcaagtgaaatgttttaaagtctccctcttgygggtylgactgc	144
E E D G E R V W H V S S E M F K C P S C G C D C	

Fig. 16 Parte A.

ggtggtcaaaattattgtacagaatgtggacaaagtgttgaacatgagcatccaattttgcttagtgtttgt	
<u>G G Q N Y C T E C G Q S V E H E H P</u> I L L S V C	168
ttgacagttcatcatgaagatgcatctggtgttgaaggggtataagaagttttgaaattagtgttttacca	
L T V H H E D A S G V E G G I R S F E I S V L P	192
tttgaaccaaagtattgtcaattaatttttgttattgatggaagaagagatagaaatatgcaaattgattat	
F E P K Y C Q L I F V I D G R R D R N M Q I D Y	216
caacaactagaaacagcttcatttcatttattgttagacttcogtggagtfgaaagagaccaaaagttatgcagac	
Q Q L E T A S F I I C R L R G V E R D Q S Y A D	240
gatgatggtgttatttagattttaaagatggaaaaggagatccaagaatattagaagatggaatggctgtgtat	
D D G V I R F K D G K G D P R I L E D G M A V Y	264
gaaggaattcttgaaggtggaatgaattggattgtattattgaaaaagaaaaatggaggaaaaagcattct	
E G I L E S G M N W I V L L K K K N G G K R H S	288
catgaagtttttttgattatattgatagaggaattactcgtaaaacagcaaaagcaattatgtttgttgac	
H E V F F D Y M D R G I T R K T A K A I M F V D	312
agtgtgttgaattttgatgggaaggaatgaaaggggattaatggaatgtataatgggttattttaaaga	
S D V E F A W E G N E R G L M E M Y N G L L K R	336
gaagccatgggaggtgtttgtggagaaattgaagttgocgattggtataaaaaatccattaacaatgtgtcag	
E A M G G V C G E I E V A H W Y K N P L T M C Q	360
tattttgaaataaaatcaaatcaatttttagctaagacatttgaaaattgggttcggaatggtcacttgctta	
Y F E Y K S N Q F L A K T F E N W F G M V T C L	384
ccaggtgctttttctatgattcggccacaagctatggaacagattataaatgaatatttagcaacttccact	
P G A F S M I R P Q A M E T V L N E Y L A T S T	408
tctatattgggaaaagaatcagttggattcttggagaagatagaacactaaccacactcttagtagaaaaaggt	
S I W E K N Q L D L G E D R T L T T L L V E K G	432
tgggatacaggttatgtaactaaggtgtttgcacalaccgacgcaccatttacttttagttggacttattaaa	
W D T G Y V T K A V A H T D A P F T L V G L I K	456
caaagaagaagatggattaattctacaatagtcfaatatgggtattttgttacaagaattagaagaccagta	
I N S T I V N M G I L L Q R I R R P V	480
gttcttctcttgttggctctcttgtttattgaattgttaagttcttttatgcttcttctgtgctgttattg	
V L P L L V S L F I E L L S S F M L P C A V V M	504
ttglttattcaaatctttgctgattgtggaytaataaagctatttgcattggagttcttgttcttllggtta	
L F I Q I F A D C G V N K A I C I G V L L V L W L	528
gccttgcctataacattttagcttaacaagtaagattgaagatattggaatattgggttcaagcatcaaccatt	
A L L I T F S L T S K I E D M E Y W F Q A S T I	552
attggtggatttttttagttttcttatgattattgggggtatttcaaaatgtttcaggattcttttgacaagcac	
I G G F L V F L M I I G V I Q N V S G F F D K H	576
tgccttgaactttcgggttatgttgcogtgggtgtttattattgtgtttgctgcaattattcatggtcaatgg	
W L E L S V M L S W V F I I V F A A I I H G Q W	600
ttttctatatttaacgttgttgcocagttgtgtggttcttttaacacctatgatgtatgcaattattcca	
F S I F N V V A P V V W F L L T P M M Y V I I P	624
atttatgcagtatgtaattttgatgatgtttcogtggggaacacgaggaggatttaagaaaagatagtttaa	
I Y A V C N F D D V S W G T R G G V STOP	642
qaaaagatagtttaactctttcttaattctaatctacaacttaattatttttaaaqaaaaaaaaaaaaaa	
+56 Poly-AAA	

Fig. 16. continuación:

Secuencia de nucleótidos y aminoácidos deducidos del gen EhCHS1 de *E. histolytica*. La secuencia de aminoácidos está indicada bajo los nucleótidos codificantes (código de una letra). La secuencia QRRRW representativa de las quitina sintasas está encerrada en un cuadro sombreado y la secuencia que fue usada como sonda en el tamizaje del banco de DNA, ensayos tipo Southern y Northern blot, está subrayada. La posición y secuencia de los peptidos que se usaron para generar los anticuerpos está indicada por letras remarcadas en negro y encerradas en un cuadro. Se indican también las secuencias de las regiones no traducidas hacia los extremos 3' y 5' del gen. La posición de los codones de inicio y terminación está indicada en cursivas subrayadas. En la región UTR 5', se puede observar la presencia del supuesto elemento iniciador de la transcripción GAAAG ubicado 75 pb "rio arriba" del codon de inicio de la traducción. También se indica la posición del sitio de inicio de la transcripción (+1).

taagcttcaatttaaatt

gagtaccttgtgaatTTTTGGGTTTTaatgtggTTtattt[CG]ataccacaaattatttctttcatttca
 tttgttttagggTtgaaaaaaa[CAAT]ttgagaataaaaatgttatttagtagtaaaaaagaaaacttaaaaa
 [+1]

aaatTTtaataactTTTTtatt[GGATG]catttagctatgatttaaagtataacttggttcaattaaagt
 atggcaaaactccttgatactgaaaattaaaaagttgatagcaaaaagtagttattggTgcaatgTtaatgatt 24

M A N S L I L K I K K L I A K V V I G A M L M I 24

TTtaataactgtacttataacaattcacaaaatgtcagtgagtttcttattactcaattatttatttagacac 48

F N T V L I T I H K M S V S F L I T Q L F I R H 48

gatgcatttglaccaaagtgaaltgtattaacttttgcaccaatgatgttactlattttattgTTTTtataaa 72

D A F V P N V I V L T F A P M M L L F Y C F Y K 72

tatttgttctatgaagaaactccaaaacagtcgttattttttatttatttagaaggaattattgaagggggg 96

Y L F F Y E E T P K Q S F I F Y L L E G I I E G G 96

tcacaggggattgcattaataattTTtaattttctttatgaaaatacacacaatatattactactgttatat 120

S Q G I A L I I L I F F Y E N T Q Q Y I T M L Y 120

attgagtttagtaccattttgttaccattttgttccattgcttaagttaaaacgTtgcattaaatgga 144

I E L V S F V P F I C C S M P K L K R C Q L N G 144

attatattataatcatcaatatttccaattgtaactgcagttataattagTattcattataggTTTTat 168

I I L L I S S I F P I V T A V I I S I H Y R F Y 168

tggcaaatattacagttgatcttttgtttgttgccttattggaggTcatacttaacagggTgtctagg 192

W Q I I T V D L L F V A P Y W R S Y L T G L S R 192

ggttatataaaaacaatgagaaacatcgttattttacttcaattatttagagaattaacaaaaattattggt 216

G Y I K Q I E K H R Y F T S F I R E L T K I I G 216

TTaataataggTtgcTtTTgtgtattacactaatcaattaatccaactgaacgTtggTtgcattcaatcaa 240

L I I G C C E F Y Y T N Q I N P T E R W L I N Q 240

atttatctgcttccattgtgttgcagtttattaattccttttataacttcaattactatttcttggggaatg 264

I Y L L P L C C S L L I P F I L Q I T I S W G M 264

aaggtgctcttctattacaacagcaacactaccaatggtaatatcaattattacagctctctcactctat 288

K A A L P I T T A T L P M V I S I I T A L S L Y 288

ctttcaacatgcaattggTattggTatacctgaaatTTTTgaggggatgtgtatttattatgcaggagatact 312

L S [T C H W Y W I P E I F E G M C] I Y Y A G D I 312

gactggTggtttgttgaatgTtttattggagTatttgttccatgTtgcTtattttgtaaaagacttgttga 336

D W W F V E C F I G V F V S C C L F C K R L V E 336

caaaaggtatataaagaacaagagatgtatggagTattcctgatgtttgttgcTttcattttcgaat 360

Q K R Y I N K T R D V W S I P D V C C V S F S N 360

tcattattatgaaatagaqaactgatgacattatccaaaacgaaatgagyggaagtgatgaaatacattt 384

S L L L N R R T D D I I Q N E M R G S D E N T F 384

aacacaaaaagaatgTtatatgcgctactatgtaccatgaaacagaagTtgagatgactcaactaatagag 408

N T K R I V I C A T M Y H E T E V E M T Q L I E 408

tcattcaaacgactggataacataccttcatcTaaagatcatattgtattttgtattatatttgatgatca 432

S F K R L D N I P S S K D H I V F C I I F D D S 432

tgcacagTtqatagactaacattatatttcaattcatttgcTgaacaaattatacogattattatatacaggaa 456

C T V D R L T L Y F N S F A E Q I I R L L Y Q E 456

ggagTaaaatggaatataaagTtcaatgTttggTgcaattgctttaggagTttttaaagaatggaacatca 480

G V K M E Y K V Q W F G A I A L G V F K N G T S 480

TTaacaatattatttaaagactctcatttataaagaaaaataaacgatatagTcagTtgatgttatttfaat 504

L T I L F K D S H L I K K N K R Y S Q L M L F N 504

tacgcaatcaaaacttatggaaaagaaaatacatttattctatttactgatggagatacgtacttttctcct 528

Y A I K T Y G K E N T F I L F T D G D T Y F S P 528

tcttcagTaaagaaattatgcttTgaaatatacTaaaccaagatgTggTgcaatttctgggagaatata 552

S S V R K L C L E I S S N P R C G A I S G R I Y 552

ccagatggaagggagTtgggcatcctttcaaaagTtTgaatacgcgacaagTcattgTtacagaaacca 576

P D C K G V W A S F Q K F E Y A T S H W L Q K P 576

gcagaggaattactgggTctgTtttattgTtgcTtggTtTtactttacttctcttgaagcagatttat 600

A F E L L G S V L C C P G C F T L L R I E A I Y 600

Fig. 17. Parte A.

gaagacaatttaagaaataaaagaatatttgacaaatatlcagaaccacctcaaagtggctaggtatttta	
E D N L R N K R I F D K Y S E P P Q S G L G I L	624
actcataactttgggtgaagataggtggttatcatatcttcttattgaaagaggatgggaattaaagtattgc	
T H N F G E D R W L S Y L L I E R G W E L K Y C	648
tctatcacaaaatctaaatcttattgtcctactacaacacaagaattctttaatcaaagaagaagtggttg	
S I T K S K S Y C P T T T Q E F F N	672
acttccactlgggctaacttattatgattatcaaaaattggatcagaattaaacgaaataaaaaaatt	
T S T W A N L I M I I K N W I R I K R N N K K I	696
tcaactggatttatgatataacccttctcaatttttatttcttcttactactccactactcttatttg	
S T G F M I Y T L L N F I S S F T T P P T T L L	720
ttgatttatgggtttttagtcatttagaggttccatatactcatattattgcttttagcactttctgtcttt	
L I Y G F L V N L E V P Y T H I I A L A L S V F	744
cctatattaatatttttaattattgaagttggtggttcattatttaccctgcaccatccttcgaaataggtgt	
P I L I F L I I E V V V H Y L P A P S F E I W C	768
attaatattattagtggtatttatggaatagaggtgttggtagttattgttaatttaatttctttgata	
I N I I S G I Y G I E V L L V I V N L I Y S L I	792
actattcaacaaatatacaataaatttgatcttctgtggagctttgggttattggttatgtaattacaattggt	
T I Q Q I S I N L I F C G A L V I V Y V I T I V	816
cttcatttgyaatttaatcgaattggtggaggaataataacaatttccctataccaacaacaacatotta	
L H C E F N R I V G G I I T I F L I P T T N I L	840
ttaataatatactcttttatgcatatgtctgatgtatcatggggaacaagagaacaccatcatgaagacact	
L I I Y S F M H M S D V S W G T R E H H H E D T	864
ttacaaaaaattgtttatgcacaaaactcagacattaattatattgatcaaataccaatatttacaccagag	
L Q K I V Y A Q N S D I N Y I D Q I P I F T P E	888
ccttctactgaaaaacacaataaaaaagatgagaagcaacttgaagaaaactcaatttattactatccttctt	
S S T E K H N K K M R S N L K K T Q F I T I L L	912
ttttttccaaagtttgggtggtattcttcttctttttgtaattggttttttagactatcaataccattta	
F F F T S L C W I I L S L L M F L D Y Q Y H L	936
aagattattggaatttcattttcttttatgattgtaccaacatgtttgactattcttttagttggagtacag	
K I I G I S F S F M I V P T C L T I L L V G V Q	960
tttatttgtatgctatttcatagaatagattcgttggcattcattcttctcattcagagtaatttaactttt	
F I C M L F H R I D S L A F I L S H S E STOP	980
tataaatgaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa	
+18 Poly-AM	

Fig. 17. Continuación:

Secuencia de nucleótidos y aminoácidos deducidos del gen EhCHS2 de *E. histolytica*. La secuencia de aminoácidos está indicada bajo los nucleótidos codificantes (código de una letra). La secuencia QRRRW representativa de las quitina sintasas está encerrada en un cuadro. La posición y secuencia de los péptidos que se usaron para generar los anticuerpos está indicada por letras remarcadas en negro y encerradas en un cuadro. Se indican también las secuencias no traducidas hacia los extremos 3' y 5' del gen. La posición de los codones de inicio y terminación está indicada en cursivas subrayadas. En la región UTR 5', 42 pb "rio arriba" del codón ATG, se puede observar la presencia del supuesto elemento iniciador de la transcripción GAAAG. Además, se observa la presencia de otros 3 posibles sitios de inicio de la transcripción; 2 con la secuencia CAATT y uno más con la secuencia ATCA. También se indica la posición del sitio de inicio de la transcripción (+1).

Los análisis tipo RACE para determinar la secuencia de las regiones no traducidas en ambos extremos de las proteínas se hicieron siguiendo el protocolo descrito en las figuras 12 y 13.

Como resultado de estos análisis, se pudo determinar que en el gen EhCHS1 la transcripción inicia 72 pb "rio arriba" del codón de inicio de la traducción (ATG). Cercana

a dicha posición se observa la presencia de la secuencia GAAAG, descrita como posible elemento iniciador de la transcripción (cf. ref. Ramakrishan and Petri, 2000). No se pudo identificar la presencia de elementos regulatorios de la transcripción.

En el gen EhCHS2, la transcripción inicia 42 pb “río arriba” del codón de inicio de la traducción. Esto es congruente con la presencia, en esta posición, de la secuencia GAAAG correspondiente al elemento iniciador de la transcripción.

En la región 5' no traducible de EhCHS2, se observa también la presencia de 1 elemento ATCA (situado a -127 pb del sitio de inicio de la transcripción) y 3 elementos CAATT (a -73 y -180 pb); dichos elementos se consideran posibles sitios de inicio de la transcripción (Bruchhaus *et al.*, 1993; Gangopadhyay *et al.*, 1997).

En ambos genes, la transcripción inicia en residuos de adenina (posición +1), lo cual es congruente con lo observado en estudios previos donde al parecer la maquinaria transcripcional de *E. histolytica*, al igual que la de Metazoarios, tiene predilección por residuos de adenina (cf. ref. Singh *et al.*, 1997).

A pesar de que no se pudieron localizar las características secuencias correspondientes a la caja TATA (TATTTAAA-G/C) descritas para otros genes de *E. histolytica* (Bruchhaus *et al.*, 1993; Singh *et al.*, 1997), la presencia de los elementos identificados sugieren fuertemente que tanto el gen EhCHS1 como el EhCHS2, son transcritos de manera monocistrónica.

4.14.1 Comparación de EhChS1 y EhChS2 con la secuencia de otras quitina sintasas

El alineamiento pareado de las secuencias EhChS1 y EhChS2 (programa Clustal W) muestran una homología del 23% al nivel de aminoácidos (datos no mostrados); mientras que el alineamiento de las secuencias completas EhChS1 y EhChS2 (programa BLAST) con las secuencias de quitina sintasas de otras especies reportadas en los bancos de datos, muestra una similitud mayor (30 y 33%, respectivamente) a la secuencia de la quitina sintasa de *C. elegans*. Ambas secuencias presentan una similitud mayor a ChS de gusanos (*C. elegans*, *B. malayi*) e insectos (*L. cuprina*, *D. melanogaster*, *A. aegypti*) que a ChS de hongos.

4.14.2 Identificación de dominios transmembranales

En un análisis de hidrofobicidad (Fig. 18) de las proteínas EhChS (que se presume están siendo codificadas por los genes EhCHS1 y EhCHS2) usando los parámetros del programa computacional Kyte and Doolittle (Software DNASIS), se identificaron fácilmente tres regiones: una región hidrofóbica hacia el extremo N-terminal, la cual diverge considerablemente con respecto a las otras secuencias; una región C-terminal que también presenta dominios hidrofóbicos y una región central hidrofílica. Esta última región (aprox. 350 - 400 Aa) comprende la región de mayor homología entre ambas proteínas EhCHS, y también con respecto a las ChS de otras especies. La región central es conocida como el "dominio catalítico" de las quitina sintasas.

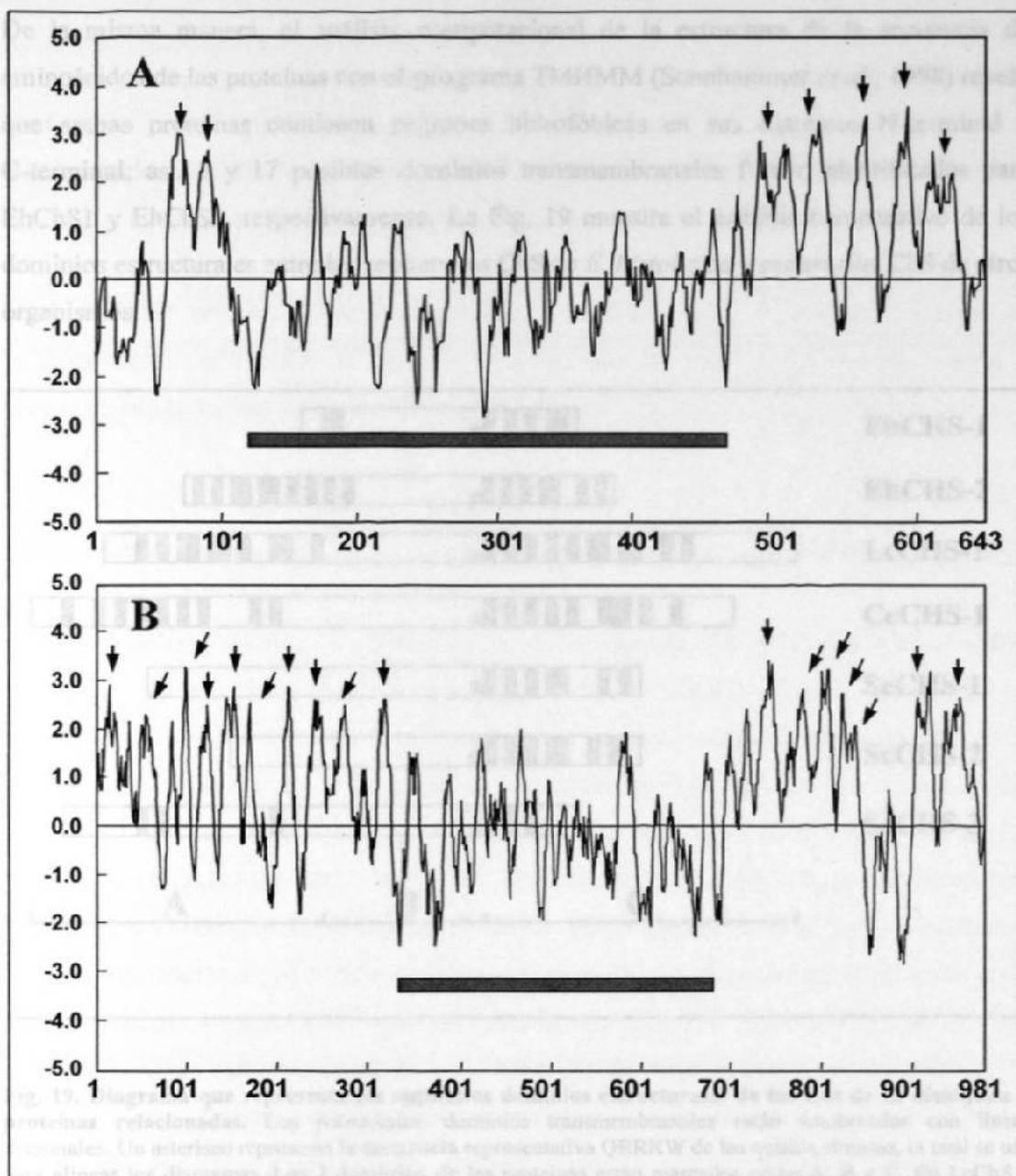


Fig. 18. Perfil de hidrofobicidad de las presuntas quitina sintasas de *E. histolytica* codificadas por los genes EhCHS1 (A) y EhCHS2 (B). Las gráficas representan los resultados del análisis que se hizo con ayuda del programa computacional Kyte and Doolittle (Software DNASIS). Las flechas indican los picos identificados como dominios transmembranales. La línea media en cada gráfica marca el límite entre la zona hidrofóbica (números positivos) y la zona hidrofílica (números negativos). Los números debajo de cada gráfica representan la posición de los aminoácidos para cada proteína. Las barras sombreadas con líneas diagonales representan la región central hidrofílica de las proteínas (aprox. 400 Aa) que es conocida como el "dominio catalítico" de las quitina sintasas.

De la misma manera, el análisis computacional de la estructura de la secuencia de aminoácidos de las proteínas con el programa TMHMM (Sonnhammer *et al.*, 1998) reveló que ambas proteínas contienen regiones hidrofóbicas en sus extremos N-terminal y C-terminal; así, 7 y 17 posibles dominios transmembranales fueron identificados para EhChS1 y EhChS2, respectivamente. La Fig. 19 muestra el análisis comparativo de los dominios estructurales entre las secuencias ChS de *E. histolytica* y secuencias ChS de otros organismos.

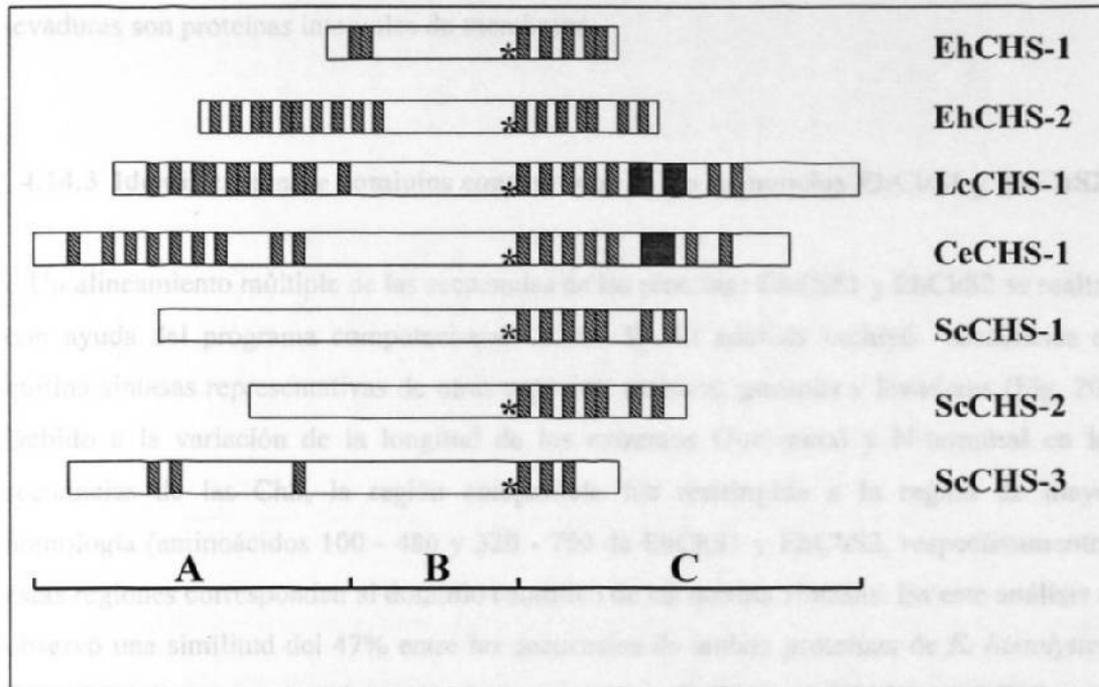


Fig. 19. Diagrama que representa los supuestos dominios estructurales de las Chs de *E. histolytica* y proteínas relacionadas. Los potenciales dominios transmembranales están sombreados con líneas diagonales. Un asterisco representa la secuencia representativa QRRRW de las quitina sintasas, la cual se usó para alinear los diagramas. Los 3 dominios de las proteínas están marcados como A, B y C. En LcChS y CeChS las supuestas regiones de α helices entrelazadas están sombreadas con líneas horizontales cruzadas (adaptado de Tellam *et al.* Eur J Biochem, 2000).

LcChS-1: ChS de *Lucilia cuprina*; DmChS-1: Gen CHS de *Drosophila melanogaster*; CeChS-1: Gen CHS de *Caenorabditis elegans*; ScChS-1, ScChS-2 y ScChS-3: Genes CHS 1, 2 y 3 de *Saccharomyces cerevisiae*; EhChS-1, EhChS-2: Genes CHS de *E. histolytica*.

En este análisis se puede observar también que la región central, la cual no contiene segmentos transmembranales, está localizada intracelularmente y que además contiene la secuencia QRRRW característica de las quitina sintasas, indicando que en esta región está probablemente el "dominio catalítico" de las ChS de *E. histolytica*.

La presencia de 10 dominios transmembranales en la región N-terminal de EhChS2, los cuales están también presentes en las proteínas de *L. cuprina* y *C. elegans*, podrían explicar los resultados del alineamiento de secuencias referentes a una mayor homología entre EhChS2 y las quitina sintasas de insectos y gusanos.

Los múltiples segmentos transmembranales predichos para las quitina sintasas de *E. histolytica* son acordes al conocimiento de que las quitina sintasas de hongos y levaduras son proteínas integrales de membrana.

4.14.3 Identificación de dominios conservados en las secuencias EhChS1 y EhChS2

Un alineamiento múltiple de las secuencias de las proteínas EhChS1 y EhChS2 se realizó con ayuda del programa computacional Clustal W. El análisis incluyó secuencias de quitina sintasas representativas de otras especies: insectos, gusanos y levaduras (Fig. 20). Debido a la variación de la longitud de los extremos C-terminal y N-terminal en las secuencias de las ChS, la región comparable fue restringida a la región de mayor homología (aminoácidos 100 - 480 y 320 - 700 de EhChS1 y EhChS2, respectivamente); estas regiones corresponden al dominio catalítico de las quitina sintasas. En este análisis se observó una similitud del 47% entre las secuencias de ambas proteínas de *E. histolytica*. Los dominios representados por las secuencias QxFEY, QRRRW y SWG, que presumiblemente están formando el sitio catalítico de estas enzimas, responsables de la unión al sustrato (Nagahashi *et al.*, 1995; Yabe *et al.*, 1998) están también presentes en las secuencias EhCHS. Además, se pueden observar otros dominios característicos identificados en las secuencias correspondientes a quitina sintasas: QxFEY, PG C/A FS, G/A EDRxL QRRRW y SWGT.

EhChS1	360	QYFEYKSNQFLAKTEENWFGMVTCLPGAFSMIR	392
EhChS2	563	QKFEYATSHWLQKPAEELLGSVLCPCGCFLLR	595
LcChS1	783	QLFEYAIGHWLQKATEHMIGCVLCSPGCFSLFR	815
CeChS1	758	QKFEYAIGHWLQKATEHMIGCVLCSPGCFSLFR	790
ScChS1	650	QNFYKMSNILDKTTESNFGFIIVLPGAFSAYR	682
ScChS2	490	QNFYKISNILDKPLESVFGYISVLPGALSAYR	522
ScChS3	879	QVFEYIISHHOAKAFESVFGSVTCLPGCFSMYR	911
		* * * * * * * * * *	
EhChS1	418	LGEDRTLITLLVEKG---WDTGYVTKAVAHTDAPFTLVGLIKORRRW	461
EhChS2	628	FGEDRWLSYLLIERG---WELKYCSITKSKSYCPTTTOEFFNORRRW	671
LcChS1	843	QGEDRWLCTLLLQRG---YRVEYSAASDAYTHCPEGFNEFFNORRRW	886
CeChS1	818	QGEDRWLCTLLLQRG---YRVEYGAASDAQTFAPGEGFNEFFNORRRW	861
ScChS1	714	LAEDRIILCFEVVTKKNCNWILKYCRSSYASTDVPERVPEFIIQORRRW	760
ScChS2	559	LAEDRIILCWELVAKRDAKWLKYLKVEATGETDVPEDVSEFISQORRRW	605
ScChS3	951	LGEDRFLSSMLKTFP-KRKQVFPKAACTIAPDKFKVLLSQORRRW	996
		* * * * * * * * * *	
EhChS1	616	TPMMYVVIPIYAVCNFDDVSWGTRG	640
EhChS2	834	IPITNILLIYSEFMHMSDVSWGTRG	858
LcChS1	1045	IPSMYLLILYSIIINLNAVSWGTRG	1069
CeChS1	1020	IPSTYVFIITLYSLINLNVITWGTRG	1044
ScChS1	949	SPSYINVLNIYAFCNVHDLSWGTKG	973
ScChS2	783	LPFTCTLQIFAFCNTHDVSWGTKG	807
ScChS3	1094	LPIWNFVLPVAYWKFDDFSWDTR	1118
		* * * * * * * * * *	

Fig. 20. Análisis de secuencias conservadas entre las proteínas ChS de *E. histolytica* y de especies relacionadas. Debido a la variación de la longitud de los extremos C-terminal y N-terminal en las secuencias de las ChS, la región comparable fue restringida a la región de mayor homología; estas regiones corresponden al dominio catalítico de las quitina sintasas. Los bloques sombreados indican aminoácidos conservados en las EhChS de *E. histolytica* con respecto a la secuencia de al menos uno de los otros organismos. Un asterisco representa la conservación total de los aminoácidos indicados, los cuales corresponden a aminoácidos determinados como esenciales para la función de la ChS2 de *S. cerevisiae*.

4.15 Resultado de los análisis en *E. invadens*

Desde hace mucho tiempo, se ha tomado a *E. invadens* como un sistema modelo para estudiar los aspectos relacionados con el enquistamiento en el género *Entamoeba*. Esto se debe principalmente a que, a diferencia de lo que sucede con *E. histolytica*, en el estudio de *E. invadens* se cuenta con modelos bien establecidos que permiten inducir el proceso de diferenciación de protozooario, bajo condiciones controladas *in vitro*. Sin embargo, no se ha logrado la identificación de los genes CHS en esta especie.

Bajo estas premisas, en el presente trabajo también se intentó la identificación y caracterización de los genes involucrados en la síntesis de quitina en este organismo.

4.15.1 Amplificación por PCR sobre el DNA genómico de *E. invadens*

Con los oligonucleótidos degenerados diseñados sobre las regiones conservadas de quitina sintasas para la amplificación de los genes CHS de *E. histolytica*, se hicieron ensayos de PCR para tratar de amplificar los fragmentos correspondientes a partir del DNA genómico de *E. invadens*.

Los ensayos de PCR se hicieron bajo las mismas condiciones de reacción que para *E. histolytica*, y como resultado en cada reacción se obtuvieron varios productos de amplificación.

Se trató de lograr la amplificación de productos específicos variando las condiciones de reacción. Se probó una gama de temperaturas de alineamiento en un gradiente de temperatura que fue de 35 a 50 °C. Los productos amplificados resultantes en cada reacción se clonaron y secuenciaron; desafortunadamente la secuencia determinada para cada uno de los productos no tiene homología con las secuencias de quitina sintasas reportadas y algunas de ellas presentan un marco de lectura abierto cuya secuencia corresponde, por homología a otras proteínas.

4.15.2 Análisis tipo Southern blot sobre el DNA de *E. invadens* usando como sonda los genes EhCHS1 y EhCHS2

Para la hibridación en los ensayos tipo Southern blot, el DNA de *E. invadens* se digirió previamente con las enzimas de restricción *Bgl* II, *Eco* RI, *Nde* I, *Asp* 700 y *Hind* III; como sonda se usó el gen completo EhCHS1 (1.9 Kb) o un fragmento de 910 pb correspondiente a la región central del gen EhCHS2 de *E. histolytica*, marcados con ³²P. Las condiciones de hibridación fueron de menor exigencia (temperatura de hibridación: 30 °C; temperatura de lavados: 40°C) que las usadas durante la hibridación en los ensayos de Southern blot con *E. histolytica*.

En la Fig. 21 se muestra el resultado de la hibridación. Se puede ver, en cada análisis, la presencia de una sola banda que presumiblemente corresponde a los genes EiCHS1 y EiCHS2, respectivamente (esto a reserva de comprobarlo con DNA digerido con un mayor número de enzimas de restricción y con una sonda específica para ChS de *E. invadens*).

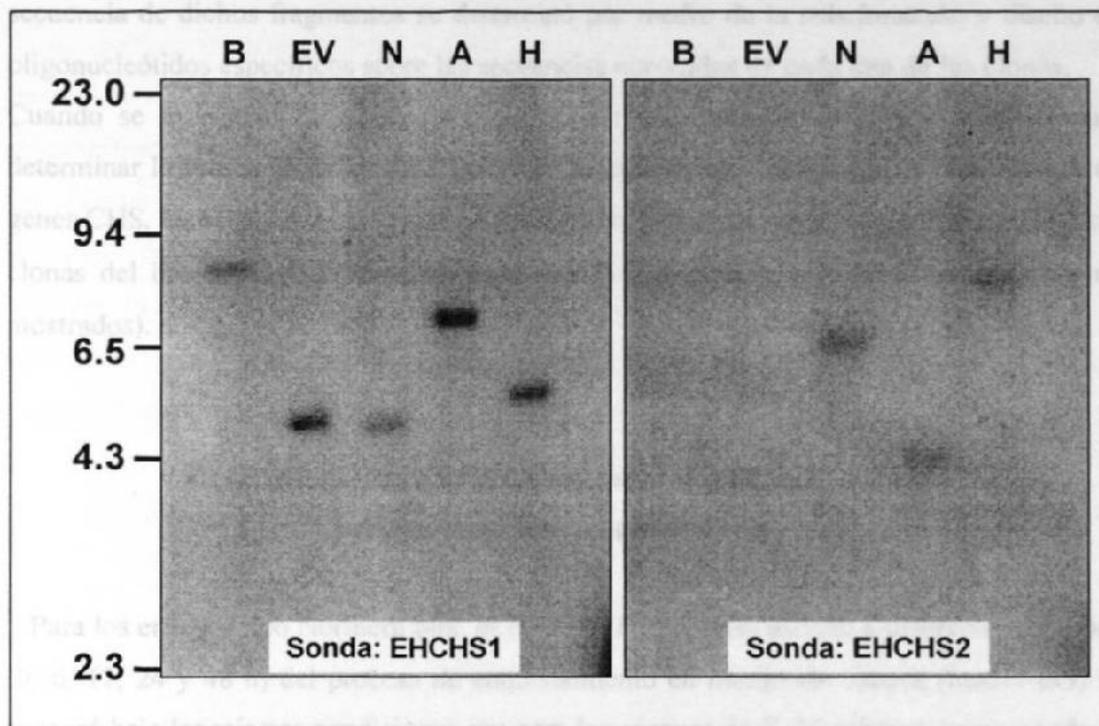


Fig. 21. Análisis tipo Southern blot de *E. invadens* usando como sonda los genes EhCHS1 y EhCHS2 de *E. histolytica*. El DNA genómico de *E. histolytica* (80 µg/línea) se digirió con cada una de las enzimas de restricción *Bgl* II, *Eco* RV, *Nde* I, *Asp* 700 y *Hind* III. Después de la separación de las muestras por medio de electroforesis, se hizo la transferencia de éstas a una membrana de nitrocelulosa. Para la hibridación se usó como sonda el gen EhCHS1 de *E. histolytica* (A) y posteriormente, un fragmento de DNA (910 pb) correspondiente al gen EhCHS2 de *E. histolytica* (B), marcados con 32 P. En el lado izquierdo de la imagen se indica en Kb, el tamaño de los marcadores de talla molecular. B= *Bgl* II, EV=*Eco* RV, N=*Nde* I, A=*Asp* 700 y H=*Hind* III.

4.15.3 Tamizaje de la biblioteca de DNA de *E. invadens* construida en el bacteriófago λ EMBL4

Ante los resultados obtenidos en los ensayos de Southern blot, se decidió realizar el tamizaje de una biblioteca de DNA de *E. invadens* construida en el bacteriófago λ EMBL4 Usando como sonda el gen completo EhCHS1 de *E. histolytica*. Las condiciones de hibridación durante el tamizaje fueron las mismas que para los ensayos tipo Southern.

Como resultado del tamizaje se aislaron 3 clonas que presentaron señal positiva durante la hibridación. A juzgar por los resultados obtenidos de la digestión con la enzima *Eco* RI, cada una de las clonas presentó un patrón de restricción diferente (datos no mostrados). Los fragmentos (aprox. 5 Kb) de dos de las clonas se clonaron en el vector pBS y la secuencia de dichos fragmentos se determinó por medio de la subclonación y diseño de oligonucleótidos específicos sobre las secuencias conocidas de cada una de las clonas. Cuando se determinó la secuencia completa de las clonas y se hizo el análisis para determinar la presencia de un ORF que correspondiera, por homología, a la secuencia de genes CHS, los resultados no fueron satisfactorios; es decir la secuencia que acarrean estas clonas del bacteriófago λ no corresponden a la secuencia esperada de CHS (datos no mostrados).

4.15.4 Análisis tipo Northern blot sobre el DNA de *E. invadens* usando como sonda el gen EhCHS1

Para los ensayos tipo Northern blot, el RNA de *E. invadens* aislado a diferentes tiempos (0, 6, 12, 24 y 48 h) del proceso de enquistamiento en medio sin lucosa (medio LG) se procesó bajo las mismas condiciones que para los ensayos de *E. histolytica*; como sonda se usó el gen EhChS de 1.9 Kb marcado con ^{32}P , bajo las mismas condiciones de hibridación y lavados que las usadas en el ensayo tipo Southern. Desafortunadamente bajo estas condiciones no se logró la detección de una señal específica que indique la expresión del gen CHS durante el enquistamiento del organismo, y se presentó una hibridación cruzada ya que la sonda reconoció el RNA ribosomal de las muestras.

Para eliminar la hibridación inespecífica se probaron condiciones mas severas de hibridación pero los resultados tampoco permitieron el reconocimiento de mRNA específicos del gen CHS en esta especie.

5 DISCUSIÓN

5.1 Discusión

Las quitina sintasas (ChS) pertenecen a una familia de β -glycosyl transferasas procesivas, que de manera interactiva transfieren residuos de diversas hexosas a un aceptor, formando así una cadena de carbohidratos (Saxena *et al.*, 1995).

Las quitina sintasas, incluyendo las proteínas nodC y la ChS1 de *S. cerevisiae* (Bulawa *et al.*, 1986) forman un subgrupo de β -glycosyl transferasas. Otras enzimas de esta familia incluyen la celulosa sintasa (Acsab) de *Acetobacter xilinum* (Saxena *et al.*, 1990), la hialuronan sintasa (HasA) de *Streptococcus pyogenes* (DeAngelis *et al.*, 1993) la alginato sintasa (Alg8) de *Pseudomonas aeruginosa* (Maharaj *et al.*, 1993) y la proteína DG42 involucrada en el desarrollo del embrión en *Xenopus laevis* (Rosa *et al.*, 1988); todas las evidencias indican que estas enzimas son proteínas integrales de la membrana plasmática.

Los primeros estudios en el establecimiento de la estructura de los genes CHS que presuntamente codifican para las enzimas denominadas quitina sintasas (Bulawa *et al.*, 1986) mostraron por medio de un análisis de hidrofobicidad que el gen CHS1 de *S. cerevisiae* consta de 3 dominios. Los dominios identificados son: un dominio hidrofílico (aprox. 300 residuos) en la región N-terminal, un dominio central (aprox. 450 residuos) y un dominio hidrofóbico (aprox. 400 residuos) presente en la región C-terminal.

Aunque el conocimiento de la estructura de las quitina sintasas está restringido a secuencias primarias deducidas a partir del código genético, se sabe que la síntesis de quitina ocurre como un proceso transmembranal en una manera vectorial en la cual el sustrato se localiza en el lado intracelular y el producto sale al exterior de la membrana, dónde se localiza el polisacárido (Valdivieso *et al.*, 1999).

A la fecha, varios genes de quitina sintasa (CHS) han sido identificados en hongos y varias otras especies de protozoarios, helmintos e insectos. La mayoría de ellos son similares a los genes ScCHS1 y ScCHS2 y son clasificados en las clases I, II y III de quitina sintasas de acuerdo con la similitud de sus secuencias. El resto están agrupados en las clases IV y V de quitina sintasa, similares a ScCHS3. Mientras que los genes CHS clase V sólo se han

identificado en hongos filamentosos y sus funciones no se conocen, los genes de la clase IV, entre los que se incluye el gen ScCHS3, están involucrados en la síntesis de la mayoría de la quitina en las células de levaduras (Valdivieso *et al.*, 1999).

Identificación de quitina sintasas

Las pruebas clásicas principales para la identificación de las enzimas responsable para la síntesis de quitina son:

- (a) Medición de la incorporación de UDP-GlcNAc en el producto de la actividad enzimática. Este producto deberá ser insoluble en agua y resistente al efecto del HCl y NaOH durante el proceso de lavado.
- (b) Similitud en las secuencias nucleotídica y aminoacídica con énfasis en la conservación de los dominios y sobretodo en la conservación de los residuos implicados en el sitio activo de la presunta enzima.

En la primera prueba, la enzima deberá ser purificada previamente ya que las preparaciones de extractos crudos podrían involucrar el trabajo combinado de complejos multienzimáticos dando como resultado una interpretación falsa de la actividad correspondiente a la enzima en cuestión.

Por otra parte, y en lo referente a la síntesis de quitina, existen también enzimas cuyo producto final es la transferencia del sustrato UDP-GlcNAc hasta un producto que no necesariamente es quitina, a decir, enzimas de la familia UDP-N-Acetil-glucosaminil-transferasas. Un ejemplo de estas enzimas lo constituyen los productos de los genes NodC, que codifican para UDPGlcNAc transferasas involucradas en la formación de lípo-quitooligosacáridos (factores Nod) responsables de iniciar la morfogénesis de los nódulos de las raíces en las leguminosas (cf. ref. Barny *et al.*, 1991).

A pesar del gran número de secuencias de hongos y levaduras depositados en los bancos de datos que han sido designados como quitina sintasas, muy pocas de estas enzimas han sido caracterizadas bioquímicamente (Tellam *et al.*, 2000).

Debido a la carencia de un modelo *in vitro* que permita el enquistamiento de *E. histolytica* en condiciones axénicas, no es posible medir la actividad de las enzimas implicadas en dicho proceso. Por lo tanto, el aislamiento, purificación y caracterización de las quitina sintasas en este protozooario patógeno como un primer y firme paso para entender los fenómenos implicados en la diferenciación, es un proceso difícil de realizar. Así, la estrategia seguida para determinar la presencia de las enzimas responsables de la síntesis de quitina fue la secuenciación de los genes que codifican para estas enzimas, a partir del DNA genómico de *E. histolytica*.

En este trabajo se describen las secuencias de dos genes (EhCHS1 y EhCHS2) que reúnen las características y requerimientos necesarios para ser considerados como los genes que codifican para las quitina sintasas en el protozooario patógeno *E. histolytica*.

Presencia de los genes EhCHS1 y EhCHS2 en el genoma de *E. histolytica*

Estudios en levaduras y otros hongos han mostrado la presencia de 3 genes responsables de la síntesis de quitina, y en *S. cerevisiae* de cuando menos otros 4 genes CHS implicados en tales procesos. Por otro lado, gracias a que la secuencia del genoma de *C. elegans* y *D. melanogaster*, ha sido determinada completamente, se ha podido determinar la presencia de solo dos genes CHS en estas especies; especies que están situadas en una posición más alta en la escala evolutiva que la de los hongos.

En el género *Entamoeba*, Das y Gillin (1992) encontraron que durante el enquistamiento de *E. invadens*, la actividad de quitina sintasa aumenta de una manera dependiente del tiempo de inducción de enquistamiento. Además, mencionan la presencia de dos formas de quitina sintasa, una forma particulada y una forma soluble, cada una de las cuales tiene características y requerimientos específicos para su funcionamiento como son: requerimiento de cationes divalentes y pH.

Recientemente nuestro grupo informó que cuando los trofozoítos de *E. histolytica* son cultivados en medio suplementado con los cationes divalentes Mg^{2+} , Mn^{2+} y Co^{2+} se induce un proceso de diferenciación, el cual se caracteriza porque las estructuras parecidas

a quistes así formadas son resistentes al 1% del detergente SDS (Campos-Góngora *et al.*, 2000) y la presencia de una gran cantidad de un polisacárido rico en GlcNAc en dichas estructuras (Said-Fernández *et al.*, 2001); posiblemente debido a la síntesis de una mayor cantidad de quitina como resultado de la activación de la o las enzimas responsables (quitina sintasas) por efecto de la presencia de los cationes en el medio de cultivo .

Se ha descrito ampliamente que los metales divalentes Mg, Mn y Co actúan como cofactores de las quitina sintasas de hongos y levaduras (para una revisión ver Ruíz-Herrera, 1982). Cada una de las quitina sintasas analizadas requieren la presencia de uno o la combinación de dos de estos cationes para incrementar su actividad, sin que hasta el momento se haya descrito la necesidad de la presencia de los 3 cationes en conjunto para incrementar la actividad de quitina sintasa alguna en ensayos *in vitro*.

Bajo estas premisas, no es sorprendente la presencia de los dos genes CHS en el genoma de *E. histolytica*

Los análisis de Southern blot usando como sondas los genes EhCHS1 y EhCHS2 muestran patrones de hibridación diferentes para cada uno de los genes cuando el DNA de *E. histolytica* fue digerido con las mismas enzimas de restricción y se aplicaron exactamente las mismas condiciones de hibridación en cada uno de los experimentos realizados.

Estos resultados indican que las condiciones de hibridación son suficientemente estrictas como para evitar una hibridación cruzada de alguna de las sondas probadas con los genes CHS, reduciéndose así la posibilidad de la presencia de otro(s) genes CHS en el genoma de *E. histolytica*.

En posteriores "tamizajes electrónicos" del banco de datos TIGR-Entamoeba usando como sonda las secuencias aminoacídicas deducidas a partir de la secuencia de los EhCHS1 y EhCHS2 no se encontraron otras secuencias homólogas a dichos genes. Lo anterior proporciona evidencias que permiten predecir la presencia únicamente de los 2 genes identificados (EhCHS1 y EhCHS2) sin que existan otro u otros posibles genes CHS en el genoma de *E. histolytica* o cuando menos en las secuencias depositadas en el banco de datos hasta el momento del análisis.

De la misma manera, los resultados de los análisis tipo Southern blot usando como sonda solo las regiones más conservadas correspondientes al dominio central (región catalítica de

la enzima) de sendos genes, no muestran evidencia de la presencia de otros genes CHS, corroborando así los resultados del análisis virtual.

Los ensayos de hibridación con las sondas mencionadas sobre el DNA de *E. histolytica* separado por electroforesis de campos pulsados (*pulsed field gel electroforesis*), mostraron que se trata de genes localizados en cromosomas distintos (datos no mostrados). Así, tomando como referencia el trabajo de Willhoeft y Tannich (1999) en el que describen el cariotipo electroforético de *E. histolytica*, los resultados indican que el gen EhCHS1 se localiza en el grupo de unión a genes número 5 mientras que el gen EhCHS2 se localiza en el grupo 8.

En el análisis de las regiones ocupadas por los genes EhCHS se encontró que los genes que flanquean a EhCHS1 son diferentes a aquellos que flanquean a EhCHS2. Estos resultados son una fuerte evidencia para suponer que, si bien las quitina sintasas de *E. histolytica* derivan de un ancestro común, la divergencia de ambos genes tuvo lugar en etapas tempranas de la evolución.

Análisis comparativo y estructural de las proteínas

El análisis de la estructura primaria de las proteínas codificadas por los genes EhCHS1 y EhCHS2, con el programa computacional TMHMM (Sonnhammer *et al.*, 1998), permitió identificar 3 regiones características de las quitina sintasas. Ambas proteínas contienen regiones hidrófobas dentro de los extremos amino-terminal y carboxi-terminal y una región central hidrofílica. Dentro de las regiones hidrofóbicas de cada estructura se identificaron secuencias que presuntamente corresponden a segmentos transmembranales.

La presencia de 10 dominios transmembranales en la región N-terminal de EhChS2, los cuales están también presentes en las proteínas deducidas de los genes LcCHS1 de *L. cuprina* y CeCHS1 de *C. elegans* (Tellam *et al.*, 2000), explica los resultados del alineamiento de las secuencias con respecto a una mayor homología entre EhCHS2 y las quitina sintasas de insectos y gusanos descritas hasta el momento.

Aunque la cantidad de segmentos transmembranales es diferente en las dos ChS de *E. histolytica*, cabe señalar que no hay una estructura consenso de la topología general de

estos dominios debido principalmente a la variación de la longitud de las secuencias ChS reportadas, variación que se localiza principalmente en los extremos de las secuencias.

La presencia de estos segmentos transmembranales sugiere fuertemente que las presuntas quitina sintasas de *E. histolytica* son proteínas integrales de membrana. Lo cual es acorde con el conocimiento de que las quitina sintasas ChS1, ChS2 y ChS3 de *S. cerevisiae* se encuentran formando parte integral de la membrana (Cid *et al.*, 1995).

En los modelos establecidos para la localización de las enzimas responsables de la síntesis de quitina (Tellam *et al.*, 2000), las enzimas se localizan ya sea en la membrana plasmática o dentro de estructuras intracelulares llamadas quitosomas (debido a que fueron descritas por primera vez en hongos). En el primer modelo, se supone que la síntesis de quitina se realiza en el lado citoplásmico (lugar donde se localiza el dominio catalítico de la enzima y donde ésta tiene acceso directo al sustrato (UDP-GlcNAc), y la translocación del polímero de quitina sintetizado a través de la membrana es facilitada por la presencia de los múltiples segmentos transmembranales los que probablemente estarían formando un canal que atraviesa la membrana y a través del cual el polímero de quitina es llevado al exterior. El segundo modelo supone que estas enzimas se localizan en la membrana que rodea a los quitosomas. En este modelo, el dominio catalítico (región central hidrofílica) de las quitina sintasas se encuentra en el interior de las vesículas, donde se forma el polímero de quitina. El transporte del sustrato(UDP-GlcNAc) desde el citoplasma al interior de las vesículas involucraría a los segmentos transmembranales (o probablemente a otras proteínas).

Tellam y col. (2000) proponen que la diferencia en el número de segmentos transmembranales en las quitina sintasas de insectos y gusanos con respecto al de levaduras, sugiere que estas enzimas podrían estar interactuando con la membrana plasmática de una manera diferente a como lo hacen las quitina sintasas de levaduras. Estas diferencias en la arquitectura de las quitina sintasas podrían reflejar los diferentes tipos de quitina que son producidos en levaduras y en la cutícula de insectos.

Debido a la similitud estructural de las presuntas quitina sintasas de *E. histolytica* con las ChS de *L. cuprina*, *D. melanogaster* y *C. elegans* descritas, podemos pensar que estas propuestas serían aplicables también para tratar de entender el proceso de síntesis de quitina en este protozoario patógeno.

Además de la presencia de los dominios transmembranales en ambos extremos de las presuntas quitina sintasas de *E. histolytica*, también se identificó una región central

hidrofílica cuya secuencia presenta el mayor porcentaje de similitud con respecto a las regiones centrales de otras quitina sintasas. Dicha región se ha denominado como la región catalítica de la enzima y sobre ella se pueden localizar los dominios estructurales de las quitina sintasas. Este dominio central contiene la secuencia QRRRW altamente conservada y característica de las quitina sintasas de hongos y levaduras (Saxena *et al.*, 1995; Cid *et al.*, 1995; Bowen *et al.*, 1992; Coss *et al.*, 1998).

Además, los residuos que conforman las regiones conservadas EDR, QRRRW (Nagahashi *et al.*, 1995) y WGT (Yabe *et al.*, 1998) identificados por medio de análisis mutacional como esenciales para la actividad de quitina sintasa en ScChS2, están también conservados en ambas proteínas EhChS.

Es interesante mencionar que el análisis comparativo de los residuos correspondientes a las regiones EDR y QRRRW en las enzimas NodC de *Rhizobium sp*; DG42 de *Xenopus laevis*, hialuronan sintasa de *Streptococcus pyogenes* y celulosa sintasa de *Acetobacter xylinum*, muestra que en la secuencia de residuos Glu-Asp-Arg (EDR) y Gln-Arg-Arg-Arg-Trp (QRRRW) solamente Asp en EDR, Gln, la tercera Arg y Trp en QRRRW están conservados en estas enzimas y aunque la actividad catalítica de la proteína DG42 no ha sido establecida, se sabe que las enzimas hialuronan sintasa y celulosa sintasa catalizan la polimerización de oligosacáridos con enlaces β -1,4 usando UDP-azúcar como sustrato (cf. ref. Nagahashi *et al.*, 1995).

Por otra parte, el dominio WGT identificado en la región conservada *con2* de ScChS2 (Yabe *et al.*, 1998) no está presente en las proteínas NodC bacteriana y DG42 de *X. laevis*, las cuales son también conocidas como GlcNAc transferasas. Por lo tanto, cabe suponer que en las proteínas NodC y DG42 la estructura primaria de un dominio que es funcionalmente equivalente al dominio WGT es tal vez diferente de aquel de las quitina sintasas (Yabe *et al.*, 1998).

Así, quedan establecidas las diferencias que existen en los dominios considerados como cruciales para la actividad catalítica de las β -glucosiltransferasas y la presencia de potenciales residuos catalíticos (xDx, QxxRW), con respecto a enzimas consideradas como “verdaderas” quitina sintasas, donde la presencia de las secuencias EDR, QRRRW y WGT se muestran como características exclusivas de estas enzimas; características que están presentes en las presuntas ChS de *E. histolytica*, una evidencia más de que la

secuencia de los genes determinados en este trabajo corresponden a genes que codifican para las enzimas quitina sintasas del protozoario en cuestión.

Se ha determinado que el genoma de *E. histolytica* sigue un patrón de organización poco usual, donde las regiones 5' y 3' que flanquean las secuencias codificantes son muy cortas (menos de 1500 pb). En estas regiones deberán estar incluidas las secuencias promotoras, señales de inicio y terminación de la transcripción de genes contiguos así como elementos regulatorios. Por otra parte, no se sabe si la transcripción en *E. histolytica* se realiza monocistricamente (como en la mayoría de los eucariotes) o policistricamente (como en especies de kinetoplástidos (Bruchhaus *et al.*, 1991), aunque los resultados de Bruchhaus y col. (1991) muestran evidencia de que al menos el gen de la lectina de 170 kDa es transcrito de manera monocistrica. Sin embargo, los resultados de Gangopadhyay y col. (1997) muestran que las regiones no traducidas (UTR) del mRNA del gen EhPAK y la UTR 5' del mRNA del gen EhMCM3 son transcritos a partir de un segmento genómico común de 40 pb. Significando el primer reporte de un gen amibiano que está unido físicamente a un segundo gen de tal manera que sus transcritos están traslapados y no hay regiones intergénicas no traducidas entre los dos genes.

La comparación de las regiones que flanquean los extremos 5' de los genes que codifican para proteínas en *E. histolytica* permitió identificar la presencia de 3 elementos conservados en la región promotora. Una de las 3 secuencias conservadas (GTATTTAAAG/C) se localiza a -30 pb del inicio de la transcripción, el segundo elemento (AAAAATTCA) se traslapa con el sitio de inicio de la transcripción y el tercer elemento (GAAC) se encuentra en distintas posiciones entre los dos primeros elementos.

Por medio de análisis posicional se demostró que la región a -30 pb controla el sitio de inicio de la transcripción (caja TATA) y se ha mostrado que este elemento está unido a una proteína, presuntamente una proteína de unión a la caja TATA (*TATA binding protein* = TBP) la cual es significativamente diferente de la TBP de eucariotes superiores y de la TBP del protozoario *Plasmodium falciparum*.

Se ha propuesto que tanto el elemento AAAAATTCA como GAAC controlan el sitio de inicio de la transcripción y que GAAC es también importante para la eficiencia del inicio de la transcripción (Ramakrishan y Petri, 2000)

La presencia de elementos TATA y elementos que controlan el inicio de la transcripción inusuales así como la presencia de un tercer elemento, indican que la maquinaria de la transcripción basal de *E. histolytica* difiere significativamente de aquella de eucariotas superiores y aún, con la de otros protozoarios (Singh *et al.*, 1997). Lo cual no es sorprendente si se considera que los promotores virales de mamíferos no funcionan en *E. histolytica*, de la misma manera que los promotores amibianos no funcionan en células de mamífero (Purdy *et al.*, 1994).

En el caso de los genes EhCHS, los ensayos tipo RACE permitieron identificar en ambos genes, la presencia de los elementos iniciadores GAAAG; y en el caso del gen EhCHS2 se identificó también la presencia de otros presuntos elementos considerados como sitios de inicio de la transcripción. Hacia el extremo 3' de los genes se identificó la presencia de la cola de poli-A. La presencia de los elementos identificados nos permiten concluir que ambos genes son transcritos de manera monocistrónica y que la transcripción de sendos genes está dirigida por el elemento iniciador GAAAG.

Análisis de las proteínas recombinantes

Para probar la sobre-expresión de la proteína recombinante presuntamente codificada por el gen EhCHS1, este se clonó en dos vectores de expresión diferentes y la sobre-expresión se probó en 3 diferentes cepas de *E. coli*. Se comprobó (determinando la secuencia de las clonas) que no hay mutaciones en el DNA clonado; sin embargo los resultados de la inducción no fueron positivos, es decir, en los sistemas bacterianos no se logró inducir la sobre-expresión de las proteínas recombinantes. Una posible explicación de estos resultados en los sistemas de expresión bacterianos es que la proteína sea tóxica para *E. coli* y que por lo tanto no se logra la sobre-expresión de la proteína recombinante. Para apoyar esta suposición se realizó la búsqueda de bibliografía referente a la expresión de quitina sintasas recombinantes sin que pudiésemos obtener información acerca de su expresión en sistemas bacterianos. Las alternativas que se consideraron para solucionar este problema fue probar en otros sistemas de expresión: baculovirus-células de insecto, levaduras o probar en un sistema de expresión *in vitro*. Se decidió por este último sistema y se hicieron ensayos de transcripción-traducción *in vitro* usando un sistema de lisado de reticulocitos de conejo libre de células (SpeedRead Lysate, Novagen), sin que se obtuvieran resultados satisfactorios (datos no mostrados).

Los factores medio-ambientales juegan un papel importante en la regulación de la expresión de proteínas implicadas en la patogenicidad de *E. histolytica* (para una revisión ver Ramakrishan y Petri, 2000) y es razonable suponer que, de manera análoga a otros sistemas bien caracterizados de procariotes y eucariotes superiores, el control primario sobre la capacidad invasiva del parásito es ejercida al nivel de la expresión génica. Variación en los niveles de mRNA específicos se han observado como respuesta a cambios en las condiciones de crecimiento; la expresión del gen de la superóxido dismutasa es inducida por radicales superóxido; el gen que codifica para la alcohol deshidrogenasa (EhADH2) es inducido por etanol; la expresión del gen de actina es autorregulada; y se ha mostrado que la expresión del gen de la ferridoxina es sensitiva al crecimiento del organismo. La adquisición de resistencia a emetina se ha demostrado que está relacionada a un incremento de la expresión del mRNA de la glicoproteína P. De la misma manera, los procesos de enquistamiento estudiados usando el modelo de enquistamiento de *E. invadens* demuestran que los trofozoítos de *E. invadens* enquistándose presentan niveles elevados de ciertos mRNA, incluyendo aquellos de las quitinasas (de la Vega *et al.*, 1997). La expresión diferencial puede por lo tanto ser un factor significativo en el control de la patogenicidad del trofozoíto, incluyendo también los procesos de invasión, enquistamiento, desenquistamiento y la adaptación al medio ambiente aeróbico de los tejidos humanos después de la invasión.

Tomando en cuenta que los requerimientos/mecanismos traduccionales de *Entamoeba* son muy diferentes a los presentes tanto en células procariotas como en eucariotas, es probable que tanto los sistemas bacterianos como los elementos regulatorios presentes en el sistema de reticulocitos de mamíferos usados en nuestro análisis no sean suficientes como para dirigir la expresión de las quitina sintasas de *E. histolytica* en las condiciones probadas.

Considerando lo anterior, se decidió realizar la transfección de trofozoítos de *E. histolytica* para posteriormente inducir la expresión de las proteínas ChS. Para la transfección se usaron los sistemas de transfección estable con los vectores plasmídicos Neo-Cass (Hamann *et al.*, 1995) y Hygtet R O Cass (Hamann *et al.*, 1997) los cuales están bajo la acción del promotor del gen de lectina (Lec 485) y secuencias 5' y 3' no traducidas del gen de actina de *E. histolytica*. Además, dichos vectores acarrean también las secuencias de los genes que confieren resistencia a los antibióticos G 418 (un análogo de neomicina) e

higromicina, respectivamente. El vector plasmídico Hygtet R O Cass es inducible ya que acarrea los elementos regulatorios del operón de resistencia a tetraciclina de *E. coli*. Este sistema de expresión procariota se caracteriza por la unión de un represor Tet de respuesta a tetraciclina a una secuencia particular del operador, resultando en la represión de los genes que están dirigidos por promotores que se encuentran bajo la influencia de esta secuencia operadora. Subsecuentemente, la unión del represor puede ser abolida por la adición de concentraciones no tóxicas de tetraciclina; llevando a la expresión controlada de los genes correspondientes.

Como un primer paso para determinar el éxito de la transfección, se hizo la selección *versus* el antibiótico correspondiente y posteriormente el análisis tipo Northern blot. En este análisis se determinaron transcritos (mRNA) correspondientes a los genes EhCHS1 y EhCHS2; y, en las amibas transfectadas con el vector Hygtet R O Cass modificado con sendos genes EhCHS, fue posible el control eficiente de la transcripción, regulada ésta por tetraciclina. Sin embargo, debido a que los anticuerpos generados no reconocieron de manera específica a las proteínas EhCHS, no fue posible la detección de dichas proteínas en las amibas transfectadas.

Análisis Northern en trofozoítos inducidos al enquistamiento

Tomando en cuenta que la síntesis de quitina deberá tener lugar en el momento en que se inicia el proceso de diferenciación (enquistamiento) de *E. histolytica* para, de esta manera, proporcionar al organismo los elementos necesarios para estructurar la pared que le conferirá resistencia a condiciones adversas, sería fácil suponer que la transcripción y/o traducción de los elementos implicados deberá también tener lugar a este tiempo. Sin embargo, las evidencias que se presentan a continuación podrán ayudarnos a entender las posibles razones por las cuales no se detectó la presencia de cantidades incrementadas de mensajeros (mRNA) en los análisis tipo Northern blot y de RT-PCR en *E. histolytica* cuando esta fue inducida a un proceso de diferenciación por efecto de la adición de cationes al medio de cultivo.

Los estudios más avanzados que nos permiten conocer el proceso de síntesis de quitina se han realizado en la levadura *S. cerevisiae*. En este organismo adoptado como modelo se

han descrito 3 genes CHS que codifican para 3 proteínas que funcionan como subunidades catalíticas de las quitina sintasas. Además, se han podido identificar otros 4 genes CHS (CHS4 a CHS7) implicados en la regulación de la unidad catalítica de ChS3p, sin que a la fecha se hayan identificado proteínas con una función homóloga para las subunidades catalíticas ChS1p y ChS2p. Por otra parte, el hecho de que en este modelo cada ChS tiene una función celular diferente sugiere que la actividad de cada enzima debe ser espacial y temporalmente regulada; y aunque las ChS 1 y ChS 2 de *S. cerevisiae* se encuentran en forma de zimógeno, se ha propuesto que ChS I y ChS II son reguladas tanto en el nivel transcripcional (Pammer *et al.*, 1992) como en el nivel postraduccional (Choi *et al.*, 1994; Uchida *et al.*, 1996).

De la misma manera, puede ser que las quitina sintasas de *E. histolytica* sean reguladas en el nivel postraduccional para lo cual podríamos suponer que las enzimas se encuentran de manera constitutiva, también en forma de zimógeno. Lo anterior puede ser avalado por los resultados del análisis de RT-PCR donde se determinó que la cantidad de mRNA correspondiente a la EhChS1 es equivalente en las muestras probadas, sin importar el grado de diferenciación del organismo.

Nuevamente, la carencia de datos referentes al enquistamiento de este organismo nos conducen a considerar los resultados obtenidos en *E. invadens* donde se demostró que ninguna de las formas de la quitina sintasa, particulada o soluble, se activa con tripsina, lo cual sugiere que esta enzima no se encuentra en forma de zimógeno en estos parásitos. La actividad enzimática de la quitina sintasa es inhibida por UDP, UDP-Glucosa y UDP-GalNAc pero no por Polioxina D o Nikkomicina (Das and Gillin, 1991). Se ha demostrado que Polioxina D y Nikkomicina son inhibidores específicos de la mayoría de ChS de hongos, insectos y crustáceos probadas hasta ahora. Estos compuestos funcionan como inhibidores por un mecanismo de inhibición competitiva, esto es, por competencia con el sustrato GlcNAc. El hecho de que estos compuestos no tengan actividad sobre las ChS de *E. invadens* nos conducen a pensar en las diferencias, tanto estructurales como de necesidades de activación e inhibición, de las ChS del género *Entamoeba* con respecto a las ChS de otros organismos, principalmente hongos y levaduras.

Sin embargo, el hecho de que la actividad de las quitina sintasas de *E. invadens* no se vea incrementada después del tratamiento con tripsina, no indica necesariamente que las

enzimas se encuentren o no, en forma de zimógeno, ya que como se discutirá más adelante, es probable que la activación de estas enzimas dependa de factores (activadores) presentes dentro del mismo entorno de la enzima, fuertemente acopladas a ésta y formando parte del complejo multienzimático responsable de dirigir la síntesis del polisacárido.

Como ya se mencionó anteriormente, en *S. cerevisiae* además de las proteínas ChS1, ChS2 y ChS3 consideradas como las subunidades catalíticas del complejo de síntesis de quitina, los productos de otros 4 genes (CHS4, CHS5, CHS6 y CHS7) han mostrado ser requeridos para regular la actividad de ChS III (Bulawa, 1993). Chs4p es el activador directo de la actividad de ChS III y responsable del anclaje de Chs3p al anillo de septina durante la formación del septo. Chs5p está involucrado tanto en el transporte de Chs3p en vesículas especializadas y Chs7p regula la actividad de ChS III controlando el transporte de Chs3p desde el retículo endoplásmico.

Los resultados de Trilla y col. (1999) demuestran que CHS7 es el único gen cuya transcripción se ve incrementada bajo todas las condiciones en las cuales la síntesis de quitina en *S. cerevisiae* se incrementa.

De esta manera queda demostrado que la regulación transcripcional de CHS3, el gen que codifica para la subunidad catalítica de ChS III no es el mecanismo que controla la actividad de ChS III (Choi *et al.*, 1994; Chuang y Schekcman, 1996; Coss *et al.*, 1998); y que dicha función depende principalmente del transporte y localización apropiados de Chs3p (Trilla *et al.*, 1999), función que cumplen las proteínas producto de los genes CHS4 y CHS7 de *S. cerevisiae*.

Un ejemplo más de la presencia de proteínas auxiliares lo constituye la presencia de sbe2p y sbe22p. La delección de los genes correspondientes a estas proteínas conlleva a defectos en la estructura de la pared celular y los experimentos de inmuno-fluorescencia revelan que hay una localización errónea de la proteína Chs3p involucrada en la síntesis de quitina (Santos y Snyder, 2000).

Estas evidencias sugieren que además de las proteínas codificadas por los genes CHS, existen otro tipo de proteínas implicadas directamente en el transporte de Chs3p (unidad funcional de la ChS 3) hasta la periferia celular, lugar donde finalmente es capaz de llevar a cabo su función.

De la misma manera, también se han descrito proteínas auxiliares en otros sistemas modelo de síntesis de polisacáridos como β -(1-3) glucanas donde las proteínas Rho1p (pequeña subunidad de 26 kDa) y Fks1p (una proteína hidrofóbica grande) son requeridas simultáneamente para la síntesis de glucanas. No hay pruebas contundentes de que las proteínas Fks1p o su homóloga Fks2p contengan el sitio catalítico para la síntesis de glucanas pero ellas son los únicos candidatos para tal función. Su participación en la reacción de síntesis está apoyada por la co-inmunoprecipitación de Fks1p y Rho1p. Se ha propuesto para Rho1p el papel de activador de Fks1p debido a su capacidad de actuar como controlador del apagado o encendido del sistema ya que estas proteínas son activas cuando se unen a GTP e inactivas cuando se unen a GDP (para una revisión ver Cabib *et al.*, 2001).

Con esto en mente, no es difícil imaginar que el complejo sistema de síntesis de quitina en *E. histolytica* requiere también la presencia de proteínas auxiliares implicadas de manera directa o indirecta en la activación de las quitina sintasas.

Es interesante hacer notar que en los ensayos tipo Northern blot con RNA de *E. invadens* inducida al enquistamiento por privación de glucosa (en medio LG) y usando como sonda fragmentos de la región catalítica de los genes EhCHS de *E. histolytica*, tampoco se observó la expresión de mRNA que pueda ser reconocido de manera específica por las sondas EhCHS en diferentes tiempos del proceso de enquistamiento, en las condiciones de hibridación usadas. Mientras que en los resultados de la hibridación en los análisis tipo Southern blot, bajo las mismas condiciones de hibridación, se observan bandas específicas al reconocimiento por parte de sondas, indicando que dichas sondas probablemente están reconociendo secuencias de DNA específicas de las quitina sintasas de *E. invadens* sin que se observe una hibridación cruzada con las sondas.

Es probable que las diferencias entre las secuencias de los genes CHS de *E. invadens* y *E. histolytica* no permitan usar los fragmentos de los genes EhCHS como sonda en condiciones que nos permitan la hibridación específica con los mRNA de la(s) quitina sintasa(s) de *E. invadens*; o, que las quitina sintasas de *E. invadens* (como probablemente también sucede con las de *E. histolytica*) se encuentran de manera constitutiva en el organismo en forma de precursores inactivos de la enzima, y que sean reguladas en el nivel postraducciona.

Sin embargo, una posible explicación para estas observaciones es la presencia en estos organismos de otra u otras proteínas que tengan un papel de cofactores o activadores para las quitina sintasas como sucede con aquellas codificadas por los genes CHS4, CHS5, CHS6 y CHS7 de *S. cerevisiae*, las cuales son requeridas como subunidades reguladoras de la actividad de la quitina sintasa III, aunque aparentemente ninguna de ellas está involucrada en la expresión de CHS3, y que las proteínas codificadas por los genes cuyas secuencias han sido determinadas (EhCHS1 y EhCHS2) solo sean la parte estructural de las quitina sintasas en un complejo multienzimático requiriendo para su función la presencia o activación de proteínas iniciadoras del proceso (análogas a la glucogenina y a la presunta quitogenina -ver más adelante-) o el transporte adecuado hasta el sitio en el cual realizarán su función.

Importancia y función de los cationes en el enquistamiento de *E. histolytica*

Las glucosil transferasas son enzimas que catalizan la transferencia de residuos de azúcar desde un sustrato donador activado a una molécula aceptora. La molécula donadora es frecuentemente un nucleótido de azúcar difosfato pero puede ser también un azúcar fosfato o un disacárido. La molécula aceptora en la mayoría de los casos es una cadena creciente de carbohidratos, pero puede ser también un acarreador lipídico, o alguno de una variedad de compuestos tales como esteroides, bilirubina, flavanonas, carotenoides, proteínas, etc., que son covalentemente modificadas por glicosilación (Hundle *et al.*, 1992).

En las quitina sintasas, el sustrato obligado es UDPGlcNAc y la presencia de Mg^{2+} , Mn^{2+} y Co^{2+} (dependiendo de la especie de la enzima) es indispensable para su actividad. La significancia de este requerimiento no ha sido elucidado, pero presumiblemente refleja un papel esencial de un cation metal divalente en la unión de la quitina sintasa al sustrato (para una revisión ver Merz *et al.*, 1999).

Aunque como se discutió anteriormente, el sistema de síntesis de quitina de *S. cerevisiae* representa el modelo más completo estudiado a la fecha, sigue habiendo puntos que no están completamente entendidos en el proceso de síntesis de quitina; a decir, no es claro aún la presencia o no de un polipéptido iniciador que cumpla la función de sustrato aceptor

iniciador de la reacción y sobre el cual la quitina sintasa se une de manera covalente para cumplir su función.

No se sabe si al supuesto complejo quitina sintasa-sustrato iniciador y al sitio de unión a UDP-GlcNAc implicados en los eventos de elongación de la cadena de quitina les corresponden distintas regiones del mismo polipéptido (polipéptido de quitina sintasa multienzimático) o están situados en dos diferentes polipéptidos estrechamente asociados (complejo multienzimático) (Merz *et al.*; 1999).

Debido a que el conocimiento de la estructura molecular de las ChS es limitado, el tipo de unión a GlcNAc generado por esta presunta activación o reacción inicial, el sitio en el cual esto tiene lugar y los mecanismos que causan la formación de la cadena de quitina, solo pueden ser explicados de una manera especulativa. Es necesario por lo tanto volver la vista hacia la síntesis de glucógeno dado que esto representa la única polisacárido sintasa para la cual hay más información disponible, en lo concerniente a los mecanismos de reacción.

El sistema de síntesis de glucógeno como un modelo para entender el proceso de síntesis de polisacáridos y enzimas implicadas

La síntesis de glucógeno involucra un evento de iniciación específico, mediado por una proteína especializada llamada glicogenina. La glicogenina sufre un proceso de autoglicosilación para generar un oligosacárido iniciador, el cual, cuando es suficientemente largo, soporta la acción de la glucógeno sintasa para elongar la cadena del polisacárido dando como resultado final la formación de glucógeno (Cao *et al.*, 1993).

Así, la síntesis eficiente de glucógeno requiere la acción secuencial de dos UDPGlc-transferasas: una glucógeno iniciador sintasa denominada glicogenina (GG; EC 2.4.1.186) y glucógeno sintasa propiamente dicha (GS; EC 2.4.1.11) ambas son subunidades del complejo glucógeno sintasa.

La glicogenina (GG) es una proteína auto glicosilante que inicia la síntesis de glucógeno. La glicosilación se efectúa generando primero una unión glicosil-tirosina entre el residuo de azúcar y la tirosina ubicada en la posición 194 de la secuencia de Aa (para la secuencia de Aa. ver Campbell y Cohen, 1989); y después adicionando sucesivamente más unidades

de glucosa para finalmente generar un oligómero de unidades de glucosa (en promedio 8 residuos) con enlaces α -1,4 unido a la enzima. Es sobre esta estructura aceptora que la glucógeno sintasa (GS) realiza su función de elongación de cadena para dar como resultado la formación del polisacárido (para una revisión ver Merz *et al.*, 1999).

La reacción de la GG tiene otras propiedades que claramente la distinguen de la catalizada por GS: (i) La actividad de GG se realiza solamente en presencia de concentraciones altas de varias sales (GS no es activa en tales condiciones); (ii) El pH óptimo de GG es más alto que aquel de GS (aprox. 8.5 vs. 7.0); (iii) La primera transferencia de glicosil es dependiente de Mn^{2+} , mientras los siguientes eventos de elongación proceden con Mg^{2+} (GS no es activada por Mn^{2+} , y de hecho no es afectada por ningún cation); (iv) GG no es activada por UDP-piridoxal (un marcador de afinidad específico para GS); (v) GG no es activada por glucosa-6-fosfato, un potente efector de GS; (vi) La K_m (UDPGlc) de GG es casi 10^3 veces más pequeña (esto significa que a concentraciones bajas de sustrato solamente el componente GG del complejo GS es operativo y por lo tanto genera un pool de almacenamiento de sustrato GS iniciador que está disponible para la síntesis de glucógeno cuando las condiciones sean favorables para ello (esto es, concentraciones altas de UDPGlc y efector).

Cuatro líneas de argumento pueden llevarnos a sugerir que una situación correspondiente a aquella del sistema GG/GS podría existir en una manera análoga para el sistema de síntesis de quitina: (1) La cinética de la reacción de quitina sintasa que se efectúa en la ausencia de GlcNAc; (2) Las propiedades diferenciales de GG vs. GS que se ha descrito que ocurren de manera similar entre preparaciones de quitina sintasa diferentes; (3) una función análoga de iniciador de la proteína DG42, la cual cataliza la síntesis de oligosacáridos en la formación de ácido hialurónico (conteniendo un residuo de quito-oligosacárido en su extremo reducido); y (4) la evidencia acumulada en años recientes de que una proteína iniciadora podría ser una propiedad fundamental no solo del sistema de síntesis de glucógeno sino de la síntesis de polisacáridos en general (cf. ref. Merz *et al.*, 1999).

La hipotética enzima que podría generar quito-oligosacáridos unidos covalentemente como un iniciador para la quitina sintasa *sensu stricto* sería referida como una **quitogenina**.

De la misma manera cabe señalar que la proteólisis limitada estimula fuertemente la actividad de quitina sintasa. Esto indica que la mayor parte de la mezcla de quitina sintasas de una célula podrían estar presentes en forma de una proenzima clásica previo a la

deposición del producto en el tiempo y sitio apropiados. El ejemplo más sobresaliente en el presente contexto puede ser la ChS III de *S. cerevisiae*, la cual se considera generalmente como una enzima no zimogénica y presenta una preferencia de Co^{2+} sobre Mg^{2+} como el cation activador. Sin embargo, su actividad se incrementa de manera sustancial si la preparación albergada en la membrana (extraída con detergentes), es tratada con tripsina en la presencia de UDPGlcNAc antes de la estimulación alostérica de síntesis de quitina por GlcNAc. Este tratamiento con proteasas también guarda una relación con el requerimiento de cationes del sistema de síntesis de quitina en cuestión, puesto que la actividad dependiente de tripsina es favorecida por un incremento de la concentración de Mg^{2+} y aparentemente ocurre una reversión en la preferencia de metales en la reacción. En vista de las razones 1- 4 que se mencionan más adelante, se debe considerar la posibilidad de que la estimulación de ChS III mediada por tripsina y Mg^{2+} no concierne directamente a ChS III sino a una verdadera UDP-N-acetil-glucosaminil-transferasa (UDPGlcNAc transferasa) que se encuentra fuertemente asociada a ChS III, y que es en realidad la responsable de generar un producto que promueve eficientemente la proporción total de síntesis de quitina; como ya se mencionó esta enzima hipotética recibiría el nombre de quitogenina.

- (1) Existen algunas analogías sugerentes entre los sistemas de síntesis de quitina y glucógeno.
- (2) ChS III es un complejo multienzimático (Choi *et al.*, 1994; Trilla *et al.*, 1997).
- (3) Algo de la UDPGlcNAc provista en el paso de pre-incubación con tripsina (en la ausencia de GlcNAc indiscutiblemente está reaccionando y por lo tanto es incorporada en un producto insoluble en ácidos (representando la fase 1 de la reacción general del sistema de quitina sintasa).
- (4) Las secuencias de Aa deducidas a partir de quito-oligosacárido sintasas de varios orígenes muestran una alta similitud a la secuencias de ChS fúngicas (Semino *et al.*, 1996).
- (5) La quitogenina podría ser simplemente percibida como un activador de ChS III, como se considera, por ejemplo, al producto del gen CHS4 el cual es un componente esencial del complejo ChS III.
- (6) El producto del gen CHS4 no tiene homología con alguna de las proteasas conocidas, es zimogénico y parece estar involucrado en el procesamiento del sustrato (Trilla *et al.*, 1997).

Por lo tanto, y tomando en consideración los argumentos anteriores, no es difícil pensar en la presencia de otro(s) factor(es) implicados en el sistema de síntesis de quitina en *E. histolytica*. Así, la adición de cationes al medio de cultivo podría estar estimulando la acción no de las quitina sintasas propiamente dichas, sino de enzimas relacionadas que posiblemente están formando parte del sistema de síntesis de quitina, y cumpliendo una función análoga a la determinada para la glicogenina y para la presunta quitogenina en el sistema fúngico de síntesis de quitina.

5.2 Conclusiones

En los años recientes se ha hecho evidente que el polisacárido estructural quitina es sintetizado por una familia de enzimas codificada por múltiples genes CHS de quitina sintasa, y regulado por una serie de productos de genes auxiliares que influyen en la activación y localización de la quitina sintasa (Munro y Gow, 2001).

Debido a la carencia de un modelo para el enquistamiento *in vitro* de *E. histolytica*, poco se sabe acerca de los mecanismos moleculares y procesos enzimáticos implicados en los procesos de diferenciación de dicho protozooario parásito.

En este trabajo:

- 1).- Se determinó la secuencia de 2 genes (EhCHS1 y EhCHS2) que codifican quitina sintasas en el protozooario parásito *E. histolytica*.
- 2).- La expresión de los mRNA de las quitina sintasas no aumenta cuando los trofozoítos son inducidos a la diferenciación por efecto de los cationes Mg^{2+} , Mn^{2+} y Co^{2+} adicionados al medio de cultivo, lo cual sugiere que las quitina sintasas se encuentran de manera constitutiva en cada una de las etapas, posiblemente en forma de precursor inactivo de la enzima.

- 3).- El análisis de la estructura primaria de las proteínas codificadas por los genes EhCHS1 y EhCHS2 revela una gran similitud con las quitina sintasas de insectos, gusanos y hongos. Dicha similitud se localiza principalmente en la región central o “dominio catalítico de la enzima”.
- 4).- Los aminoácidos identificados como esenciales para la función de las quitina sintasas de levaduras se encuentran perfectamente conservados en las quitina sintasas de *E. histolytica*.
- 5).- Ambas proteínas EhCHS presentan múltiples segmentos transmembranales en sus extremos carboxilo y amino-terminal, lo cual es indicativo de que dichas proteínas son proteínas integrales de la membrana plasmática.

5.3 Perspectivas

A pesar de décadas de investigación intensiva, muchos eventos asociados con la complejidad de formación y deposición de quitina son todavía oscuros, o sólo parcialmente entendidos. La lista incluye el control hormonal de las quitina sintasas tanto al nivel transcripcional y traduccional así como también al empaquetamiento post-traduccional de estas enzimas; tráfico y dirección de paquetes/racimos de quitina sintasa a los sitios apropiados en las células y su inserción intrincada en la membrana plasmática; activación del evento catalítico y su control o modulación; y la translocation de cadenas de quitina a través de la membrana celular, su orientación, fibrilogenesis y asociación con otros componentes estructurales extracelular tales como polisacáridos (en hongos) y proteínas cuticulares (en insectos), (Cohen E, 2001).

En el presente trabajo se determinó la secuencia de dos genes que codifican para quitina sintasas en *E. histolytica*; sin embargo, aún queda por esclarecer los mecanismos que regulan la actividad de estas enzimas en *E. histolytica*. Preguntas tales como: ¿El sistema de síntesis de quitina es un complejo multienzimático o es catalizado por enzimas autoreguladas?, ¿Las quitina sintasas son reguladas al nivel transcripcional o posttraduccional?, ¿Hay en *E. histolytica* otras proteínas cuya función esté estrechamente ligada a la activación de las quitina sintasas o implicadas en la deposición de éstas a sitios

específicos en los cuales realizarán su función?, ¿El sistema de síntesis de quitina en *E. histolytica* requiere la actividad de una enzima que sintetice los quito-oligosacáridos iniciadores de la reacción como sucede con la glucogenina o la supuesta quitogenina de hongos?, ¿Cuales son los mecanismos que regulan la actividad de estas presuntas enzimas auxiliares de las quitina sintasas?

Los datos obtenidos en este trabajo nos llevan a suponer que en *E. histolytica*, además de las quitina sintasas, existen otras enzimas implicadas en el correcto funcionamiento de los complicados sistemas de síntesis de quitina, ya sea modificando o transportando a las enzimas responsables de dicha actividad hasta los sitios apropiados en los que realizaran su función; sin olvidar también la posible presencia de una proteína inicial en el proceso (quitogenina), responsable de la síntesis del quito-oligosacárido iniciador de la reacción de síntesis de quitina.

Actualmente, la carencia de un modelo de enquistamiento en *E. histolytica* dificulta la búsqueda de respuestas a preguntas tan importantes como las mencionadas anteriormente; por ello, a pesar de la poca importancia que desde el punto de vista médico tiene *E. invadens*, este parásito sigue siendo el organismo modelo para entender los eventos relacionados al proceso de enquistamiento del género *Entamoeba*, constituyendo la mejor herramienta para poder hacer los análisis correspondientes y contestar las preguntas relacionadas a dichos procesos.

Sin duda, los resultados de estudios moleculares enfocados a encontrar la respuesta a este tipo de preguntas marcarán el camino a seguir en la búsqueda del conocimiento dirigido a establecer sistemas que permitan bloquear el enquistamiento de *E. histolytica* y por ende, la transmisión de la enfermedad.

5.4 Contribuciones del presente trabajo

Las evidencias mostradas en este trabajo constituyen un paso más en el difícil camino hacia el conocimiento del proceso de síntesis de quitina en el protozooario parásito *E. histolytica*, 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.

El conocimiento de los genes que codifican para las quitina sintasas de *E. histolytica* representa un punto más de apoyo para que estas enzimas sean consideradas como blancos para el diseño de drogas específicas que permitan inhibir su actividad y por lo tanto, bloquear el enquistamiento del parásito.

BIBLIOGRAFÍA

- Arroyo-Begovich A, Carabéz-Trejo A. Tinción de quistes de *Entamoeba invadens*, *Entamoeba histolytica* y *Entamoeba coli* con aglutinina de germen de trigo marcada con partículas de oro coloidal. Arch Invest Méd (Méx). 1980; 11(supl 1):25.
- Arroyo-Begovich A, Carabéz-Trejo A and Ruíz-Herrera J. Identification of the structural component in the cyst wall of *Entamoeba invadens* J Parasitol. 1980;66:735.
- Avron B, Chayen A, Stolarsky T, Schauer R, Reuter G and Mirelman D. A stage-specific sialoglycoprotein in encysting cells of *Entamoeba invadens*. Mol Biochem Parasitol. 1987;25:257-266.
- Avron B, Stolarsky T, Chayen A and Mirelman D. Encystation of *Entamoeba invadens* IP-1 is induced by lowering the osmotic pressure and depletion of nutrients from the medium. J Protozool. 1986;33:522-525.
- Bailey GB and Rengpien S. Osmotic stress as a factor controlling encystation of *Entamoeba invadens*. Arch Invest Med (Mex). 1980;11(1):11-16.
- Barny MA, Schoonejans E, Economou A, Johnston AW and Downie JA. The C-terminal domain of the *Rhizobium leguminosarum* chitin synthase NodC is important for function and determines the orientation of the N-terminal region in the inner membrane. Mol Microbiol. 1996; 19(3):443-453.
- Bartnicki-García S. The biochemical cytology of chitin and chitosan synthesis in fungi. In *Chitin and Chitosan*. Ed. by Skjak-Braek G, Anthonsen T and Sandford P. London: Elsevier Applied Science. 1989. pp. 23-36.
- Bartnicki-García S, Bracker CE, Reyes E and Ruíz-Herrera J. Isolation of chitosomes from taxonomically diverse fungi and synthesis of chitin microfibrils *in vitro*. Exp Mycol. 1978; 2:173-192.
- Beth-Din A, Specht CA, Robbins PW and Yarden O. chs-4, a class IV chitin synthase gene from *Neurospora crassa*. Mol Gen Genet. 1996; 250:214-222.
- Beth-Din A and Yarden O. The *Neurospora crassa* chs-2 gene encodes a non-essential chitin synthase. Microbiol. 1994; 140: 2189-2197.
- Birnboim HC and Doly J. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. Nucleic Acids Res. 1979; 7(6):1513-1523.
- Bond VC, Beanan MJ and Bailey GB. High resolution two-dimensional protein gel evidence of differential gene expression during *Entamoeba* encystation. Arch Med Res. 1992;23:11-13.
- Bowen AR, Chen-Wu JL, Momany M, Young R, Szaniszlo PJ and Robbins PW. Classification of fungal chitin synthases. Proc Natl Acad Sci USA. 1992; 89:519-523.
- Bowers B, Levin G and Cabib E. Effect of polyoxin D on chitin synthesis and septum formation in *Saccharomyces cerevisiae*. J Bacteriol. 1974; 119(2):564-575.

- Bruchhaus I, Leippe M, Lioutas C and Tannich E. Unusual gene organization in the protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. DNA Cell Biol. 1993; 12(10):925-33.
- Bulawa CE. Genetics and molecular biology of chitin synthesis in fungi. Annu Rev Microbiol. 1993; 47:505-534.
- Bulawa CE and Osmond BC. Chitin Synthase I and Chitin Synthase II are not required for Chitin Synthesis *in vivo* in *Saccharomyces cerevisiae*. Proc Natl Acad Sci USA. 1990; 87:7424.
- Bulawa CE, Slater M, Cabib E, Au-Young J, Sburlati A, Adair L and Robins PW. The *Saccharomyces cerevisiae* structural gene for chitin synthase is not required for chitin synthesis *in vivo*. Cell. 1986; 46(2):213-225.
- Cabib E. The synthesis and degradation of chitin. Adv Enzimol. 1987;59:59-101.
- Cabib E, Sburlati A, Bowers B and Silverman SJ. Chitin synthase I, an auxiliary enzyme for chitin synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. J Cell Biol. 1989;108:1665.
- Cabib E, Shaw JA, Mol PC, Bowers B and Choi WJ. Chitin biosynthesis and morphogenetic processes. In: The mycota: biochemistry and molecular biology. Ed. by Brambl R and Marzluf GA. Springer, Berlin Heidelberg New York. 1996; vol. 3:243-267.
- Cabib E, Silverman SJ and Shaw JA. Chitinase and chitin synthase I: counterbalancing activities in cell separation of *Saccharomyces cerevisiae*. J Gen Microbiol. 1992; 138(1): 97-102.
- Cabib E, Roh DH, Schmidt M, Crotti LB and Varma A. The yeast cell wall and septum as paradigms of cell growth and morphogenesis. J Biol Chem. 2001; 276(23):19679-19682.
- Campbell DG and Cohen P. The amino acid sequence of rabbit skeletal muscle glycogenin. Eur J Biochem. 1989; 185(1):119-125.
- Campos-Góngora E, Viader-Salvadó JM, Martínez-Rodríguez HG, Zuñiga-Charles MA, Mora Galindo J and Said-Fernández S. Mg, Mn and Co Ions Enhance the formation of *Entamoeba histolytica* Cyst-like Structures Resistant to Sodium Dodecyl Sulfate” Arch Med Res. 2000;31:162-168.
- Cao Y, Skurat AV, DePaoli-Roach AA and Roach PJ. Initiation of glycogen synthesis. Control of glycogenin by glycogen phosphorylase. J Biol Chem. 1993; 268(29): 21717-21721.
- Causier BE, Milling RJ, Foster SG and Adams DJ. Characterization of chitin synthase from *Botrytis cinerea*. Microbiology. 1994; 140:2199-2205.
- Cid VJ, Duran A, Del Rey F, Snyder MP, Nombela C and Sánchez M. Molecular basis of cell integrity and morphogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. Microbiol Rew. 1995; 59:345-386.

Clark CG, Espinosa-Cantellano M and Bhattacharya A. *Entamoeba histolytica*: An Overview of the Biology of the Organism. In Amebiasis. Ed. by Ravdin J. Springer-Verlag, Berlin. 2000; Chap. 1:1.

Clos J and Brandau S. pJC20 and pJC40-two high-copy-number vectors for T7 RNA polymerase-dependent expression of recombinant genes in *Escherichia coli*. Protein Expr Purif. 1994; 5(2):133-137.

Cohen E. Chitin Biochemistry: synthesis and inhibition. Annu Rev Entomol. 1987; 32:71-93.

Cohen E. Chitin synthesis and inhibition: a revisit. Pest Manag Sci. 2001; 57(10):946-950.

Coppi A and Eichinger D. Regulation of *Entamoeba invadens* encystation and gene expression with galactose and N-acetylglucosamine. Mol Biochem Parasitol. 1999; 102:67-77.

Cos T, Ford RA, Trilla JA, Duran A, Cabib E and Roncero C. Molecular analysis of Chs3p participation in chitin synthase III activity. Eur J Biochem. 1998; 256(2):419-26.

Coss T, Ford RA, Trilla JA, Durán A, Cabib E and Roncero C. Molecular analysis of ChS3p participation in chitin synthetase III activity. Eur J Biochem. 1998; 256: 419-426.

Choi WJ, Santos B, Duran A and Cabib E. Are yeast chitin synthases regulated at the transcriptional or the posttranslational level? Mol Cell Biol. 1994; (12):7685-7694.

Choi WJ, Sburlati A and Cabib E. Chitin synthase 3 from yeast has zymogenic properties that depend on both the CAL1 and the CAL3 genes. Proc Natl Acad Sci USA. 1994; 91(11): 4727-4730.

Chomczynski P and Sacchi N. RNA isolation by acid guanidine thiocyanate-phenol-chloroform extraction (AGPC) method. Anal Biochem. 1987; 162: 156-159.

Chuang JS and Schekman RW. Differential trafficking and timed localization of two chitin synthase proteins, Chs2p and Chs3p. J Cell Biol. 1996; 135(3):597-610.

Das S and Gillin FD. Chitin synthase in encysting of *Entamoeba invadens*. Biochem J. 1991;280:641-647.

DeAngelis PL, Papaconstantinou J and Weigel PH. Molecular cloning, identification, and sequence of the hyaluronan synthase gene from group A *Streptococcus pyogenes*. J Biol Chem. 1993; 268(26):19181-19184.

de la Vega H, Specht CA, Semino CE, Robbins PW, Eichinger D, Caplivski D, Ghosh S and Samuelson J. Cloning and expression of chitinases of Entamoebae. Mol Biochem Parasitol. 1997; 85(2):139-47.

DeMarini DJ, Adams AE, Fares H, De Virgilio C, Valle G, Chuang JS and Pringle JR. A septin-based hierarchy of proteins required for localized deposition of chitin in the *Saccharomyces cerevisiae* cell wall. J Cell Biol. 1997; 139(1):75-93.

- Diamond LS. Techniques of axenic cultivation of *Entamoeba histolytica* Schaudinn, 1903 and *E. histolytica-like* amebae. J Parasitol. 1968; 54(5):1047-1056.
- Diamond LS: *In vitro* methods for parasite cultivation. Ed. by Taylor AE and Baker JR. London: Academic Press. 1987.
- Diamond LS, Harlow DR and Cunnick CC. A new medium for the axenic cultivation of *Entamoeba histolytica* and other Entamoeba. Trans R Soc Trop Med Hyg. 1978; 72:431.
- Eichinger D. Encystation of Entamoeba parasites. BioEssays. 1997;19(7):633-639.
- Eichinger D. Encystation in parasitic protozoa. Current Opinion en Microbiology. 2001;4: 421-426.
- Eichinger D. A role for a galactose lectin and its ligands during encystment of Entamoeba. J Eukariot Microbiol. 2001; 48: 17-21. (b)
- Farkas V. Biosynthesis of Cell Walls of Fungi. Microbiol Rev. 1979; 43(supl 2):117.
- Frisardi M, Ghosh SK, Field J, Van Dellen K, Rogers R, Robbins P and Samuelson J. The most abundant glycoprotein of amebic cyst walls (*Jacob*) is a lectin with five Cys-rich, chitin-binding domains. Infect Immun. 2000; 68(7):4217-4224.
- Frohman MA. Rapid Amplification of Complementary DNA Ends for Generation of Full-Lenght Complementary DNAs: Thermal RACE. Methods Enzymol. 1993; 218:340-356.
- Gagou ME, Kapsetaki M, Turberg A and Kafetzopoulos D. Stage-specific expression of the chitin synthase DmeChSA and DmeChSB genes during the onset of Drosophila metamorphosis. Insect Biochem Mol Biol. 2002; 32(2):141-146.
- Gangopadhyay SS, Ray SS, Sinha P and Lohia A. Unusual genome organisation in *Entamoeba histolytica* leads to two overlapping transcripts. Mol Biochem Parasitol. 1997; 89(1):73-83.
- Ghosh SK, Field J, Frisardi M, Rosenthal B, Mai Z, Rogers R and Samuelson J. Chitinase secretion by encysting *Entamoeba invadens* and transfected *Entamoeba histolytica* trophozoites: localization of secretory vesicles, endoplasmic reticulum, and Golgi apparatus. Infect Immun. 1999; 67(6):3073-3081.
- Glaser L and Brown DH. The synthesis of chitin in cell free extracts of *Neurospora crassa*. J Biol Chem. 1957;228:729.
- Gold SE and Kronstad JW. Disruptions of two genes for chitin synthase in the phytopathogenic fungus *Ustilago maydis*. Mol Microbiol. 1994; 11:897-902.
- Gooday GW. Biosynthesis of the fungal cell wall - mechanisms and implications. J Gen Microbiol. 1977;99:1-11.
- Gooday GW. Inhibition of chitin metabolism. In Biochemistry of Cell Walls and Membranes in Funji. Kuhn PJ, Trinci APJ, Jung MJ, Goosey MW and Coppings LG eds. Berlin: Springer-Verlag; 1990.

- Hamann L, Buss H and Tannich E. Tetracycline-controlled gene expression in *Entamoeba histolytica*. *Mol Biochem Parasitol*. 1997; 84(1):83-91.
- Hamann L, Nickel R and Tannich E. Transfection and continuous expression of heterologous genes in the protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1995; 92(19):8975-8979.
- Hanahan D. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol*. 1983; 166(4):557-580.
- Harris MT, Lai K, Arnold K, Martinez HF, Specht CA and Fuhrman JA. Chitin synthase in the filarial parasite *Brugia malayi*. *Mol Biochem Parasitol*. 2000; 111(2):351-362.
- Heukeshoven J und Dernick R. Vereinfachte und universelle Methode zur Silberfärbung von Proteinen in Polyacrilamid: Bemerkungen zum Mechanismus der Silberfärbung. LKB-Application Note RE-034. 1986.
- Horsch M, Mayer C and Rast DM. Stereochemical requirements of chitin synthase for ligand binding at the allosteric site for N-acetylglucosamine. *Eur J Biochem*. 1996; 237: 476-482.
- Horsch M and Sowdhamini R. A fold prediction for the catalytic domain of chitin synthases. In: Chitin enzymology. RAA Muzzarelli (ed). Atec Edizioni, Italy. 1996; (2):447.
- Hundle BS, O'Brien DA, Alberti M, Beyer P and Hearst JE. Functional expression of zeaxanthin glucosyltransferase from *Erwinia herbicola* and a proposed uridine diphosphate binding site. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1992; 89(19):9321-9325.
- Ibrahim GH, Smartt CT, Kiley LM and Christensen BM. Cloning and characterization of a chitin synthase cDNA from the mosquito *Aedes aegypti*. *Insect Biochem Mol Biol*. 2000; (12):1213-1222
- Jeniaux C. La chitine dans le règne animal. *Bull Soc Zool Fr*. 1982.
- Johnson MS, Overington JP and Blundell TL. Alignment and searching for common protein folds using a data bank of structural templates. *J Mol Biol*. 1993; 231: 735-752.
- Kang MS, Elango N, Mattia E, Au-Young J, Robins PW and Cabib E. Isolation of chitin synthetase from *Saccharomyces cerevisiae*: purification of an enzyme by entrapment in the reaction product. *J Biol Chem*. 1984; 259:14966.
- Klis FM. Review: cell wall assembly in yeast. *Yeast*. 1994;10:851-869.
- Kramer KJ and Koga D. Insect chitin: physical state, synthesis, degradation and metabolic regulation. *Insect Biochem*. 1986;16:851-877.
- Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970; 227(259):680-685.

- Leal-Morales CA, Bracker CE and Bartnicki-García S. Localization of chitin synthetase in cell-free homogenates of *Saccharomyces cerevisiae*: chitosomes and plasma membrane. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1988; 85:8516-8520.
- López-Romero E and Villagómez-Castro JC. Encystation in *Entamoeba invadens*. *Parasitol Today*. 1993;9:225-227.
- Lotter H, Mannweiler E, Schreiber M and Tarnich E. Sensitive and specific serodiagnosis of invasive amebiasis by using a recombinant surface protein of pathogenic *Entamoeba histolytica*. *J Clin Microbiol*. 1992; 30(12):3163-3167.
- Lushbaugh WB, Miller JH. The morphology of *Entamoeba histolytica*. In Raydin JI, Ed. *Amebiasis. Human Infection by Entamoeba histolytica*. New York: John Wiley and Sons. 1988:41
- Maharaj R, May TB, Wang SK and Chakrabarty AM. Sequence of the alg8 and alg44 genes involved in the synthesis of alginate by *Pseudomonas aeruginosa*. *Gene*. 1993; 136:267-269.
- Mann BJ, Torian BE, Vedvick TS and Petri Jr. WA. Sequence of a cysteine-rich galactose-specific lectin of *Entamoeba histolytica*. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1991;88:3248-3252.
- Manning-Cela R, Meraz MA, Hernández JM and Meza I. Actin mRNA levels and actin synthesis during the encystation of *Entamoeba invadens*. *J Eukaryot Microbiol*. 1994;41:360-365.
- Martínez-Palomo A. Cell Biology, The Cyst. In *The Biology of Entamoeba histolytica*. New York: John Wiley & Sons. 1982:56.
- Martínez-Palomo A. Biology of *Entamoeba histolytica*: Cyst differentiation. In *Human Parasitic Diseases: Amebiasis*. Ed by Martínez-Palomo. Elsevier, New York. 1986.
- McMurrough I and Bartnicki-García S. Properties of a particulate chitin synthetase from *Mucor rouxii*. *J Biol Chem*. 1971; 246:4008.
- Mellado E, Aufauvre-Brown A, Specht CA, Robbins PW and Holden DW. A multigene family related to chitin synthase genes of yeast in the opportunistic pathogen *Aspergillus fumigatus*. *Mol Gen Genet*. 1995; 246:353-359.
- Merz RA, Horsch M, Nyhlén LE and Rast DM. Biochemistry of chitin synthase. In *Chitin and Chitinases*. Ed. by Jollès P and Muzzarelli RAA. Birkhäuser Verlag Basel/Switzerland. 1999;9-37.
- Miyazaki A and Ootaki T. Multiple genes for chitin synthase in the zygomycete fungus *Phycomyces blakesleeunus*. *J Gen Appl Microbiol*. 1997; 43:333-340.
- Munro CA and Gow NA. Chitin synthesis in human pathogenic fungi. *Med Mycol*. 2001; 39(1):41-53.
- Muzzarelli RAA. *Chitin*. Pergamon Press, Oxford. 1977.

- Muzzarelli R, Jeuniaux C and Gooday GW. Chitin in Nature and Technology. New York: Plenum Press. 1986.
- Nagahashi S, Sudoh M, Ono N, Sawada R, Yamaguchi E, Uchida Y, Mio T, Takagi M, Arisawa M and Yamada-Okabe H. Characterization of Chitin Synthase 2 of *Saccharomyces cerevisiae*: Implication of two highly conserved domains as possible catalytic sites. J Biol Chem. 1995; 270(23):13961-13967.
- Neff RJ and Benton WF. Localization of cellulose in the cysts of *Acanthamoeba* sp. J Protozool. 1962;9:11.
- Neville AC. Biology of the arthropod cuticle. Springer, Berlin, Heidelberg, New York. 1975.
- Nickel R and Tannich E. Transfection and transient expression of chloramphenicol acetyltransferase gene in the protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. Proc Natl Acad Sci USA. 1994; 91(15):7095-7098.
- Orlean P. Two Chitin Synthases in *Saccharomyces cerevisiae*. J Biol Chem. 1987; 262: 5732.
- Ostrowski S, Dierick HA and Bejsovec A. Genetic Control of Cuticle Formation During Embryonic Development of *Drosophila melanogaster*. Genetics. 2002; 161(1):171-182.
- Palli SR and Retnakaran A. Molecular and biochemical aspects of chitin synthesis inhibition. In Chitin and Chitinases. Ed. by Jollès P and Muzzarelli RAA. Birkhäuser Verlag Basel/Switzerland. 1999;85-98.
- Pammer M, Briza P, Ellinger A, Schuster T, Stucka R, Feldmann H and Breitenbach M. DIT101 (CSD2, CAL1), a cell cycle-regulated yeast gene required for synthesis of chitin in cell walls and chitosan in spore walls. Yeast. 1992; 8(12):1089-1099.
- Peberdy JF. Fungal cell walls - a review. In Biochemistry of Cell Walls and Membranes in Fungi. Edited by Kuhn PJ, Trinci APJ, Jung MJ, Goosey MW and Coppings LG. Berlin: Springer-Verlag. 1990. pp. 5-30.
- Petri Jr WA, Haque R, Lyerly D and Vines RR. Estimating the impact of amebiasis on health. Parasitol Today. 2000;16(8):320-321.
- Purdy JE, Mann BJ, Pho LT and Petri WA Jr. Transient transfection of the enteric parasite *Entamoeba histolytica* and expression of firefly luciferase. Proc Natl Acad Sci USA. 1994; 91(15):7099-7103.
- Ramakrishan G and Petri Jr WA. Pathogenesis and Molecular Biology of Amebiasis. In Amebiasis. Ed. by Ravdin J. Springer-Verlag, Berlin. 2000; Chap. 4:91.
- Rengpien S and Bailey GB. Differentiation of *Entamoeba*: a new medium and optimal conditions for axenic encystation of *E. invadens*. J Parasitol. 1975; 61(1):24-30.

- Roncero C, Valdivieso MH, Ribas JC and Duran A. Isolation and characterization of *Saccharomyces cerevisiae* mutants resistant to Calcofluor white. *J Bacteriol.* 1988; 170(4):1950-1954.
- Rosa F, Sargent TD, Rebbert ML, Michaels GS, Jamrich M, Grunz H, Jonas E, Winkles JA and Dawid IB. Accumulation and decay of DG42 gene products follow a gradient pattern during *Xenopus* embryogenesis. *Dev Biol.* 1988; 129(1):114-123.
- Ruiz-Herrera J. In *Proceedings of 1st International Conference on Chitin/chitosan*. Eds: Muzzarelli RAA and Pariser ER. MIT Sea Grant Program Report. 1977; pp. 11.
- Ruiz-Herrera J. *Synthesis of Chitin microfibrils in vitro*. In: *Cellulose and Other Polymer Systems. Biogenesis, Structure and Degradation*. Ed. by Brown Jr. RM. Plenum Press; New York. 1982; Chap.11:207-220.
- Ruiz-Herrera J. *Fungal cell wall: Structure, synthesis and assembly*. Boca Ratón: CRC Press. 1992.
- Ruiz-Herrera J, León CG, Carábez-Trejo A and Reyes-Salinas E. Structure and chemical composition of the cell walls from the haploid yeast and mycelial forms of *Ustilago maydis*. *Fungal Genet Biol.* 1996;20:133-142.
- Ruiz-Herrera J and Xoconostle-Cázares B. Molecular and Genetic Control of Chitin Biosynthesis in Fungi. *Arch Med Res.* 1995; 26(3):315-321.
- Said-Fernández S, Campos-Góngora E, González-Salazar F, Martínez-Rodríguez H, Vargas-Villarreal J and Viader-Salvadó JM. Mg^{2+} , Mn^{2+} and Co^{2+} Stimulate *Entamoeba histolytica* to Produce Chitin-like Material. *J Parasitol.* 2001; 87(4):919-923.
- Said-Fernández S, Mata-Cárdenas BD, González-Garza MT, Rodríguez-Pérez E and Navarro-Marmolejo L. *Entamoeba histolytica* cysts with a defective wall formed under axenic conditions. *Parasitol Res.* 1993; 79:200.
- Said-Fernández S, Vargas-Villarreal J, Castro-Garza J, Mata-Cárdenas BD, Navarro-Marmolejo L, Lozano-Garza G and Martínez-Rodríguez H. PEHPS medium: An alternative for axenic cultivation of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba invadens*. *Trans Roy Soc Trop Med Hyg.* 1988; 82:249.
- Sambrook J, Fritsch EF and Maniatis T. *Molecular cloning. A Laboratory Manual*. Second ed. New York. Cold Spring harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY. 1989.
- Sánchez LB, Enea V and Eichinger D. Identification of a developmentally regulated transcript expressed during encystation of *Entamoeba invadens*. *Mol Biochem Parasitol.* 1994;67:125-135.
- Sánchez-López R, Gama-Castro S, Ramos MA, Merino E, Lizardi PM and Alagon A. Cloning and expression of the *Entamoeba histolytica* ERD2 gene. *Mol Biochem Parasitol.* 1998; 92(2):355-359.
- Sánchez MA, Peattie DA, Wirth D and Orozco E. Cloning, genomic organization and transcription of the *Entamoeba histolytica* α -tubulin encoding gene. *Gene.* 1994; 146: 239-244.

Sanger F, Nicklen S and Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proc Natl Acad Sci USA. 1977; 74(12):5463-5467.

Santos B, Duran A and Valdivieso MH. CHS5, a gene involved in chitin synthesis and mating in *Saccharomyces cerevisiae*. Mol Cell Biol. 1997; 17(5):2485-2496.

Santos B and Snyder M. Targeting of chitin synthase 3 to polarized growth sites in yeast requires Chs5p and Myo2p. J Cell Biol. 1997; 136(1):95-110.

Santos B and Snyder M. Sbe2p and sbe22p, two homologous Golgi proteins involved in yeast cell wall formation. Mol Biol Cell. 2000; 11(2):435-452.

Saxena IM, Brown Jr. RM, Fevre M, Geremia RA and Henrissat B. Multidomain Architecture of β -Glycosyl Transferases: Implications for Mechanism of Action. J Bacteriol. 1995;177:1419-1424.

Saxena IM, Lin FC and Brown RM Jr. Cloning and sequencing of the cellulose synthase catalytic subunit gene of *Acetobacter xylinum*. Plant Mol Biol. 1990; (5):673-683.

Sburlati A and Cabib E. Chitin synthetase 2, a presumptive participant in septum formation in *Saccharomyces cerevisiae*. J Biol Chem. 1986; 261(32):15147-15152.

Selitrennikoff CP. Chitin synthase activity from the slime variant of *Neurospora crassa*. Biochem Biophys Acta. 1979; 571:224-232.

Semino CE, Specht CA, Raimondi A and Robbins PW. Homologs of the *Xenopus* developmental gene DG42 are present in zebrafish and mouse and are involved in the synthesis of Nod-like chitin oligosaccharides during early embryogenesis. Proc Natl Acad Sci USA. 1996; 93(10):4548-4553.

Shaw JA, Mol PC, Bowers B, Silverman SJ, Valdivieso MH, Duran A and Cabib E. The function of chitin synthases 2 and 3 in the *Saccharomyces cerevisiae* cell cycle. J Cell Biol. 1991;114(1):111-123.

Silverman SJ, Sburlati A, Slater ML and Cabib E. Chitin Synthase II is essential for septum formation and cell division in *Saccharomyces cerevisiae*. Proc Natl Acad Sci USA. 1988; 85:4735.

Singh U, Rogers JB, Mann BJ and Petri WA Jr. Transcription initiation is controlled by three core promoter elements in the *hgl5* gene of the protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. Proc Natl Acad Sci USA. 1997; 94(16):8812-8817.

Sonnhammer ELL, Von Heijne G and Krogh A. A hidden Markov model for predicting transmembrane helices in protein sequences. In Proceedings of the 6th International Conference on Intelligent Systems for Molecular Biology. Glasgow J, Littlejohn T, Major F, Lathrop R, Sankoff D and Sensen C, eds. AAAI Press, Menlo Park, CA. 1998; 175-182.

Southern EM. Detection of Specific Sequences Among DNA Fragments Separated by Gel Electrophoresis. J Mol Biol. 1975; 98:503-517.

Spindler DK, Spindler-Barth M and Londershausen M. Chitin Metabolism: a target for the drugs against parasites. *Parasitol Res.* 1990;76:283-288.

Tannich E, Ebert F and Horstmann RD. Primary structure of the 170-kDA surface lectin of pathogenic *Entamoeba histolytica*. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1991;88(1):1849-1853.

Tannich E and Horstmann RD. Codon Usage in Pathogenic *Entamoeba histolytica*; *J Mol Evol.* 1992; 34:272-273.

Tellam RL, Vuocolo T, Johnson SE, Jarney J and Pearson RD. Insect chitin Synthase: cDNA sequence, gene organization and expression. *Eur J Biochem.* 2000; 267:6025-6042.

Trilla JA, Cos T, Duran A and Roncero C. Characterization of CHS4 (CAL2), a gene of *Saccharomyces cerevisiae* involved in chitin biosynthesis and allelic to SKT5 and CSD4. *Yeast.* 1997; 13(9):795-807.

Trilla JA, Duran A and Roncero JC. Chs7p, a new protein involved in the control of protein export from the endoplasmic reticulum that is specifically engaged in the regulation of chitin synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol.* 1999; 145(6):1153-1163.

Uchida Y, Shimmi O, Sudoh M, Arisawa M and Yamada-Okabe H. Characterization of chitin synthase 2 of *Saccharomyces cerevisiae*. II: Both full size and processed enzymes are active for chitin synthesis. *J Biochem (Tokyo).* 1996; 119(4):659-666.

Valdivieso HM, Duran A and Roncero C. Chitin Synthases in Yeast and Fungi; In *Chitin and Chitinases*. Ed. by Jollès P and Muzzarelli RAA. Birkhäuser Verlag Basel/Switzerland. 1999;55-69.

Valdivieso MH, Mol PC, Shaw JA, Cabib E and Duran A. CAL1, a gene required for activity of chitin synthase 3 in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol.* 1991;114(1):101-109.

Van Dellen K, Ghosh SK, Robbins PW, Loftus B and Samuelson J. *Entamoeba histolytica* lectins contain unique 6-Cys or 8-Cys chitin-binding domains. *Infect Immun.* 2002; 70(6):3259-3263.

Vázquezdelara-Cisneros LG and Arroyo-Begovich A. Induction of encystation of *Entamoeba invadens* by removal of glucose from the culture medium. *J Parasitol.* 1984;70: 629-633.

Veronico P, Gray LJ, Jones JT, Bazzicalupo P, Arbucci S, Cortese MR, Di Vito M and De Giorgi C. Nematode chitin synthases: gene structure, expression and function in *Caenorhabditis elegans* and the plant parasitic nematode *Meloidogyne artiellia*. *Mol Genet Genomics.* 2001; 266(1):28-34.

Villagómez-Castro JC, Calvo-Méndez C and López-Romero E. Chitinase activity in encysting *Entamoeba invadens* and its inhibition by allosamidin. *Mol Biochem Parasitol.* 1992;52:53-62.

Willhoeft U and Tannich E. The electrophoretic karyotype of *Entamoeba histolytica*. *Mol Biochem Parasitol.* 1999; 99(1):41-53.

Yabe T, Yamada-Okabe T, Nakajima T, Sudoh M, Arisawa M and Yamada-Okabe H. Mutational analysis of chitin synthase 2 of *Saccharomyces cerevisiae*. Identification of additional amino acid residues involved in its catalytic activity. *Eur J Biochem.* 1998; 258(3):941-947.

Yarden O and Yanofsky C. Chitin synthase I plays a major role in cell wall biogenesis of *Neurospora crassa*. *Genes Dev.* 1991; 5:2420-2430.

CURRICULUM VITAE

EDUARDO CAMPOS GÓNGORA

DATOS PERSONALES:

- Nacionalidad: Mexicano
- Fecha de Nacimiento: 11.07.1965
- Lugar de Nacimiento: Poza Rica de Hidalgo, Veracruz; México.
- e-mail: educampos@hotmail.com

ESCOLARIDAD:

1972 - 1978

Primaria: Escuela Primaria "Cuauhtemoc"
Poza Rica de Hgo., Veracruz; México.

1978 - 1981

Secundaria: Escuela Secundaria y de Bachilleres Oficial No. 8 "Emiliano Zapata"
Poza Rica de Hgo., Veracruz; México.

1981 - 1983

Bachillerato: Escuela Secundaria y de Bachilleres Oficial No. 8 "Emiliano Zapata"
Poza Rica de Hgo., Veracruz; México.

1983 - 1988

Universidad: Universidad Veracruzana, Facultad de Ciencias Biológicas Tuxpan,
Veracruz; México.

- Título: Licenciado en Biología

1993 - 1996

Maestría en Ciencias: Universidad Autónoma de Nuevo León, División de Estudios
de Postgrado, Facultad de Ciencias Biológicas. Monterrey, Nuevo León; México.

- Título: Maestro en Ciencias
- Especialidad: Microbiología Médica

1996-2002

Doctorado en Ciencias: Universidad Autónoma de Nuevo León, División de Estudios
de Postgrado, Facultad de Ciencias Biológicas. Monterrey, Nuevo León; México.

- Título: Doctor en Ciencias
- Especialidad: Microbiología Médica

ESTANCIAS DE INVESTIGACIÓN:

- **División de Biología Celular y Molecular, Centro de Investigación Biomédica del Noreste; Instituto Mexicano del Seguro Social; México. 1993 – 1998.**

Proyecto de Investigación: “Efecto de Mg^{2+} , Mn^{2+} y Co^{2+} sobre el Enquistamiento de *Entamoeba histolytica*”.

- **Unidad de Laboratorios de Ingeniería y Expresión Genicas, Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Nuevo León; México. 1998-1999.**
- **Instituto de Medicina Tropical “Bernhard Nocht”; Hamburgo, Alemania. 2000-2002.**

Proyecto de Investigación: “Clonación y Caracterización de Quitina Sintasas de *Entamoeba histolytica*”

DISTINCIONES

- **Primer lugar en aprovechamiento académico (Bachillerato); otorgado por la Dirección General de Enseñanza Media del Estado; Escuela Secundaria y de Bachilleres Oficial No. 8 “Emiliano Zapata”, Poza Rica Veracruz. México. 1982-1983.**
- **Tercer lugar en aprovechamiento académico; generación de graduados en la Carrera de Biología, otorgado por la Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Veracruzana; Tuxpan, Veracruz, México. 1984-1988.**
- **Mención Honorífica en el grado de Maestro en Ciencias. División de Estudios de Postgrado, Facultad de Ciencias Biológicas; Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey; México. 1996.**
- **Beca del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), México; para realizar estudios de Maestría en Ciencias. Periodo: Marzo, 1993 - Agosto, 1995.**
- **Beuario de Investigación Médica, Instituto Mexicano del Seguro Social, Centro de Investigación Biomédica del Noreste: CIBIN:IMSS; México. Periodo: Marzo, 1993 - Febrero, 1998.**

- **Beca del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), México;** para realizar estudios de Doctorado en Ciencias.
Periodo: Marzo 1996-Febrero, 1999.
- **Aceptado como miembro del Sistema Nacional de Investigadores (SNI) México,** en la categoría de Candidato a Investigador Nacional. Entrada condicionada a la aceptación del artículo “Mg, Mn and Co Ions Enhance the formation of *Entamoeba histolytica* Cyst-like Structures Resistant to Sodium Dodecyl Sulfate”. 1998.
- **Beca del Servicio Alemán de Intercambio Académico (DAAD),** para estudios de Doctorado, en Alemania.
Periodo: Octubre, 1999 – Marzo, 2002.

PUBLICACIONES DURANTE EL DOCTORADO:

- Cruz-Vega DE, **Campos-Góngora E**, Said-Fernández S and González-Garza MT. “*In Vitro* Additive Synergistic Antiamoebic Effect of a Metronidazole/Gossypol Blend” *Pharmaceutical Sciences*. 1996; Vol 2 (11): pp. 509 - 511.
- **Campos-Góngora E**, Viader-Salvadó JM, Martínez-Rodríguez HG, Mora-Galindo J and Said-Fernández S. “Stimulation of *Entamoeba histolytica* Cyst Wall Polysaccharide Synthesis by Three Divalent Cations” *Arch Med Res*. 1997; Vol 28; pp 141 - 142.
- Cruz-Vega DE, **Campos-Góngora E**, Said-Fernández S and González-Garza MT. “Determination of Antiamoebic Effect of a Metronidazole/Gossypol Blend” *Arch Med Res*. 1997; Vol 28; pp 300 – 301.
- **Campos-Góngora E**, Viader-Salvadó JM, Martínez-Rodríguez HG, Zuñiga-Charles MA, Mora Galindo J and Said-Fernández S. “Mg, Mn and Co Ions Enhance the formation of *Entamoeba histolytica* Cyst-like Structures Resistant to Sodium Dodecyl Sulfate” *Arch Med Res*. 2000; Vol 31; 162 – 168.
- González-Salazar F, Viader-Salvadó JM, Martínez-Rodríguez HG, **Campos-Góngora E**, Mata-Cárdenas BD, Said-Fernández S. “Identification of seven chemical factors that favor high-quality *Entamoeba histolytica* cyst-like structures formation under axenic conditions. *Arch Med Res*. 2000; Jul-Aug;31(4 Suppl):S 192-3.

- Ute Willhoeft, **Eduardo Campos-Góngora**, Sassia Touzni, Iris Bruchhaus and Egbert Tannich. "Introns of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar*" *Protist*. 2001; Vol 152; 149 – 156.
- Said-Fernández S, **Campos-Góngora E**, Gonzalez-Salazar F, HG Martínez-Rodríguez, Vargas-Villarreal J and Viader-Salvadó JM. " Mg^{2+} , Mn^{2+} and Co^{2+} Stimulate *Entamoeba histolytica* to Produce Chitin-like Material" *J Parasitol*. 2001; 87(4) 919-923.
- **Campos-Góngora E**, Willhoeft U, Said-Fernández S and Tannich E. "*Entamoeba histolytica* Chitin Synthases: Cloning and analysis of primary structure" *In preparation*.

IDIOMAS

- **Español**: lengua materna
- **Alemán e Inglés**: hablado y escrito

Ciudad Universitaria, Monterrey; N. L. Octubre del 2002.

In-vitro Additive Synergistic Anti-amoebic Effect of a Metronidazole-Gossypol Blend

D. E. CRUZ-VEGA*, E. CAMPOS-GÓNGORA, S. SAID-FERNÁNDEZ AND M. T. GONZÁLEZ-GARZA

*División de Biología Celular y Molecular, *División de Farmacología, Centro de Investigación Biomédica del Noreste, IMSS, Administración de Correos No. 4, Apartado Postal 20, CP 64720, Monterrey, N.L., México*

Abstract

Gossypol has a potent anti-amoebic effect on both *Entamoeba histolytica* axenic cultures and experimental amoebic hepatic abscess. However, the margin between the in-vivo effective dose and the toxic dose in hamsters is relatively small. While metronidazole is widely used as an anti-amoebic medication, it is considered a possible carcinogen in man.

With the aid of the Basic Sequential Analytical Simplex Method we tested the effectiveness of 12 metronidazole-gossypol blends where the concentration of each drug was systematically varied. Amoebic growth inhibition was observed (33-71% with respect to controls) using blends containing metronidazole (50-154 nM) and gossypol (5-16 nM). The combination containing metronidazole (88.61 nM) and gossypol (9.95 nM) caused 62% amoebic growth inhibition. These concentrations were 50% lower than those required to produce an equivalent effect using metronidazole or gossypol alone.

Thus, the actions of metronidazole and gossypol against *E. histolytica* are additive. Accordingly, the in-vivo application of an appropriate combination of metronidazole and gossypol could be as effective as each drug alone, but less toxic to the host.

Metronidazole is one of the most widely used medications against trichomoniasis, giardiasis and amoebiasis (Webster 1991). However, due to its toxic effects on DNA (LaRusso et al 1977; Koch-Weser & Goldman 1980; Voogd 1981; Edwards 1986; Martelli et al 1990) metronidazole is considered to be a potential carcinogen by the International Agency for Research on Cancer (1980). Gossypol, a polyphenol extracted from several species of cotton (*Gossypium* sp.) has potent in-vitro and in-vivo anti-amoebic activity, 39- (González-Garza & Said-Fernández 1988) and 9-times (González-Garza et al 1996) higher than that of metronidazole, respectively. Nevertheless, the margin between the most effective and lethal dose of gossypol is relatively small (González-Garza et al 1996).

We determined the anti-amoebic effect of a blend series where the concentration of metronidazole and gossypol was varied and systematically tested for possible synergistic effects.

Material and Methods

Parasites

Entamoeba histolytica HM-1: IMSS strain was used in all the experiments. The trophozoites were maintained in axenic conditions in PEHPS medium (Said-Fernández et al 1988), and were subcultured every 4 days.

Assay method

Varying concentrations of gossypol and metronidazole were added to borosilicate screw capped culture tubes, containing 11 mL fresh sterile PEHPS medium. Drugs were used alone or blended. In all determinations the metronidazole and gossypol

concentrations were maintained in a range from 0.0 to 0.020 μM and 0.0 to 0.205 μM , respectively. Metronidazole was dissolved with phosphate buffered saline (PBS). Gossypol was added with a minimum volume of NaOH 0.5N and diluted with PBS.

For experiments where gossypol-metronidazole blends were tested, the concentration of each drug was calculated following the Basic Sequential Analytical Simplex Method, (Shavers et al 1979). The analysis started with blends 1-3, where drug concentrations were equivalent to submultiples of each drug IC₅₀, (metronidazole, 204 nM and gossypol, 20 nM). The IC₅₀ values were calculated according with the method described elsewhere (González-Garza et al 1988). Blend 1 contained 0.5 IC₅₀ metronidazole with 0.5 IC₅₀ gossypol; blend 2, 0.5 IC₅₀ metronidazole, 0.25 IC₅₀ gossypol and blend 3, 0.25 IC₅₀ metronidazole with 0.5 IC₅₀ gossypol. The culture tubes, containing 11 mL medium and 1×10^3 amoebae mL⁻¹, were mixed with 50 μL of each drug solution (concentrated 200 times with respect to their final concentration). The tubes were incubated for 72 h at 36°C, cooled in ice water for 10 min and the number of trophozoites mL⁻¹ in each tube determined with a haemocytometer. Results were estimated as percentage growth inhibition with respect to untreated controls. The two combinations which produced the highest amoebic growth inhibition and the one that produced the lower inhibition were identified. The two combinations that produced the highest inhibition were used again in the following experiment. The drug blend that produced the worst results was discarded and substituted with a new combination in which the concentration of each drug was calculated using the following equation (Shavers et al 1979):

$$C_n = 2\bar{X}C_b - C_a \quad (1)$$

where C_n was the new concentration of metronidazole, $2\bar{X}C_b$ the metronidazole concentration average in the two blends

Correspondence: M. T. González-Garza y Barrón, División de Biología Celular y Molecular, Centro de Investigación Biomédica del Noreste, IMSS, Administración de Correos No. 4, Apartado Postal 20, CP 64720, Monterrey, N.L., México.
E-Mail: mtgonzal@academ01 mtg.nesm.mx

Stimulation of *Entamoeba histolytica* Cyst Wall Polysaccharide Synthesis by Three Divalent Cations¹

EDUARDO CAMPOS-GONGORA,**** JOSE MARIA VIADER-SALVADO,**
HERMINIA G. MARTINEZ-RODRIGUEZ,** JUAN MORA-GALINDO**** and
SALVADOR SAID FERNANDEZ*

* División de Biología Celular y Molecular, Centro de Investigación Biomédica del Noreste, IMSS, Monterrey, Nuevo León, Mexico

** Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey, Nuevo León, Mexico

*** Facultad de Ciencias Biológicas, División de Estudios de Postgrado, Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey, Nuevo León, Mexico

**** División de Biología de la Reproducción, Centro de Investigación Biomédica de Occidente, IMSS, Monterrey, Nuevo León, Mexico

Introduction

Entamoeba histolytica is the causative parasite of amebiasis. This protozoa presents two phases in its life cycle: trophozoite and cyst. The knowledge of molecular and cell biology of cysts is still quite limited. This is mainly due to the unavailability of a method to massively produce cysts in axenic conditions (1). We recently showed that *E. histolytica* cultivated under axenic conditions in PEHPS medium forms mature cysts having a weak wall (2). The wall of *E. invadens* and natural *E. histolytica* cysts contain chitin (3). This polysaccharide is responsible for the characteristic resistance of the cyst wall. Das and Gillin in 1991 described in *E. invadens*, a chitin synthase dependent of Mn^{2+} and Co^{2+} (4). In other microorganisms Mg^{2+} , Mn^{2+} , and Co^{2+} are chitin synthase cofactors. In the present study we analyzed the effect of variable concentrations of Mg^{2+} , Mn^{2+} and Co^{2+} on the chitin synthesis of encysting *E. histolytica* amebas maintained in PEHPS medium in axenic conditions.

Materials and Methods

Encystation. The *E. histolytica* HM-1:IMSS strain was used in all experiments. The amebas were main-

tained in PEHPS medium (3). Glass 16 x 125 mm screw-capped tubes containing 11 ml medium were inoculated with 1×10^3 trophozoites (growing logarithmically) per ml. The cultures were incubated at 37°C for 3 days. Afterwards, the spent medium was discarded and the tubes refilled with fresh medium added with variable concentrations of $MgCl_2$, $MnCl_2$ and $CoCl_2$. Twenty combinations of divalent cations were tested, which were calculated by Simplex method (5). The cultures were incubated at 37°C for 7 days. The cysts were harvested and washed two times with double-distilled water.

Cyst Wall Resistance to Sodium Dodecyl Sulfate (SDS). The cysts were resuspended in 1 ml double-distilled water, counted with a hemacytometer and distributed in aliquots of 200 μ l. Each of them was mixed with 200 μ l of variable concentrations of SDS (0-1%). The mixtures were incubated for 10 min at room temperature and the percentage of refringent cyst determined.

Polysaccharide Purification and Hydrolysis. One hundred mg of freeze-dried *E. histolytica* cysts were resuspended in 5 ml double-distilled water and sonicated (10 cycles of 75 W/30 sec). This preparation was centrifuged. The resultant pellet was washed three times and incubated with 5 ml 2 N HCl. Then the resistant material was washed two times with double-distilled water, resuspended in 1.0 ml ethanol: 1 N NaOH (2:1), heated in boiling water for 5 min and filtered through a microfiber-glass filter. The filter was washed with 3 ml double-distilled water and the eluted material freeze-dried.

Correspondence to:

Dr. Salvador Said Fernández, División de Biología Celular y Molecular, Centro de Investigación Biomédica del Noreste, IMSS, Apdo Postal 020-E, Col. Independencia, Monterrey, Nuevo León 64720 México, Tel. (81) 343-1251, FAX. (81) 344-4116

Presenting author: Eduardo Campos Gongora

¹ This project was partially supported by CONACYT, México, Grants 264100-5-1379PM and F32-M9212. A fellowship was awarded to ECG by CONACYT

Determination of the Antiamebic Effect of a Metronidazole/Gossypol Blend¹

DELIA ELBA CRUZ-VEGA,** EDUARDO CAMPOS-GONGORA,*
SALVADOR SAID-FERNANDEZ* and MARIA TERESA GONZALEZ-GARZA*

*División de Biología Celular y Molecular

**División de Farmacología, Centro de Investigación Biomédica del Noroeste, IMSS, Monterrey, Nueva León, Mexico

Introduction

Metronidazole is one of the most widely used medication against Trichomoniasis, Giardiasis and Amebiasis (1). However, due to its toxic effects on DNA (2-6), metronidazole is considered a potential carcinogenic chemical by the International Agency for Research on Cancer (7). On the other hand, gossypol, a polyphenol extracted from several species of cotton (*Gossypium sp.*) has a potent *in vitro* and *in vivo* antiamebic activity; these being, respectively, 39 (8) and nine times higher than that of metronidazole. Nevertheless, the margin between the most effective and lethal doses of gossypol is relatively narrow (9).

Materials and Methods

We currently determined the antiamebic effectiveness of a blend series where the concentration of metronidazole and gossypol was varied and tested systematically. In the experiments where the gossypol/metronidazole blends were tested, the concentration of each drug was calculated following the Basic Sequential Analytical Simplex Method (10). The analysis was started with blends 1-3, with drug concentrations equivalent to sub-multiples from each drug IC_{50} (metronidazole, 204 nM and gossypol, 20 nM). The above IC_{50} values were calculated as described elsewhere (8). Blend (1) con-

tained 1/2 IC_{50} metronidazole plus 1/2 IC_{50} gossypol; blend (2), 1/2 IC_{50} metronidazole, 1/4 IC_{50} gossypol, and blend (3) 1/4 IC_{50} metronidazole plus 1/2 IC_{50} gossypol. The culture tubes, containing 11 ml medium and 1×10^7 amebas/ml, were mixed with 50 μ l from each drug solution, concentrated 200 times with respect to their final concentration. The tubes were incubated for 72 h at 36°C, cooled on ice water for 10 min and the number of trophozoites/ml in each tube determined with an haemocytometer.

The results were estimated as the percentage of growth inhibition with respect to the untreated controls.

Results and Discussion

The combination that produced the best results corresponded to the blend of 8.5 nM gossypol and 140.36 nM metronidazole, corresponding to a molar relationship of 1:17. Thus, metronidazole (88.61 nM)/gossypol (9.95 nM) blend could be the best alternative to be tested *in vivo*. In our assay conditions, this blend produced one of the highest amebic growth inhibitory effects with drug concentrations 50% lower than those required to produce a similar effect with metronidazole or gossypol alone.

When metronidazole and gossypol were tested separately at the same concentrations used in the best blend, an inhibitory effect of 40.4% and 21.8%, respectively was observed. These results indicate that the inhibitory effect observed with the blend is the result of an antiamebic additive synergism of gossypol and metronidazole.

The results here presented strongly suggest that it is possible to reduce the metronidazole and gossypol doses more than 50% if these are used combined instead of alone. Nevertheless, this possibility needs to be investigated *in vivo*.

Correspondence to:

Dr. Ma. Teresa González Garza y Barrón, División de Biología Celular y Molecular, Centro de Investigación Biomédica del Noroeste, IMSS, Administración de Correos No. 4, Apartado Postal 20, Monterrey, Nuevo León 64720 México. Tel and FAX: (81) 344 4116; e-mail: mtgonzal@academf11.inty.itsem.mx

¹ This project was partially supported by CONACYT (México) grant F328-M9212.

ORIGINAL ARTICLE

Mg, Mn, and Co Ions Enhance the Formation of *Entamoeba histolytica* Cyst-Like Structures Resistant to Sodium Dodecyl Sulfate

Eduardo Campos-Góngora,***** Jose María Viader-Salvadó,*****
Herminia Guadalupe Martínez-Rodríguez,***** Miguel Angel Zuñiga-Charles,**
Juan Mora Galindo*** and Salvador Said-Fernández*

*División de Biología Celular y Molecular.

****Facultad de Ciencias Biológicas

*****Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina

*****Departamento de Microbiología, Facultad de Medicina Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey, Nuevo León, Mexico

**División de Farmacología, Instituto Mexicano del Seguro Social, Monterrey, Nuevo León, Mexico

***División de Biología, Centro de Investigación Biomédica de Occidente, Instituto Mexicano del Seguro Social, Guadalajara, Jalisco, Mexico

Received for publication May 26, 1999, accepted November 25, 1999 (99/075).

Background. *Entamoeba histolytica* forms cyst-like structures (CLS) in PEHPS but not in TY1-S-33 medium. Sodium dodecyl sulfate [(SDS (0.1%)] dissolves most of them in 10 min, but not natural cysts. Chitin is responsible mainly for cyst wall resistance. Its synthesis depends on Mg^{2+} , Mn^{2+} , or Co^{2+} , whose action is interactive. With the aid of the Simplex method, we analyzed the effect of 20 blends of these cations to find the one that, when added to PEHPS, produced the highest proportion of CLS resistant to 1% SDS (RCLS).

Methods. The concentration of Mg^{2+} , Mn^{2+} , and Co^{2+} was determined in PEHPS and TY1-S-33 with a flame atomic absorption spectrometer. The proportion of RCLS produced in PEHPS with each ion blend was tested. The CLS and RCLS affinity to fluorescein wheat germ agglutinin (WGA/FITC), which binds chitin, was determined.

Results. PEHPS contained a similar concentration of Co^{2+} (0.52 μM) and 3.4 and 1.6 times more Mg^{2+} (798 μM) and Mn^{2+} (3.15 μM) than TY1-S-33, respectively. The proportion of RCLS increased gradually in PEHPS until reaching $3.6 \pm 1.43\%$ with $MgCl_2$ 1.22 mM, $MnCl_2$ 14.44 mM, and $CoCl_2$ 19.44 mM (ion blend No. 20). Both CLS and RCLS bound WGA/FITC. The RCLS formed in the presence of ion blend No. 20 appeared wrinkled.

Conclusions. Mg^{2+} , Mn^{2+} , and Co^{2+} enhanced the ability of PEHPS to form RCLS, possibly because these ions stimulated their chitin synthesis. Although ion blend No. 20 produced the highest proportion of RCLS, this high ion concentration may be toxic for encysting amebas. © 2000 IMSS. Published by Elsevier Science Inc.

Key Words: *Entamoeba histolytica*, Encystation, Cysts, Chitin synthases, Divalent cations, Cyst cell wall, Detergents, Hypotonic shock, Basic Sequential Simplex Method

Introduction

The wall synthesis in *Entamoeba histolytica* cysts is not well understood. This is due mainly to the fact that this spe-

cies rarely forms cysts in currently available culture media.

We previously reported (1) that *E. histolytica*, grown under axenic conditions in PEHPS medium, formed spontaneously cyst-like structures (CLS) at the tenth day of incubation (57% of the entire population). These structures had a cell diameter ($18.3 \pm 4.1 \mu m$) and microscopic appearance similar to those of natural cysts. Some (1.2%) were tetranucleated. All CLS had a bi-refrigent wall and resisted lysis by distilled water. CLS bind calcofluor M2R and anti-

Address reprint requests to Salvador Said-Fernández, División de Biología Celular y Molecular, Centro de Investigación Biomédica del Noroeste, Instituto Mexicano del Seguro Social, Apartado Postal 020-E, Colonia Independencia, 64720, Monterrey, Nuevo León, México. FAX: (528119) 3035. E-mail: salvadorsaid@norscape.net

Identification of Seven Chemical Factors That Favor High-Quality *Entamoeba histolytica* Cyst-Like Structure Formation Under Axenic Conditions

Francisco González-Salazar,^{*,**} José M. Viader-Salvadó,^{***} Herminia G. Martínez-Rodríguez,^{****} Eduardo Campos-Góngora,^{*} Benito D. Mata-Cárdenas^{*} and Salvador Said-Fernández^{*}

^{*}División de Biología Celular y Molecular, Centro de Investigación Biomédica del Noreste, Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS)

^{**}Facultad de Ciencias Biológicas, División de Estudios de Posgrado,

^{***}Departamento de Microbiología,

^{****}Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Nuevo León (UANL), Monterrey, Nuevo León, Mexico

Key Words: *Entamoeba histolytica*, Encystation, Cysts, Simplex method.

Introduction

The biological cycle of *Entamoeba histolytica* consists of two stages: cyst (infective form), and trophozoite (invasive form). While the molecular and cell biology of trophozoites has been intensively studied, encystation is still poorly understood. This fact is mainly due to the absence of a culture medium that permits massive encystation under axenic conditions. We previously pointed out that *E. histolytica* spontaneously forms cyst-like structures (CLS) in PEHPS culture medium. The wall of most CLS did not resist the lytic effect of 0.4% sodium dodecyl sulfate (SDS) (1). Notwithstanding, when PEHPS was supplemented with an Mg^{2+} (1.22 mM), Mn^{2+} (14.44 mM), and Co^{2+} (19.44 mM) ion blend, the CLS wall resisted 1% SDS for 10 min, although these cells showed an irregular shape and a wrinkled surface (2). In this study, with the aid of the Simplex method (3), we analyzed the effect of 10 factors on high-quality CLS formation (HQ-CLS), under axenic conditions.

Materials and Methods

Amebas and cultivation methods. The *E. histolytica* HM-1: IMSS strain was used in all experiments. Twenty-five media were designed and tested with the aid of the Simplex method modified for multiple variables and multiple responses (3).

The study was performed in four steps. In the first, a matrix of 11 media containing all 10 chemical factors under

study was tested, and the concentration of the factors producing the worst and best results was determined. During the study, the concentration of each factor in the previously mentioned media varied between a lowest and highest limit, chosen arbitrarily. The factors studied and their initial concentration limits were the following: bovine serum (0–1%); glucose (0–6%); sodium tetraborate (0–4 mM); $MgCl_2$ (1–4 mM); $MnCl_2$ (1–10 mM); $CoCl_2$ (1–10 mM); liver and pancreas extract (0–2.5%) (4); Diamond's vitamin mixture 107 (0–0.05%); phosphate (0–0.66 mM), and $CaCl_2$ (0–4 mM). To conform the second set of media, the 10 factors producing the worst results in step 1 were discarded, while the one that produced the best results was kept. By taking into account the concentration of each particular factor in media producing the worst and the best results, a second set of 10 new media were calculated. Results obtained with each media from the second set were compared with results obtained with the best media from the first set (3). By following this procedure, four additional media were discarded and substituted by four new media, which conformed the third set. The corresponding results were compared with the results of the former media, discarding only one medium. The substituting medium conformed the fourth set. The study was finished when the latter media produced worse results than those produced by any of the former.

All media were freshly prepared, using a basal medium (Casein peptone 2% in double-distilled water). This medium was distributed in 6-mL aliquots, in glass 16 × 125-mm screwcap tubes, and appropriate volumes of each of the previously described components were added, reaching a final volume of 12 mL. All tubes were gently stirred, immediately inoculated with 2.1×10^6 trophozoites, and incubated for 7 days at 37°C. All determinations were made in triplicate.

HQ-CLS evaluation. The biological quality of HQ-CLS produced in each of the previously described media was es-

Address reprint requests to: Salvador Said-Fernández, Centro de Investigación Biomédica del Noreste, Av. 2 de Abril y San Luis Potosí, Colonia Independencia, 64720 Monterrey, Nuevo León, México. Telefax: (+52) (81) 190-4033, E-mail: salvadorsaid@netscape.net

Presenting author: Francisco González-Salazar

ORIGINAL PAPER

Introns of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar*

Ute Willhoeft, Eduardo Campos-Góngora, Sassia Touznl, Iris Bruchhaus, and Egbert Tannich¹

Bernhard Nocht Institute for Tropical Medicine, Bernhard Nocht Str. 74, 20359 Hamburg, Germany

Submitted March 23, 2001; Accepted May 10, 2001
Monitoring Editor: R. Iain Wilson

The genome of *Entamoeba histolytica* is considered to possess very few intervening sequences (introns), as only 5 intron-containing genes from this protozoan parasite have been reported so far. However, while sequencing a number of genomic contigs as well as three independent genes coding for ribosomal protein L27a, we have identified 9 additional intron-containing genes of *E. histolytica* and the closely related species *Entamoeba dispar*, indicating that introns are more common in these organisms than previously suggested. The various amoeba introns are relatively short comprising between 46 and 115 nucleotides only and have a higher AT-content compared to the corresponding exon sequences. In contrast to higher eukaryotes, amoeba introns do not contain a well-conserved branch point consensus, and have extended donor and acceptor splice sites of the sequences GTTTGTT and TAG, respectively. Consistent with the close phylogenetic relationship of *E. histolytica* and *E. dispar*, the position and length of introns is conserved between the two species but the degree of sequence identity is reduced compared to orthologous coding regions.

Introduction

The two intestinal protozoan parasites *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* are the closest relatives among all *Entamoeba* species known so far (Clark and Diamond 1997). Both organisms are indistinguishable by morphological criteria and highly similar in genetic background, cell biology and host range (Diamond and Clark 1991). Their close phylogenetic relationship is underlined by the fact that rRNA sequences are as much as 98.4% identical. Despite these similarities the two amoeba species have different properties with regard to pathogenicity. Both colonize the human gut but only *E. histolytica*

is able to cause invasive diseases such as hemorrhagic colitis or extraintestinal abscesses. *E. dispar* is a harmless gut commensal without any pathogenic potential. Thus, the comparison of the two organisms constitutes an interesting area of research towards the identification and analysis of factors that might be instrumental for amoeba pathogenicity.

Recently performed DNA comparisons by Southern blot analysis with a considerable number of *E. histolytica* cDNA probes identified 3 genes that are absent or non-functional in *E. dispar* (Bruchhaus et al. 1996; Willhoeft et al. 1999a; 1999b). In contrast, all other genes as far as investigated are well conserved between the two species and on average, orthologous coding and noncoding sequences

¹ Corresponding author;
fax 49-40-42818-512
e-mail tannich@bni.uni-hamburg.de

not differ significantly ($P > 0.05$) with change in concentration of acetylcholine.

Adaptation to the stimulus was noted in several of the recordings. Three of the 5 nematodes tested showed adaptation within the 2-min period of exposure to 100 mM acetylcholine: adaptation occurred from 54, 89, and 101 sec after the onset of a response. The other 2 recordings showed sustained levels of activity throughout the 2 min. In the response to 10 mM acetylcholine, all 5 nematodes showed adaptation within the 2 min that they were exposed to the stimulus. The mean time taken before adaptation became evident was 21.8 ± 5.3 sec after the onset of a response.

The perfusion system enables sequential exposure of the same nematode to different concentrations of acetylcholine. To verify the contrasting responses to 0.1 and 10 mM acetylcholine, recordings were taken from 5 adult female *L. appendiculata* for a 2-min period prior to, and during, stimulation with 0.1 mM acetylcholine. The acetylcholine was then washed off with fresh PBS, and recording was continued for a further 2 min before each nematode was stimulated with 10 mM acetylcholine. The means and standard errors of the number of spikes per second before, during, and after exposure to 0.1 mM acetylcholine were 0.06 ± 0.02 , 0.10 ± 0.02 , and 0.11 ± 0.02 , respectively; during and after exposure to 10 mM acetylcholine, the values were 0.60 ± 0.08 and 0.11 ± 0.03 , respectively. These data confirmed that there was no increase ($P > 0.05$) in electrical activity on stimulation with 0.1 mM acetylcholine, whereas subsequent exposure to 10 mM acetylcholine elicited a significant ($P \leq 0.05$) response. A typical recording showing the activity obtained from the sequential exposure of an adult female *L. appendiculata* to 0.1 mM acetylcholine and 10 mM acetylcholine is given in Figure 1.

This work on *L. appendiculata* demonstrates the use electrophysiological techniques to record sensory responses from an insect-parasitic nematode. It also demonstrates concentration-dependent responses from a live intact nematode and shows that the use of a perfusion system, allowing a live nematode to be exposed sequentially to different concentrations of a test compound, is a feasible experimental approach to define concentration levels that trigger a response. Colquhoun et al. (1991) mea-

sured the membrane potential of excised somatic muscle cell of *Ascaris suum* in response to acetylcholine and agonists. Acetylcholine depolarized the cells with a threshold around 1 μ M. In the present work, using whole intact nematodes, the threshold concentration below which there was no increase in spike activity was much higher, between 0.1 and 1 mM; it was less than 0.1 mM for *G. rostochiensis* (Rolfe et al., 2000). The actual concentration that is triggering a response in the nematode is likely to be lower than the externally applied concentration and may account for these differences.

Evidence for the role of acetylcholine in *Caenorhabditis elegans* comes from a variety of experimental approaches (Rau and Nonet, 1997), but as yet, no neurotransmitter specific has been assigned to neurons associated with the amphids, the main chemosensilla of nematodes. The increase in spike activity on addition of acetylcholine to *L. appendiculata* could indicate a role in the chemosensory neurons of nematodes (with entry via the cuticle or through the amphidial pore). Alternatively this increase in activity could be due to a chemotactic response indicating an acetylcholine receptor on the amphidial surface or a receptor that shows promiscuous binding.

R.N.R. was supported by a Biotechnology and Biological Sciences Research Council (BBSRC) studentship that is gratefully acknowledged. IACR receives grant-aided support from the BBSRC of the United Kingdom.

LITERATURE CITED

- COLQUHOUN, L. L., HOLDEN-DYE, AND R. WALKER. 1991. The pharmacology of cholinceptors on the somatic muscle cells of the parasitic nematode *Ascaris suum*. *Journal of Experimental Biology* 509-530.
- RAND, J. B., AND M. L. NONET. 1997. Synaptic transmission. In *C. elegans II*. D. L. Riddle, T. Blumenthal, B. J. Meyer, and J. Preiss (eds.). Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, p. 611-643.
- ROLFE, R. N., J. BARRETT, AND R. N. PERRY. 2000. Analysis of chemosensory responses of second stage juveniles of *Globodera rostochiensis* using electrophysiological techniques. *Nematology* 523-533.
- ROTH, L. M., AND E. R. WILLIS. 1960. The bionic associations of cockroaches. *Smithsonian Miscellaneous Collections* 141: 190-211.

Mg²⁺, Mn²⁺, and Co²⁺ Stimulate *Entamoeba histolytica* to Produce Chitin-like Material

S. Said-Fernandez, E. Campos-Góngora*, F. González-Salazar*, H. G. Martínez-Rodríguez†, J. Vargas-Villarreal*, and J. M. Viac-Salvador‡, División de Biología Celular y Molecular, Centro de Investigación Biomedica del Noroeste, Instituto Mexicano del Seguro Social, Apartado Postal 020-E, Colonia Independencia 64720, Monterrey, Nuevo León, México. *Facultad de Ciencias Biológicas, División de Estudios de Postgrado, Universidad Autónoma de Nuevo León, Ciudad Universitaria, 66451 San Nicolás de los Garza, Nuevo León, México. †Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Nuevo León, Avenida Madero y José E. González, Monterrey, Nuevo León, México. ‡Departamento de Microbiología, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Nuevo León, Avenida Madero y José E. González, Monterrey, Nuevo León, México. Apartado Postal 1563

ABSTRACT: The mechanism of *Entamoeba histolytica* cyst cell wall synthesis is not well understood. Previous research has shown that cyst-like structures formed in the presence of chitin synthase cofactors (Mg²⁺, Mn²⁺, and Co²⁺) resist 1% sodium dodecyl sulfate lysis (RCLS),

whereas those formed in the absence of cofactors (CLS) do not. Trophozoites are immediately destroyed. This suggests that *E. histolytica* is able to synthesize chitin, initiating a differentiation process in axenic conditions. To test this hypothesis, polysaccharide hydrolysis



