



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS
DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**

UNIDAD ZACATENCO

**DEPARTAMENTO DE INFECTÓMICA Y PATOGÉNESIS
MOLECULAR**

Participación de *EhRab21* en la movilización del receptor
tipo integrina *Eh β 1FNR* en *Entamoeba histolytica*

TESIS

Que presenta

Biol. LUIS ALEJANDRO CONSTANTINO JONAPA

Para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS

EN INFECTÓMICA Y PATOGÉNESIS MOLECULAR

DIRECTORA DE LA TESIS:

DRA. PATRICIA TALAMÁS ROHANA

México, D.F.

Julio de 2015

DEDICATORIA

A mi madre y a mi hermano por darme todo el apoyo necesario para seguir adelante y cumplir mis metas. Sin su apoyo esto no sería posible.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Patricia Talamás Rohana por haberme dado la confianza y sus enseñanzas para la realización de este proyecto.

Al Dr Mario Alberto Rodríguez y la Dra. Mireya de la Garza por la asesoría y sugerencias durante la realización del proyecto.

A Carlos Osorio y Verónica Hernández por su valioso conocimiento y guía para la realización y planeación de los experimentos.

A Belem de Luna por el apoyo técnico durante la estancia en el laboratorio.

A María Elena Cisneros, Irma Miranda y Martha Dueñas por el apoyo secretarial.

A mis compañeros del laboratorio 9: Alfredo Toledo, Julio Villegas, Jonathan Cisneros, Mayra Herrera y Diana Pichardo por compartir sus conocimientos y amistad.

A mis compañeros de generación por dos años de convivencia y esfuerzos vividos durante la maestría.

A mis amigos de Chiapas: Thomas Ochoa, Emilio Solís, Sergio Hernández, Alejandra León, Ariadna Jiménez y Alexis de Aquino por el apoyo brindado durante mi estancia en el Distrito Federal.

Al CONACYT por brindarme el apoyo económico con la beca # 369237, la cual fue indispensable durante la maestría.

ÍNDICE

Resumen	viii
Abstract	ix
I. Introducción.....	1
1.1 Generalidades de <i>Entamoeba histolytica</i>	1
1.2 Patogénesis	2
1.3 Tráfico vesicular	3
1.4 Integrinas	4
1.5 Receptor <i>Eh</i> β 1FNR.....	7
1.6 GTPasas pequeñas de la familia Rab	8
1.7 Vía endocítica	10
II. Antecedentes	16
III. Justificación.....	20
IV. Hipótesis	21
V. Objetivos.....	22
5.1 Objetivo general	22
5.2 Objetivos específicos	22
VI. Metodología	23
6.1 Purificación de fibronectina	23
6.2 Cultivo celular.....	23
6.3 Proteína recombinante <i>EhRab21</i>	23
6.4 Producción de anticuerpos policlonales en hámster contra la proteína <i>EhRab21</i> recombinante.	23
6.5 Anticuerpos y sondas.....	24
6.6 Preparación de extractos totales	25
6.7 Interacción de trofozoítos de <i>E. histolytica</i> con fibronectina.....	25
6.8 Identificación de <i>EhRab21</i> por western blot	26
6.9 Análisis por microscopía confocal.....	27
6.10 Movilización del receptor <i>Eh</i> β 1FNR y <i>EhRab21</i>	27

6.11 Localización subcelular de <i>EhRab21</i>	28
6.12 Análisis de FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer)	29
VII. RESULTADOS	30
7.1 Obtención de anticuerpos α -Rab21 en hámster	30
7.2 Movilización y localización subcelular del receptor <i>Ehβ1FNR</i> y de <i>EhRab21</i>	32
7.3 Ruta de internalización del receptor <i>Ehβ1FNR</i> y de <i>EhRab21</i>	41
7.4 Interacción entre <i>Ehβ1FNR</i> y de <i>EhRab21</i> (Análisis por FRET)	48
VIII. Discusión	50
IX. Conclusión	56
X. Perspectivas	57
XI. Literatura citada	58

Índice de figuras

Figura 1. Activación y señalización de integrinas.	6
Figura 2. Representación tridimensional de Rab3a.	11
Figura 3. Ciclo de las GTPasas Rab.	12
Figura 4. Compartimientos de la vía endocítica.	15
Figura 5. Colocalización <i>Eh</i> β 1FNR y <i>Eh</i> Rab21 en trofozoítos aislados de pacientes con colitis fulminante.	19
Figura 6. Colocalización <i>Eh</i> β 1FNR, <i>Eh</i> Rab21 y Lysotracker en trofozoítos aislados de pacientes con colitis fulminante.	19
Figura 7. Purificación de la proteína <i>Eh</i> Rab21 recombinante.	31
Figura 8. Producción de anticuerpos anti-Rab21 en hámster.	31
Figura 9. Western Blot de <i>Eh</i> Rab21 en extractos totales de <i>E. histolytica</i>	31
Figura 10. Western Blot de <i>Eh</i> Rab21 en trofozoítos expuestos a fibronectina.	31
Figura 11. Localización de <i>Eh</i> β 1FNR y <i>Eh</i> Rab21. Control de interacción con vidrio durante 15 min.	34
Figura 12. Localización de <i>Eh</i> β 1FNR y <i>Eh</i> Rab21. Interacción de trofozoítos con fibronectina durante 15 min.	35
Figura 13. Localización de <i>Eh</i> β 1FNR y <i>Eh</i> Rab21. Interacción de trofozoítos con fibronectina durante 30 min.	36
Figura 14. Localización de <i>Eh</i> β 1FNR y <i>Eh</i> Rab21. Interacción de trofozoítos con fibronectina durante 60 min.	37
Figura 15. Localización de <i>Eh</i> β 1FNR y <i>Eh</i> Rab21. Interacción de trofozoítos con fibronectina durante 5 h.	38

Figura 16. Localización de <i>Eh</i> β1FNR y <i>Eh</i> Rab21. Control de interacción con vidrio durante 5 h.....	39
Figura 17. Localización de <i>Eh</i> β1FNR y <i>Eh</i> Rab21. Trofozoítos incubados durante 0 min en vidrio después de 1 h de interacción con fibronectina.....	40
Figura. 18. Marcaje de aparato de Golgi y <i>Eh</i> Rab21.....	43
Figura 19. Marcaje de fagosomas.....	44
Figura 20. Marcaje de endosomas con FITC-Dextrán.....	45
Figura 21. Inmunofluorescencia de <i>Eh</i> Rab21 y <i>Eh</i> β1FNR durante la eritrofagocitosis.....	46
Figura 22. Marcaje de lisosomas.	47
Figura 23. Análisis de FRET.....	49

Resumen

Entamoeba histolytica posee un receptor de fibronectina (FN) tipo integrina (*Eh* β 1FNR) el cual está relacionado funcional e inmunológicamente con la integrina β 1 de humano. La interacción de este receptor con fibronectina es importante para la adhesión de trofozoítos, sugiriendo que esta proteína tiene una función esencial en la patogenia del parásito. La localización subcelular de este receptor responde a señales activadas por componentes del hospedero, dependiendo de la maquinaria de tráfico vesicular para moverse desde el citoplasma hacia la membrana plasmática y/o viceversa; sin embargo, la maquinaria involucrada en este tráfico se desconoce. Las GTPasas pequeñas de la familia Rab son responsables de regular el tráfico vesicular en células eucariontes. Rab21 y Rab5 participan en el tráfico de integrinas en células de mamífero, lo cual es importante para la adhesión, migración y división celular. Por lo tanto, la regulación de este tráfico es esencial para el ciclo celular y su alteración predispone a la aparición del cáncer. El genoma de *E. histolytica* contiene alrededor de 100 genes que codifican proteínas Rab, entre los cuales se encuentra un homólogo de Rab21.

En este estudio se analizó el tráfico del receptor tipo integrina *Eh* β 1FNR mediado por *Eh*Rab21. En trofozoítos estimulados con fibronectina, *Eh* β 1FNR y *Eh*Rab21 se colocalizaron en vesículas, además, por análisis de FRET, se encontró que ambas proteínas son capaces de interactuar directamente. *Eh*Rab21 se localizó en lisosomas, sugiriendo que esta GTPasa es importante para la fusión de estos con endosomas tardíos.

Por lo tanto, *Eh*Rab21 participa, probablemente durante la degradación del cargo como fibronectina, bacterias o eritrocitos. Sin embargo, la función de la interacción *Eh*Rab21/*Eh* β 1FNR en el tráfico del receptor no es clara todavía.

Abstract

Entamoeba histolytica has an integrin-like fibronectin receptor (Eh β 1FNR), which is functionally and immunologically related to the human β 1 integrin. Interaction of this receptor with fibronectin (FN) is important for *E. histolytica* trophozoites adhesion, suggesting that this protein plays an essential role in the pathogenesis of the parasite. The subcellular location of this receptor responds to signals triggered by host components, depending on the cellular trafficking machinery to move from the cytoplasm to the plasma membrane and/or vice versa; however, the machinery involved in this trafficking is not completely known. Rab Small GTPases are responsible for regulating vesicular trafficking in eukaryotic cells. Rab21 and Rab5 participate in the Integrin trafficking in mammalian cells, which is important for adhesion, migration and cell division. Therefore, the regulation of this trafficking is essential for the cell cycle and its alteration predisposes to the appearance of cancer. The *E. histolytica* genome contains about 100 genes that code for Rab proteins, among which there is a homolog of Rab21 (*EhRab21*).

In this study, the trafficking of Eh β 1FNR mediated for *EhRab21* was analyzed. In FN-stimulated trophozoites analyzed by confocal microscopy, *EhRab21* and Eh β 1FNR co-localized in vesicles, moreover, by FRET analysis, it was found that both proteins were able to interact directly with Eh β 1FNR. *EhRab21* was located in lysosomes suggesting that this small GTPase is important for the fusion of these organelles with late endosomes into the degradation pathway.

Thus, *EhRab21* participates in the endocytic pathway, probably during the degradation of the cargo, such as FN, erythrocytes or bacteria. However, the function of the *EhRab21*/ Eh β 1FNR interaction into the trafficking of the receptor is not clear yet.

I. Introducción

1.1 Generalidades de *Entamoeba histolytica*

Entamoeba histolytica es un parásito protozoario del intestino del hombre, el cual, es el agente causal de la colitis amibiana y de amibiasis sistémica. La infección por este parásito es endémica en muchas partes del mundo donde la infraestructura sanitaria es pobre y la población no tiene acceso a agua limpia (WHO, 1997).

El ciclo de vida de *E. histolytica* consiste en un intercambio entre la forma infectiva, el quiste; y la fase móvil patogénica, el trofozoíto. Los quistes son arrojados en las heces de los hospederos infectados, los cuales son transmitidos por ingestión de agua o comida contaminada. El desenquistamiento ocurre en el intestino delgado, y los trofozoítos, entonces, pueden colonizar el intestino grueso mientras evaden el sistema inmune del hospedero. Aunque la mayoría de las infecciones por *E. histolytica* son asintomáticas, los trofozoítos pueden penetrar la mucosa intestinal, dando lugar a colitis amibiana, la cual se caracteriza por la muerte de células epiteliales y células del sistema inmune, así como destrucción de tejido local. En ocasiones, el parásito puede entrar al torrente sanguíneo y se esparce sistémicamente, principalmente al hígado, y con menor frecuencia, hacia pulmones y cerebro (Haque *et al*, 2003).

Actualmente, los nitroimidazoles, como el metronidazol, son las mejores drogas para el tratamiento de la amibiasis invasiva (Haque *et al*, 2003). El 90 % de los pacientes tratados con estas drogas responde de manera eficaz a este tratamiento; sin embargo, hay un porcentaje que no responde al tratamiento y/o puede presentar efectos secundarios como reacciones alérgicas, neuropatías y síntomas gastrointestinales que afecten la tolerancia al tratamiento (Haque *et al*, 2003), por lo que es necesario conocer los aspectos moleculares del ciclo de vida y patogénesis del parásito.

1.2 Patogénesis

El nombre “*histolytica*” deriva de las palabras griegas para “tejido” y “disociar”. Acorde a su nombre, el parásito es capaz de destruir tejidos de manera extensa en el hospedero (Marie & Petri Jr, 2014). La invasión por *E. histolytica* inicia cuando los trofozoítos que residen en el colon agotan el moco intestinal, interaccionando con los enterocitos y provocando la ruptura de las uniones estrechas y la lisis de las células del hospedero, ocasionando pérdida de iones, lo cual da a lugar a diarrea (Meza, 2000).

Las lesiones amibianas en el epitelio pueden progresar a necrosis, formando úlceras conteniendo trofozoítos, bacterias y células inflamatorias. Desde estas úlceras, los trofozoítos pueden invadir la lámina propia e ingresar al torrente sanguíneo, donde pueden alcanzar el hígado y provocar un absceso hepático amibiano (AHA) (Marie & Petri Jr, 2014).

La interacción de los trofozoítos con la mucina es necesaria para iniciar la invasión de tejidos en el huésped, lo cual lleva a cabo a través de una lectina con gran afinidad a la galactosa y N-acetil-D-galactosamina (GalNAc) (Ralston & Petri Jr, 2011). Esta interacción inicial induce el adelgazamiento de la capa mucosal, la cual impide la interacción de los trofozoítos con las células epiteliales (Ralston & Petri Jr, 2011). El parásito es capaz de liberar un inductor de secreción de mucina, así como glicosidasas y proteasas capaces de degradar los polímeros de mucina (Marie & Petri Jr. 2014). Otro factor importante de la patogenia de este parásito, es la capacidad del trofozoíto de secretar ameboporos, las cuales son proteínas formadoras de poros que, funcionan de manera similar de manera similar a como lo hace el complejo de ataque a membrana del sistema inmune innato (Ralston & Petri Jr, 2011). Se han identificado tres ameboporos (A, B, C), los cuales pueden inducir poros en liposomas sintéticos y su actividad máxima la realizan a pH de 5.2. El influjo de calcio es otro proceso necesario para la patogenia del parásito, ya que inhibidores y quelantes de calcio bloquean la citotoxicidad, sugiriendo que este proceso es importante para la muerte de las células del hospedero (Ralston & Petri Jr, 2011).

E. histolytica también posee la habilidad de modular los eventos de fosforilación en la célula hospedera secretando o activando proteínas tirosina fosfatasas (PTPs), lo cual se asocia con la desactivación y muerte celular (Teixeira & Mann, 2002). La adhesión del parásito provoca una rápida disminución en los niveles de fosforilación en las células blanco, alterando la señalización dependiente de tirosina-cinasas (Teixeira & Mann, 2002).

Todos estos procesos son altamente controlados en el parásito, a través de la regulación del tráfico vesicular.

1.3 Tráfico vesicular

Debido a la compartimentalización que existe en las células eucariotas, se requiere del transporte, regulado y específico, de moléculas de un organelo a otro, para llevar a cabo un metabolismo correcto. Esto se logra mediante la comunicación de estos compartimientos a través de vesículas de transporte. Por ejemplo, las proteínas sintetizadas en el retículo endoplásmico deben ser transportadas al Golgi, y del Golgi a la membrana celular. Estas vesículas no se mueven aleatoriamente a través del citoplasma, ya que existen diversos factores que determinan el organelo blanco al que deben ser llevadas (Bhuin & Roy, 2014). El tráfico vesicular se divide en 4 mecanismos: 1) la selección del cargo y la formación de vesículas y/o túbulos; 2) el transporte de las vesículas a su membrana blanco, usando proteínas motoras para transportarse a través del sistema de microtúbulos o filamentos de actina; 3) el anclaje de la vesícula a la membrana blanco y finalmente 4) la fusión de esas vesículas con la membrana (Grosshans *et al*, 2006).

El tráfico vesicular juega un papel esencial en la virulencia de *E. histolytica* participando en la captación y digestión de nutrientes (bacterias, eritrocitos, restos celulares) en el lumen intestinal, la invasión de epitelio intestinal, la diseminación y el establecimiento de infecciones extraintestinales, incluyendo el absceso hepático, basándose en la fagocitosis y la pinocitosis, y en la secreción de enzimas hidrolíticas y los ameboporos (Welter *et al*, 2002).

1.4 Integrinas

Las integrinas, receptores heterodiméricos transmembranales, se clasifican como proteínas membranales tipo I por poseer un dominio extracelular largo, y un dominio intracelular corto (Bridgewater *et al*, 2012). La región extracelular del heterodímero se encarga de interactuar con componentes de la matriz extracelular, mientras que la región corta intracelular media la interacción con el citoesqueleto y proteínas de señalización, por lo que se consideran como la conexión entre el interior y el exterior de la célula (Bridgewater *et al*, 2012). Además de mediar la adhesión a la matriz extracelular, las integrinas regulan procesos biológicos clave como la migración, proliferación, apoptosis y angiogénesis (Bridgewater *et al*, 2012).

Las integrinas se componen de una subunidad α y una subunidad β , a través de la combinación de 18 subunidades α y 8 subunidades β , en mamíferos existen 24 heterodímeros. La combinación de ambas subunidades determina la especificidad de ligando e influye en la formación del complejo de adhesión intracelular. (Bridgewater *et al*, 2012).

Las integrinas existen en dos conformaciones: inactiva y doblada; o activa y extendida (Bouvard *et al*, 2013). En su estado inactivo, son incapaces de unirse a sus ligandos, por lo que necesitan de proteínas adaptadoras las cuales desencadenan el cambio conformacional a su estado activo (figura 1). Esta unión es controlada por señales citoplasmáticas, por lo que se le conoce como señalización “inside-out” (Bouvard *et al*, 2013). La activación requiere principalmente dos proteínas: talina y kindlina (Legate *et al*, 2009); estas dos proteínas se unen a las regiones citoplasmáticas de las subunidades β , permitiendo la exposición de las regiones extracelulares, y en consecuencia en la unión de diversos ligandos que facilitan la señalización y la transducción de señales (Legate *et al*, 2009). Esto se da a través de la formación de complejos que consisten de proteínas de andamiaje como talina, vinculina y paxilina, que unen este complejo con el citoesqueleto de actina; además de moléculas adaptadoras y de señalización como la cinasa de adhesión focal (FAK), la cinasa Src y la cinasa

vinculada a integrina (ILK), que inician la señalización canónica en las que participan ERK, JNK, AKT, o pequeñas GTPasas (señalización outside-in) (Legate *et al*, 2009).

El control de la disponibilidad de integrinas en la membrana celular es la clave para realizar su función. El reciclaje se define como el regreso de un receptor previamente internalizado a la superficie celular para su reutilización, completando el ciclo de tráfico de receptores (Pellinen *et al*, 2006). Después de la internalización, los receptores entran en un endosoma de clasificación, y aquí se decide si el cargo es reciclado de vuelta a la membrana o si es transportado hacia los endosomas tardíos para su posterior degradación. Una de las funciones en la que contribuye este proceso es en la migración. El reciclaje puede contribuir al funcionamiento de los complejos de adhesión, y de esta manera, regular directamente la interacción con la matriz extracelular y proteínas involucradas en la señalización de adhesión (Pellinen *et al*, 2006).

Este proceso está regulado por varias cinasas y proteínas motoras, así como por las proteínas Rab. Pellinen *et al* (2006) identificaron que Rab21 y Rab5 se asocian con las integrinas internalizadas, y su expresión es necesaria para la motilidad celular y adhesión a colágena *in vitro*, además de inducir el tráfico endosomal de integrinas.

Estas vías de reciclaje pueden activar directamente a la vía de Rho ya que el reciclaje del heterodímero $\alpha 5\beta 1$ vía Rab21 es necesario para la activación de RhoA en el surco de escisión, y por lo tanto, para la finalización de la citocinesis (Bridgewater *et al*, 2012). La pérdida de expresión de Rab21 conlleva la delección cromosomal e inestabilidad genética en células transformadas (Pellinen *et al*, 2008), por lo que la regulación de integrinas dependiente de Rab21 es esencial para la división celular, y su alteración contribuye a la multinucleación e inestabilidad genética, que son característicos del cáncer (Pellinen *et al*, 2008).

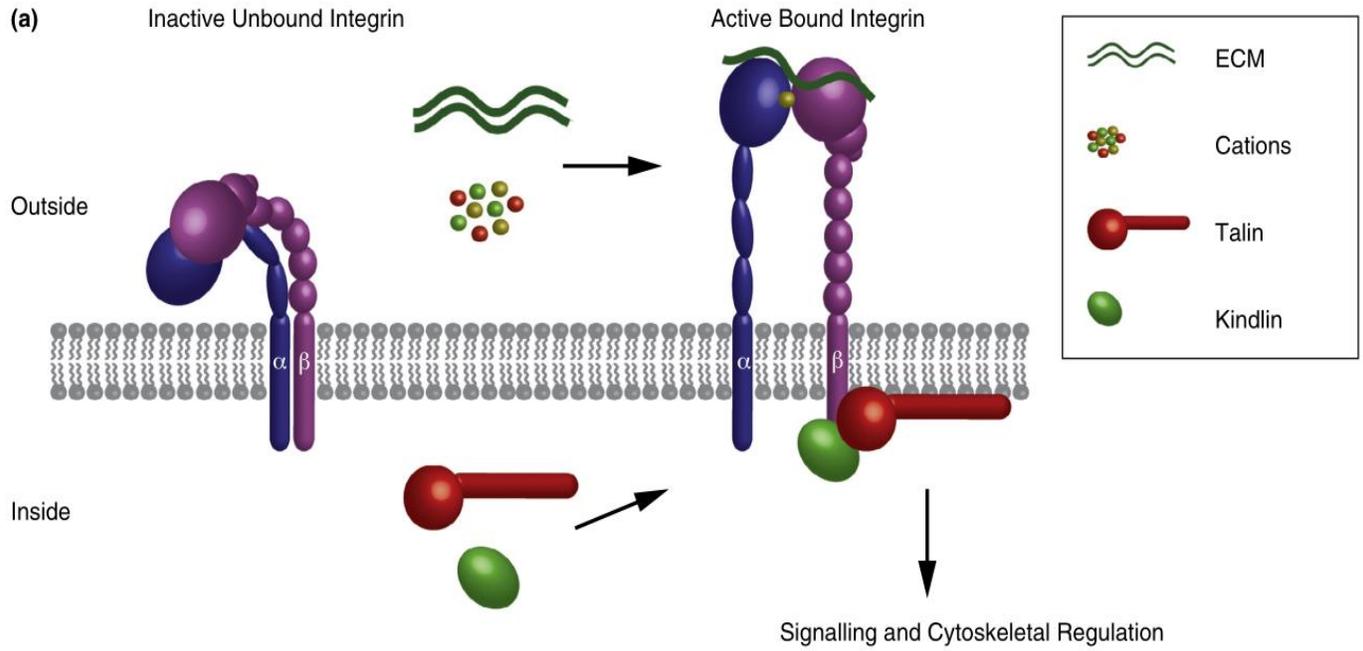


Figura 1. Activación y señalización de integrinas. Modificado de Eva & Fawcett (2014).

1.5 Receptor *Eh*β1FNR

En el genoma de *E. histolytica* no se han identificado secuencias que codifiquen para integrinas (Loftus *et al*, 2005). Sin embargo, Talamás-Rohana *et al* (1998), describieron que los trofozoítos al interactuar con fibronectina forman placas de adhesión, lo que demuestra que en *E. histolytica* existe un receptor para fibronectina. Este receptor se identificó como una proteína tipo integrina de 140 kDa (*Eh*β1FNR), la cual posee un 97 y 99 % de homología con las subunidades Igl1 e Igl2, respectivamente, de la lectina Gal/GalNAc (Hernández-Rámirez, *et al* 2007). Esta molécula de 140 kDa está relacionada inmunológicamente a las integrinas β1 de los eucariontes superiores, ya que un anticuerpo monoclonal denominado 3C10, producido en el laboratorio, reconoce la molécula de 140kDa, de la misma manera que el anticuerpo policlonal anti-*Eh*β1FNR y un anticuerpo comercial anti-integrina β1 de humano (Sengupta *et al*, 2001). A pesar de que *Eh*β1FNR es más pequeño que las integrinas de vertebrados, hay varias evidencias que indican la similitud con las integrinas eucariontes superiores: (1) medidas hidrodinámicas, (2) forma molecular, (3) la formación del “cluster” en forma de roseta en ausencia de detergente, (4) la habilidad para interactuar con actina y proteínas de unión a actina, (5) mecanismos de regulación endo/exocíticos y (6) la presencia del dominio EGF-like (Sengupta *et al*, 2009).

La interacción de este receptor con fibronectina activa mecanismos de transducción de señales, en el que participan proteínas con actividad de tirosina cinasa (TPK) (Sengupta *et al*, 2001). El bloqueo del receptor con el anticuerpo 3C10, inhibe la adhesión celular a las proteínas de la matriz extracelular, sugiriendo que el receptor juega un papel importante en estos procesos (Sengupta *et al*, 2001).

La regulación de este receptor, es a través de la movilización de citoplasma a membrana y/o viceversa; más que de degradación y/o síntesis (Hernández-Ramirez *et al*, 2007). Esta movilización en eucariontes superiores es regulada por las GTPasas pequeñas de la familia de proteínas Rab.

1.6 GTPasas pequeñas de la familia Rab

Las proteínas pequeñas de unión a GTP son interruptores moleculares en una gran variedad de procesos celulares, incluyendo proliferación, ensamble del citoesqueleto y tráfico membranal en todas las células eucariotas. Esta superfamilia está clasificada en 5 familias con base en sus secuencias primarias: Ras, Rho/Rac, Rab, Sar/Arf y Ran (Saito-Nakano, *et al* 2005),

Las proteínas Rab constituyen la familia más grande de las GTPasas pequeñas; hasta ahora se han identificado 11 en levaduras y más de 60 en humanos que pueden ser clasificadas en varios grupos funcionales y filogenéticos (Hutagalung & Novic, 2011). Las proteínas Rab poseen el doblez de GTPasa, compuesto de seis hojas β flanqueadas por cinco hélices α (Hutagalung & Novic, 2011). La región COOH-terminal al doblez de GTP-asa es la región hipervariable de las Rab seguida por cajas CAAX que normalmente contienen dos residuos de cisteínas, en donde motivos geranilgeranilo se unen covalentemente (Hutagalung & Novic, 2011). Las regiones de “Switch” I y II son los principales determinantes de la función de Rab dependiente de nucleótido, ya que ambas regiones hacen contacto con el fosfato γ del GTP (Hutagalung & Novic, 2011). También poseen secuencias de aminoácidos conservadas, llamadas F1-F5, que distinguen a las proteínas Rab de otros miembros de la superfamilia de RAS. Además de estas secuencias, también se pueden distinguir regiones semiconservadas, llamadas SF1-SF4, sin embargo, estas no se encuentran en todos los miembros de la familia, lo que permite agrupar a las proteínas Rab en subfamilias (Hutagalung & Novic, 2011). En la figura 2 se observa la estructura tridimensional de Rab3a indicando la posición de estas regiones.

Las GTPasas Rab funcionan como interruptores moleculares, ciclando entre unión a GTP (estado activo) o a GDP (estado inactivo) (Grosshans *et al*, 2006). Este cambio es regulado por factores intercambiadores de nucleótido (GEFs), los cuales intercambian el GDP por GTP; y proteínas activadoras de GTPasa (GAPs), las cuales aceleran la hidrólisis del GTP unido a GDP (Grosshans *et al*, 2006). En este ciclo las proteínas Rab también se someten a ciclos de inserción y

desprendimiento en la membrana. La inserción a la membrana requiere la modificación irreversible de dos cisteínas en el extremo carboxilo terminal con grupos geranilgeranilo (Grosshans *et al*, 2006). Una proteína llamada inhibidor de disociación de GDP (GDI) se une a las Rab-GDP, ocultando los grupos geranilgeranilo y mantiene a la proteína en el citosol (Grosshans *et al*, 2006). El anclaje de la membrana requiere un factor de desplazamiento de GDI (GDF), el cual remueve el GDI de la Rab, haciendo posible el anclaje a membrana a través de los grupos geranilgeranilo (Grosshans *et al*, 2006). Una vez activadas por un GEF, las proteínas Rab ya son capaces de realizar su función específica a través de sus distintos efectores. Después de la inactivación por acción de una GAP, la proteína Rab se desprende de la membrana por el GDI y es regresada de nuevo al citosol para repetir el ciclo nuevamente (Grosshans *et al*, 2006). El ciclo completo de las proteínas Rab puede observarse en la figura 3.

La función de las proteínas Rab es regular el tráfico vesicular. Se ha implicado la función de estas GTPasas pequeñas en regular la gemación/formación, transporte, anclaje y fusión de vesículas. Por lo general, cada proteína Rab está localizada en un organelo específico y controla una ruta de transporte en particular, por lo que son usados como marcadores de diversos organelos como el aparato de Golgi y el retículo endoplásmico. En la Tabla 1, se observa la función y localización de algunas proteínas Rab.

Mientras que la mayoría de los parásitos protozoarios posee un número reducido de genes Rab, *E. histolytica* y *Trichomonas vaginalis* poseen un amplio repertorios de genes Rab (Saito-Nakano *et al*, 2005; Carlton *et al*, 2007), sugiriendo que ambos parásitos dependen fuertemente del tráfico mediado por proteínas Rab. Se han identificado más de 100 proteínas Rab en el genoma de *E. histolytica* (Saito-Nakano *et al*, 2005); sin embargo, solo se han identificado las funciones de unas cuantas.

1.7 Vía endocítica

La vía endocítica en células de mamífero tiene una función esencial en el transporte de componentes de la membrana, ligandos asociados a receptor, moléculas solubles y captación de nutrientes (Maxfield & McGraw, 2004).

Desde el punto de vista funcional, la vía endocítica puede ser dividida en el “circuito de reciclaje” para la membrana plasmática y sus componentes, el “sistema degradativo” para la degradación de moléculas y el “sistema de conexión” para el transporte del cargo destinado a degradación desde el circuito de reciclaje temprano al sistema de degradación (Repnik *et al*, 2013). En la figura 4, se presenta un esquema de la vía endocítica.

A diferencia de otros organelos que participan en el tráfico vesicular, los compartimientos de la vía endocítica (los cuales han sido llamados endosomas) son objetos de discusión. La principal razón, es que a diferencia de los organelos de la vía exocítica, el aparato de Golgi y el retículo endoplásmico, que son de fácil reconocimiento por su forma y localización, los compartimientos de la vía endocítica son representados en vesículas que no forman grandes estructuras, por lo que hay algunos problemas con la diferenciación de estos compartimientos, lo cual resulta, en una terminología aceptada “no científica”: endosomas tempranos y endosomas tardíos. Estos términos provienen de los primeros estudios, en donde, el único marcador disponible era el cargo (Kornilova, 2014).

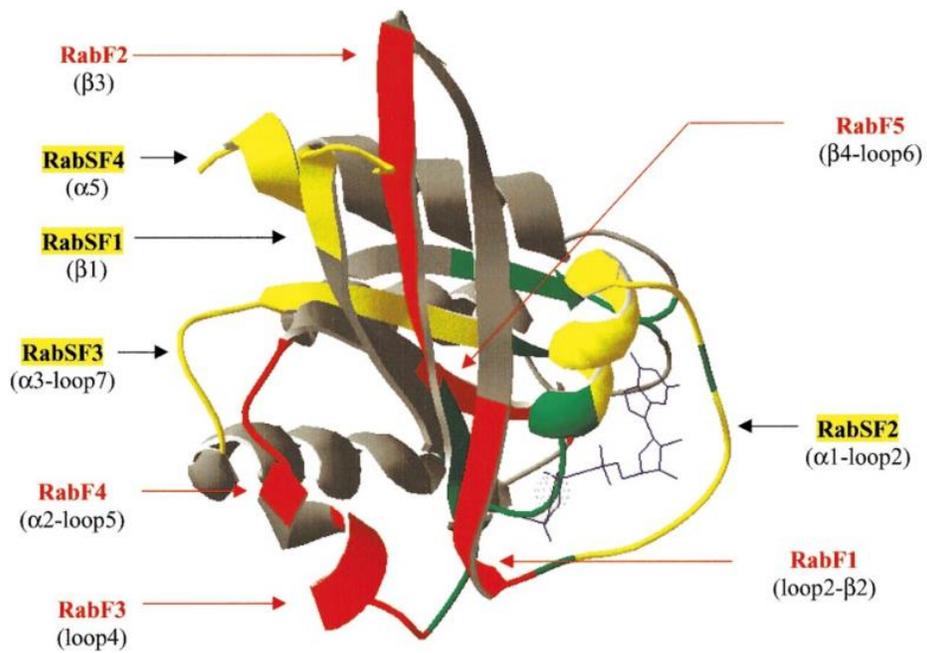


Figura 2. Representación tridimensional de Rab3a. Las regiones RabF se presentan en color rojo, las regiones RabSF en color amarillo, y los motivos de unión a nucleótido en color verde. Tomado de Pereira-Leal & Seabra (2000).

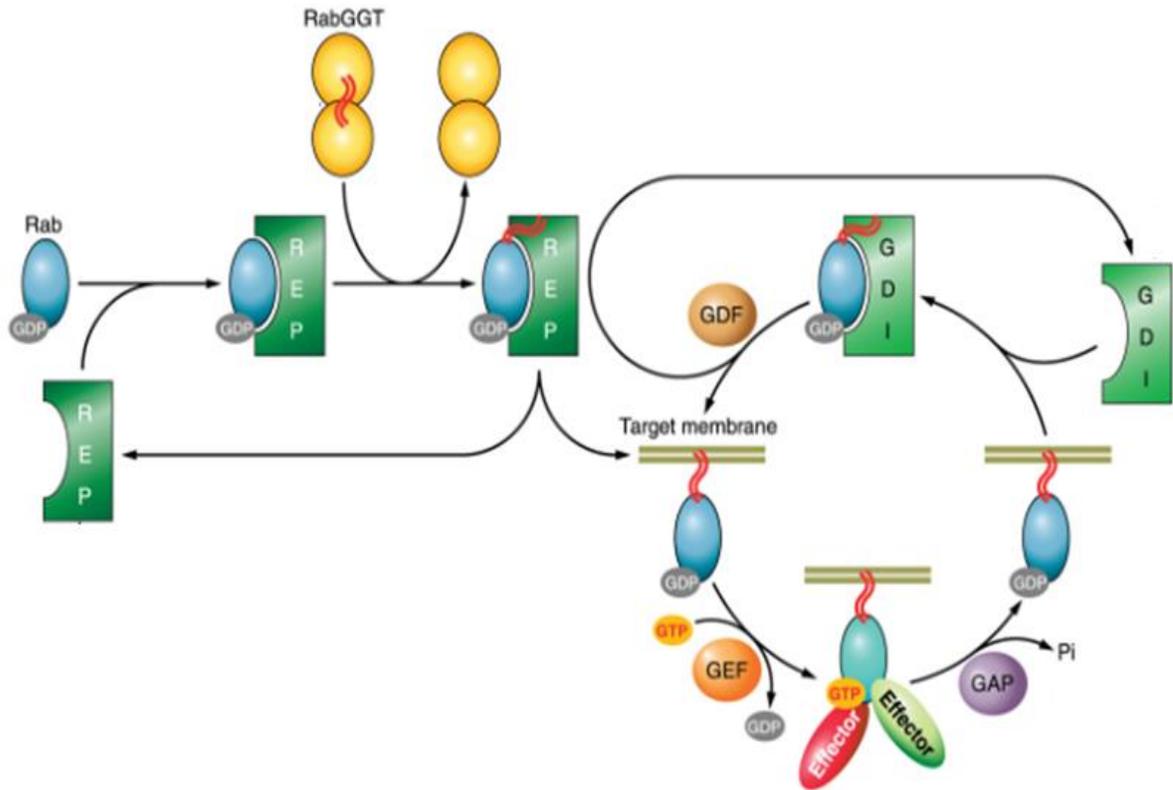


Figura 3. Ciclo de las GTPasas Rab. La proteína Rab recién sintetizada se asocia con la proteína escolta de Rab (REP), la cual presenta a la proteína Rab a la Rab geranylgeranyl transferasa (RabGGT) para recibir los grupos prenilos necesarios para el anclaje a la membrana. El factor de intercambio de nucleótido (GEF) cataliza el intercambio de GDP por GTP-para activar la proteína Rab. Una vez que ha cumplido su función, la proteína Rab interactúa con la proteína activadora de GTPasa (GAP) para acelerar la hidrólisis de GTP a GDP para regresar a su conformación inactiva, y entonces, la proteína Rab es removida de la membrana por el inhibidor de disociación de nucleótido de guanina (GDI) para iniciar el siguiente ciclo. La inserción de la proteína Rab a su membrana blanco es regulada por el factor de disociación de GDI (GDF), que separa la proteína Rab del GDI. Modificado de Hutagalung & Novic (2011).

Rab	Localización intracelular	Función
Rab1	Intermedio RE-Golgi	Tráfico RE-Golgi
Rab2	Intermedio RE-Golgi	Tráfico RE-Golgi
Rab3	TransGolgi-membranas apicolaterales	Exocitosis de TransGolgi a membranas apicolaterales
Rab4	Endosomas tempranos y de reciclaje	Reciclaje endocítico hacia la membrana plasmática
Rab5	Vesículas de clatrina y endosomas tempranos	Internalización endocítica y fusión de endosomas tempranos
Rab6	IntraGolgi	Transporte de intraGolgi
Rab7	Endosomas tardíos	Controla el tráfico endocítico tardío
Rab8	Golgi intermedio y transGolgi	Transporte de proteínas basolaterales de Golgi intermedio a TransGolgi
Rab9	Endosomas tardíos	Transporte de endosomas tardíos a TransGolgi
Rab10	Golgi intermedio y transGolgi	Transporte de proteínas basolaterales de Golgi intermedio a TransGolgi
Rab11	TransGolgi, Vesículas postGolgi y endosomas de reciclaje	Transporte del Golgi, y reciclaje endocítico apical y basolateral
Rab12	Región periférica celular y centrosomas perinucleares	Transporte de la región periférica celular hacia los centrosomas perinucleares
Rab14	Endosomas tempranos y Golgi	Transporte entre endosomas tempranos y Golgi
Rab15	Endosomas tempranos y de reciclaje	Inhibidor de la internalización endocítica.
Rab17	Epitelio específico, endosoma de reciclaje apical	Transporte a través endosomas de reciclaje apical.
Rab18	Intermedio RE-Golgi	Tráfico RE-Golgi
Rab20	En túbulos densos apicales	En reciclaje/endocitosis apical
Rab21	Endosomas tempranos	Internalización endocítica

Tabla 1. Localización y función de algunas proteínas Rab.

Los endosomas tempranos son el punto de inicio de la vía endocítica, los cuales se definen como el primer compartimiento que recibe al cargo (Huoatari & Helenius, 2011). Una vez que el cargo ha sido internalizado por endocitosis, la mayoría es reciclado de nuevo a la membrana, y sólo una pequeña fracción es transportada hacia los endosomas tardíos, los cuales posteriormente se fusionarán con los lisosomas, los cuales contienen enzimas líticas que llevarán a cabo la degradación del cargo (Huoatari & Helenius, 2011).

Por otro lado, el reciclaje es esencial para mantener la composición apropiada de las membranas celulares (externa e internas), así como para regresar moléculas esenciales a los compartimientos adecuados. Los ritmos de internalización y reciclaje pueden ser alterados en respuesta a mecanismos de señalización para incrementar o disminuir la presencia de moléculas en la superficie (Maxfield & McGraw, 2004).

El reciclaje puede llevarse a cabo a través de dos rutas; una ruta rápida (short-loop) y una ruta lenta (long-loop). La vía rápida se lleva a cabo a través de endosomas tempranos, mientras que la vía lenta lo hace enlazando los endosomas tempranos al compartimiento de reciclaje perinuclear (PNRC) antes de ser devueltos a la membrana (Ramsay *et al*, 2007).

Ya sea degradación o reciclaje, las proteínas Rab se encargan de controlar el tráfico vesicular de la vía endocítica. Rab5 se encarga de controlar el tráfico de la membrana hacia los endosomas tempranos y sirve como marcador para estas vesículas; mientras que Rab7 está asociado con la conversión de endosomas tempranos a endosomas tardíos, y sirve como marcador para estos últimos. Rab4 se encarga de controlar el reciclaje de ruta rápida, mientras que Rab 11 interviene en el reciclaje por la vía lenta (Scott *et al*, 2014).

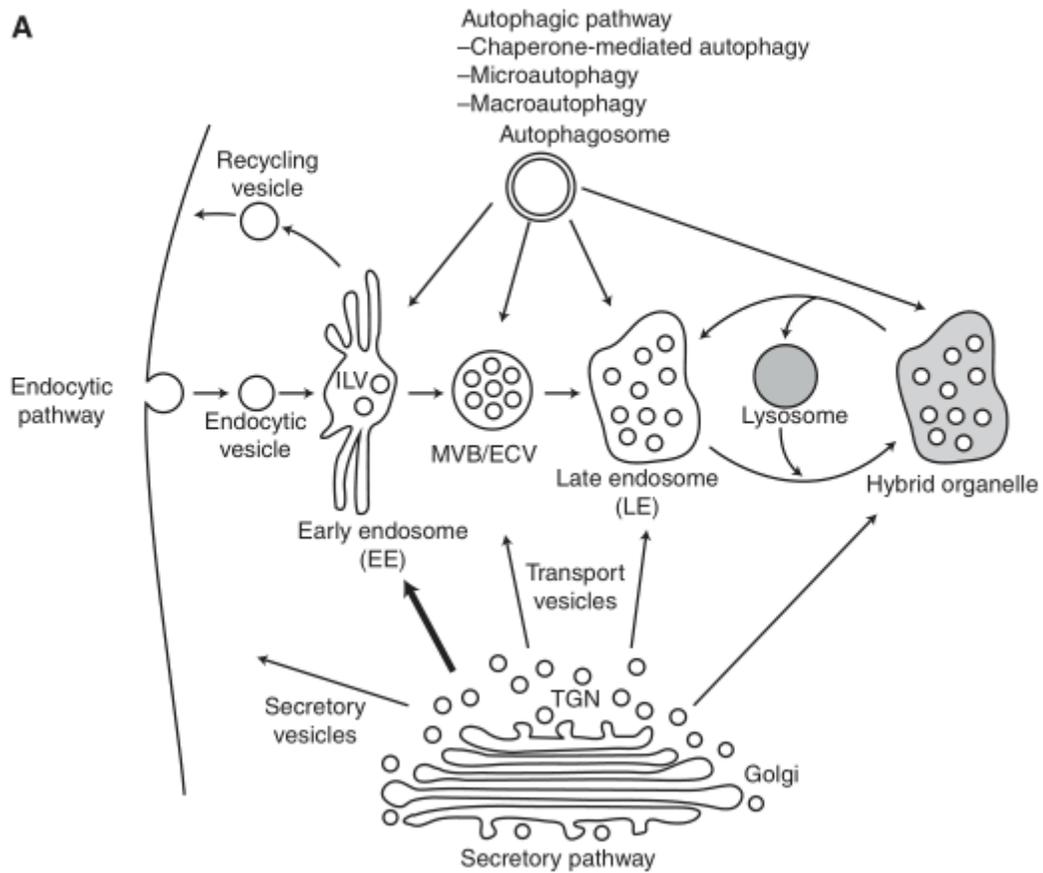


Figura 4. Compartimientos de la vía endocítica. Descripción en el texto. Endosoma temprano (EE), vesícula intraluminal (ILV), cuerpo multivesicular (MVB), vesícula acarreadora de endosoma (ECV), endosoma tardío (LE), red de *Trans*-Golgi (TGN). Tomado de Repnik *et al* (2013)

II. Antecedentes

Se sabe que Rab21 en humanos participa en la vía endocítica de integrinas. Pellinen *et al* (2006) identificaron que Rab21 junto con Rab5 regulan la localización subcelular de las integrinas $\beta 1$. En este mismo trabajo, se demostró la capacidad de Rab21 de interactuar con el dominio citoplásmico de la subunidad $\alpha 2$ a través de ensayos de doble híbrido, y mediante coprecipitación, se encontró que Rab21 se asocia directamente con las integrinas $\alpha 2\beta 1$.

Saito-Nakano *et al* (2005) identificaron en el genoma de *E. histolytica* 91 proteínas putativas correspondientes a proteínas Rab, de las cuales pocas se han caracterizado. Entre estas se encuentran *EhRab11*, *EhRab11B*, *EhRabA*, *EhRab7*, *EhRabB* y *EhRab5* (McGugan & Temesvari, 2003; Juárez-Hernández *et al*, 2013; Hernandez-Alejandro *et al*, 2013, Welter *et al*, 2005; Mitra *et al*, 2007; Javier-Reyna *et al*, 2012).

McGugan & Temesvari (2003) sugieren la posible participación de *EhRab11* en el proceso de enquistamiento de *E. histolytica*. En condiciones de ausencia de hierro, en donde se forman células multinucleadas que recuerdan a las estructura de quiste, *EhRab11* se transloca casi exclusivamente a la periferia de la célula, donde probablemente participe en el inicio del enquistamiento en condiciones de estrés.

Welter *et al* (2005) mencionan que *EhRabA* participa en la motilidad y la polarización del parásito, ya que ésta se localiza en el borde delantero en células móviles y en las extensiones membranales que se forman durante la polarización, posiblemente regulando el transporte de membrana y/o proteínas de superficie a la membrana plasmática.

Mitra *et al* (2007) demuestran que *EhRab11B* desempeña una función esencial en el transporte y secreción de las principales cisteína proteasas, y por lo tanto en el proceso de invasión y patogenicidad del parásito.

En cuanto a *EhRab7*, Javier-Reyna *et al* (2012) demostraron que la movilización del receptor *Eh* $\beta 1$ FNR se lleva a cabo parcialmente con esta GTPasa, en colaboración con el citoesqueleto de actina, a través de la vía endocítica. Los

resultados también sugieren que en este proceso probablemente participe más de una isoforma de Rab7, debido a que hay una asociación tiempo y estructural específica entre Rab7 y actina; y Rab7 y *Eh*β1FNR.

Otra proteína Rab que ha sido estudiada en *E. histolytica* es *EhRabB*. Hernández-Alejandro *et al* (2013) encontraron que *EhRabB* es expresada diferencialmente durante la fagocitosis. Además, Juárez-Hernández *et al* (2013) encontraron que la sobreexpresión de una mutante no funcional de la proteína *EhRabB*, reduce la virulencia de los parásitos tanto *in vitro* como *in vivo*.

Respecto a otros protozoarios, en la ameba de vida libre *Dictyostelium discoideum* se identificó un homólogo de Rab21, donde Khurana *et al* (2005) sugieren que esta proteína participa en un complejo de señalización que regula la actividad fagocítica de la ameba. En *Trypanosoma brucei* también existe un homólogo de Rab21 (TbRab21), el cual se localiza en endosomas y parcialmente colocaliza con TbRab5A y cuerpos multivesiculares/endosomas tardíos, en donde la expresión de TbRab21 es esencial para la proliferación celular y necesaria para el tráfico hacia el lisosoma (Ali *et al*, 2014).

Además de los estudios realizados en estos dos organismos, no se cuenta con información adicional acerca de la función de Rab21 en otras células de eucariontes unicelulares, a pesar de que la proteína es un representante antiguo, y por lo tanto debería ser esencial en la fisiología de la célula. En el genoma de *E. histolytica*, hay un gen que codifica para un homólogo de Rab21 en humanos, sin embargo éste no ha sido caracterizado (Saito-Nakano *et al*, 2005).

En trabajos previos del laboratorio, se demostró que la regulación de los niveles y localización subcelular del receptor *Eh*β1FNR no es dependiente de la síntesis y/o degradación, sino que se regula a través de la movilización hacia el interior y/o exterior (Hernández-Rámirez *et al*, 2007), sin embargo, poco se sabe sobre este proceso.

Recientemente, se clonó el gen de *EhRab21* en el vector de expresión pProEX-1, con el cual se transformó la cepa de *E. coli* DH5α y a partir de la purificación de la

proteína recombinante, se produjeron anticuerpos policlonales que reconocen a Rab21 en los trofozoítos de *E. histolytica* (Hernández Ramírez *et al*, 2014). Con ayuda de este anticuerpo y el anticuerpo monoclonal 3C10, se encontró que *EhRab21* y el receptor *Ehβ1FNR* colocalizan en vesículas en trofozoítos aislados de pacientes con colitis fulminante (Figura 5), además de colocalizar parcialmente con lisosomas (Figura 6) sugiriendo que Rab21 posiblemente tenga una función esencial en la movilización y/o regulación del receptor y la patogenia de *E histolytica* (Hernández Ramírez *et al*, 2014).

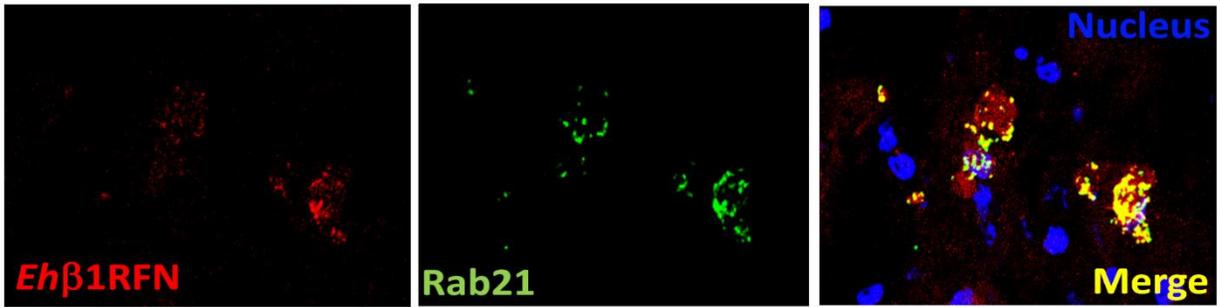


Figura 5. Colocalización de *Ehβ1FNR* y *EhRab21* en trofozoítos aislados de pacientes con colitis fulminante (Material proporcionado por cortesía del Dr. Javier Ventura-Juárez).

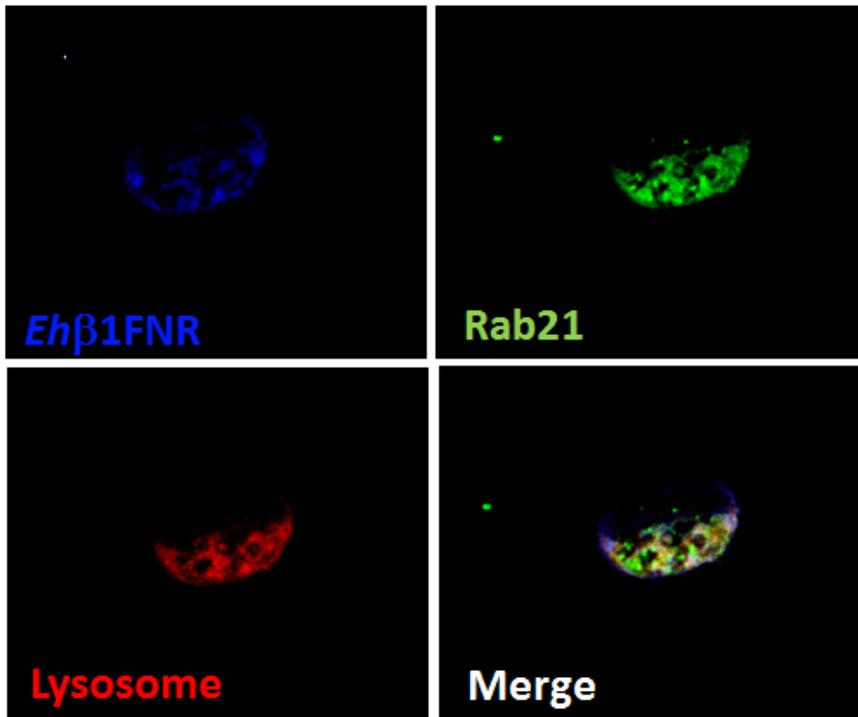


Figura 6. Colocalización de *Ehβ1FNR*, *EhRab21* y Lysotracker en trofozoítos aislados de pacientes con colitis fulminante (Material proporcionado por cortesía del Dr. Javier Ventura-Juárez).

III. Justificación

En México, hasta 1999, la amibiasis era una de las 20 principales causas de enfermedad, colocándose anualmente en quinto o sexto lugar (Ximénez *et al*, 2009). Esto es muy similar en otros países en vías de desarrollo donde la enfermedad se presenta, siendo ésta, una de las principales causas de mortalidad (Ximénez *et al*, 2009).

En México en los últimos 40 años, las tasas de complicaciones severas de amibiasis han disminuido, debido a la mejora en el fácil acceso a drogas antiamebianas (Ximénez *et al*, 2009). Sin embargo, la población mexicana está altamente expuesta a este parásito y debe considerarse como un problema de salud pública.

En diversos tejidos cancerosos, se ha observado una desregulación en el perfil de expresión de diversas proteínas Rab. A pesar de que estos genes no se consideran oncogenes, esta expresión anormal podría favorecer la transformación celular, ya que se ha observado que cambios en la expresión de estas proteínas afectan al crecimiento y la proliferación celular (Tang & Ng, 2009).

Orozco *et al* (1994), menciona que el proceso de invasión de *E. histolytica* se asemeja al proceso de metástasis en células transformadas de mamíferos. Las células malignas, a diferencia de las células normales, poseen una serie de genes transformados que facilitan el proceso de invasión, a través de enzimas proteolíticas localizadas en la superficie membranal. De igual manera, las cepas patógenas y no patógenas de *E. histolytica*, difieren en la expresión de genes que facilitan la capacidad de invasión, semejante a las células transformadas.

Por lo tanto, al presentar las amibas mecanismos semejantes a los que presentan las células transformadas, es posible inferir que en *E. histolytica*, las proteínas Rab también juegan un papel importante en la patogenia, específicamente Rab21, ya que esta regula el proceso de internalización de las integrinas, y su regulación negativa disminuye la adhesión y migración celular (Pellinen *et al*, 2008); sin

embargo, los estudios también sugieren que posee una posible función en la migración y en la metástasis en células tumorales (Pellinen *et al*, 2008).

En trabajos previos del laboratorio, se ha observado que el receptor a fibronectina y *EhRab21* colocalizan en trofozoítos aislados de pacientes con colitis fulminante, por ello, es necesario estudiar y describir la función en el tráfico vesicular y su importancia en el proceso de patogenia del homólogo de Rab21 y su asociación con el receptor tipo integrina *Ehβ1FNR* en *E. histolytica*.

IV. Hipótesis

EhRab21 participa en el reciclaje del receptor *Ehβ1FNR* y esta movilización es importante para la patogenia del parásito.

V. Objetivos

5.1 Objetivo general

- Evaluar la participación de *EhRab21* en el transporte vesicular del receptor *Ehβ1FNR*

5.2 Objetivos específicos

- Determinar la localización subcelular de *EhRab21*.
- Confirmar la asociación de *EhRab21* y *Ehβ1FNR*.
- Caracterizar la ruta de internalización de *EhRab21* y el receptor *Ehβ1FNR*.

VI. Metodología

6.1 Purificación de fibronectina

La fibronectina se purificó por una modificación del método de cromatografía de afinidad con sefarosa-gelatina (Javier-Reyna *et al*, 2011) a partir de sangre fresca humana colectada con tubos vacutainer con EDTA. La fibronectina se dializó con una solución 0.15 M NaCl, 0.05 M Tris HCl, pH 7.4 y se almacenó a -20°C.

6.2 Cultivo celular

Trofozoítos de *E. histolytica* cepa HM-1:IMSS (originalmente aislado y tipificado en el Centro Médico Nacional, Instituto Mexicano del Seguro Social) se cultivaron axénicamente en medio TYI-S-33 suplementado con una mezcla de suero bovino al 10%, vitaminas al 10% y antibióticos 1% (estreptomycin /penicilina).

6.3 Proteína recombinante *EhRab21*

Para este estudio se usó la proteína recombinante *EhRab21* ya producida en el laboratorio, cuyo gen se encuentra en el plásmido pProex-1, el cual agrega una etiqueta de seis histidinas, y este plásmido se utilizó para transformar bacterias de *Escherichia coli* de la cepa DH5- α .

A partir de eluidos obtenidos por una columna acoplada a níquel, se corrió un gel preparativo de poliacrilamida al 15%, y se cortó la zona correspondiente de 20 a 30 kDa; posteriormente, se electroeluyó la zona cortada a 25 volts toda la noche a 4 °C, se recuperó la proteína recombinante y se corrió en un gel de poliacrilamida al 15% para verificar la pureza de la proteína recombinante.

6.4 Producción de anticuerpos policlonales en hámster contra la proteína *EhRab21* recombinante.

Se inmunizaron por la vía subcutánea tres hámsteres (*Mesocricetus auratus*) machos como se describe a continuación:

140 µg de proteína *EhRab21* recombinante

80µl PBS

100 µl Adyuvante de Freund completo (Sigma, F-5881)

Se inmunizó dos veces más en lapsos de 15 días, de la misma manera, pero usando adyuvante de Freund incompleto (Sigma, F-5506).

Para la obtención del suero preinmune, se sangró a los individuos por la vía preorbital; la sangre obtenida se incubó durante 1 h a 37°C y posteriormente durante 1 h a 4°C. Luego se centrifugó a 1643 g por 15 min a 4°C y se colectó el suero.

Después de cada inmunización, se obtuvo el suero de cada uno de los animales, y 15 días posteriores a la última inmunización los individuos fueron sacrificados por punción cardíaca y se colectó la sangre. La titulación de los sueros se llevó a cabo con la proteína *EhRab21* recombinante por western blot.

6.5 Anticuerpos y sondas

Los anticuerpos primarios que se utilizaron en este estudio se enlistan a continuación, todos ellos producidos en el laboratorio:

Anticuerpo monoclonal de ratón anti *Ehβ1FNR* (3C10).

Anticuerpo policlonal de hámster con anti-*EhRab21* (h-α-Rab21).

Anticuerpo policlonal de conejo con anti-*EhRab21* 21 (c-α-Rab21

Para el análisis por microscopía confocal se usaron los siguientes anticuerpos secundarios:

- Pacific Blue cabra anti-ratón (Invitrogen, P31582)
- TRITC cabra anti-conejo (Abcam, AB50598)
- TRITC cabra anti-ratón (Jackson ImmunoResearch, 115-025-003)

- FITC cabra anti-ratón (ThermoScientific, 31569).

Y las siguientes sondas comerciales:

- NBD C6 Ceramide (Molecular Probes, N-1154), marcador del aparato de Golgi.
- Dextrán acoplado a FITC, marcador de endosomas (Sigma, FD500S).
- LysoTracker® Red DND-99 (Life Technologies, L-7528), Marcador específico de lisosomas.}

6.6 Preparación de extractos totales

A partir de un cultivo de *E. histolytica*, se recolectaron los trofozoítos por centrifugación a 134 g a 4°C por 10 min y la pastilla se lavó una vez con PBS y se centrifugó nuevamente repitiendo el lavado.

La pastilla se resuspendió en amortiguador de lisis con inhibidores (Tris-HCl 10mM, NaCl 50 mM, TLCK 3 mM, PSMF 1 mM, Iodoacetamida 3 mM, NEM 3 mM, pH 7.4). Los trofozoítos se lisaron por presión usando bomba disruptora de N₂ (PARR INSTRUMENT) durante 20 min a 300 psi. La proteína del extracto total se cuantificó por el método de micro-Lowry (Bio-rad), se almacenó en alícuotas y se guardó a -20 °C hasta su uso.

6.7 Interacción de trofozoítos de *E. histolytica* con fibronectina

Placas Petri se forraron con fibronectina (100 µg/µl) y se esterilizaron con luz UV durante toda una noche. Posteriormente las placas se lavaron con PBS tres veces para eliminar el exceso de fibronectina. Entonces, a partir del cultivo de *E. histolytica*, se recolectaron los trofozoítos por centrifugación a 134 g a 4 °C, se lavaron con PBS y se ajustó la cantidad a 1x10⁶ trofozoítos por ml de medio completo. Posteriormente se colocaron 5x10⁶ trofozoítos por caja, y se dejó interaccionar durante 1 h a 37 °C. Después, se retiró el medio y se contaron los trofozoítos no unidos y se calculó el porcentaje de adhesión. Las placas con los trofozoítos adheridos se guardaron a -70 °C hasta su uso.

Para lisar los trofozoítos unidos a fibronectina, se utilizó amortiguador de lisis con inhibidores (Tris-HCl 10mM, NaCl 50 mM, TLCK 3 mM, PSMF 1 mM, Iodacetamida 3 mM, NEM 3 mM, pH 7.4) y un raspador para coleccionar y lisar los trofozoítos y así obtener el extracto total. Los extractos totales se utilizaron posteriormente para ensayos de electroforesis y western blot.

6.8 Identificación de *EhRab21* por western blot

Los extractos totales (interaccionados o no con fibronectina) se analizaron por electroforesis en geles de poliacrilamida al 15 % de acuerdo al método de Laemmli (1970). Se aplicaron 10 μ l de extracto total (concentración final 50 μ g por pozo) con 10 μ l de amortiguador de muestra conteniendo 2-mercaptoetanol como agente reductor. Esta mezcla se hirvió durante 5 min y se colocó en el gel de poliacrilamida al 15 %. El corrimiento electroforético se llevó a cabo a 120 voltios durante aproximadamente 80 min. Finalmente el gel se tiñó con azul de Coomassie para visualizar las proteínas.

Para el análisis por western blot, se corrió el gel por electroforesis en las mismas condiciones ya descritas, y se transfirió a una membrana de nitrocelulosa de valor de corte de 0.2 μ m (BioRad, 162-0112) a 25 voltios a 4 °C durante toda la noche.

La membrana se tiñó con Rojo de Ponceau para verificar que la transferencia se hubiera llevado a cabo adecuadamente y se bloqueó con leche baja en grasas al 5 % en TBS-Tween 0.05 % durante 1 h a temperatura ambiente. Posteriormente la membrana se lavó 5 veces por 10 min. Después se incubó con el anticuerpo c- α -Rab21 (1/10000) o el anticuerpo h- α -Rab21 (1/50000), diluidos en TBS-Tween 0.05%-leche-2.5% durante toda la noche a 4 °C en agitación.

Luego de esta incubación se lavó la membrana 5 veces por un min y 5 veces por 10 min con TBS-Tween 0.05 %. A continuación se incubó con el anticuerpo α -conejo acoplado a HRP (Jackson Immunoresearch, 307-035-003) o el anticuerpo α -hámster acoplado a HRP (Jackson Immunoresearch, 111-035-003), ambos en dilución (1/10000), durante una hora a temperatura ambiente. Después se lavó con TBS-Tween 0.05% de la misma manera como se menciona anteriormente.

Para revelar la membrana se usó el sustrato de máxima sensibilidad Super Signal West Femto (Thermo Scientific, 34095) y el revelado se realizó en placa radiográfica o en el escáner C-Digit (Licor, 3600).

6.9 Análisis por microscopía confocal

Para este análisis, se usaron 250 000 trofozoítos incubados en vidrio o con fibronectina. Los trofozoítos se fijaron con paraformaldehído al 4 % por 1 h a 37 °C y posteriormente se lavaron tres veces con PBS. Después de la fijación, se permeabilizaron con Tritón X-100 al 0.2 % durante 5 min y se lavaron tres veces con PBS. Se bloquearon con suero fetal bovino (Corning, 35-010-CV) al 10 % por 1 h a 37 °C y se lavaron tres veces con PBS. Los trofozoítos se incubaron con los anticuerpos primarios correspondientes durante 1 h a 37 °C y se lavó tres veces con PBS. Después, se incubó con los anticuerpos secundarios correspondientes durante 1 h a 37 °C y se lavó 3 veces con PBS. Finalmente las muestras se montaron en Vectashield (Vector, H-1000) y se analizaron en el microscopio confocal Carl Zeiss LSM 700.

6.10 Movilización del receptor *Ehβ1FNR* y *EhRab21*

El análisis de la movilización de ambas proteínas se llevó a cabo por microscopía confocal. A partir de trofozoítos interaccionados con vidrio durante 15 min o 5 h, o con fibronectina a tiempos de 15, 30, 60 min y 5 h, se incubaron estos con los anticuerpos primarios 3C10 y c- α -Rab21; y posteriormente con los anticuerpos secundarios Pacific Blue cabra anti-ratón (Invitrogen, P31582) o FITC cabra anti-ratón (Thermoscientific, 31569) para el anticuerpo 3C10 y TRITC cabra anti-conejo (Abcam, AB50598) para el anticuerpo c- α -Rab21.

Se analizó también la movilización en otra condición, en donde los trofozoítos se estimularon con fibronectina durante 1 h, se colectaron y se incubaron de nuevo en vidrio durante 30 min.

6.11 Localización subcelular de *EhRab21*

Para determinar la localización subcelular de *EhRab21*, se usaron diversos marcadores de organelos. Para determinar si *EhRab21* es residente del aparato de Golgi, se usó la sonda NBD-C6-Ceramide (Molecular Probes, N-1154), junto con los anticuerpos primarios 3C10 y c- α -Rab21, y los anticuerpos secundarios Pacific Blue cabra anti-ratón (Invitrogen, P31582) y TRITC cabra anti-conejo (Abcam, AB50598).

Para marcar los fagosomas, los trofozoítos se incubaron con la cepa de *E.coli* DH5- α /pEGP (donado por el laboratorio del Dr. Victor Tsusumi) que expresa la proteína verde fluorescente (GFP) por 15 min a 37 °C en una relación de 100 bacterias por trofozoíto. Posteriormente los trofozoítos se lavaron con una solución de PBS con azida de sodio (5 mM) y gentamicina (50 mM), y se fijaron e incubaron con los anticuerpos primarios 3C10 y c- α -Rab21 y los anticuerpos secundarios Pacific Blue cabra anti-ratón (Invitrogen, P31582) y TRITC cabra anti-conejo (Abcam, AB50598).

También se analizó la participación de *EhRab21* en la eritrofagocitosis, por lo que los trofozoítos se interaccionaron durante 15 min a 37 °C con eritrocitos previamente fijados y teñidos con faloidina-rodamina (1/50) (Invitrogen, R415) durante 1 h, en una relación 100:1. Posteriormente se lavó 3 veces con PBS, y los trofozoítos se fijaron con paraformaldehído al 4%, por último se realizó la inmunofluorescencia correspondiente.

Para marcar endosomas se utilizó dextrán acoplado a FITC (FITC-Dextrán) (Sigma, FD500), el cual se añadió al medio de cultivo en una concentración de 2 mg/ml, y los trofozoítos se mantuvieron durante 1 h adheridos a fibronectina; posteriormente, se lavó 3 veces con PBS, se fijaron con paraformaldehído al 4 % durante 1 h y se realizó el análisis por inmunofluorescencia de *EhRab21* y *Eh β 1FNR*.

Para marcar los lisosomas, se incubó a los trofozoítos con LysoTracker en medio completo en razón de 1,5 μ l de la sonda por cada ml de medio durante toda la

noche a 37 °C. Posteriormente, los trofozoítos se recolectaron y lavaron 3 veces con PBS, se interaccionó con fibronectina durante 1 h y 5 h, posteriormente se fijaron con paraformaldehído al 4 % y se realizó el análisis por inmunofluorescencia para *EhRab21* y *Ehβ1FNR*.

6.12 Análisis de FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer)

El análisis de FRET se llevó a cabo en el microscopio confocal Leica TCS-SP-8, usando la función “Acceptor Photo Bleaching Mode”. Trofozoítos de *E. histolytica* se incubaron con fibronectina durante 1 h y se fijaron con 4 % de paraformaldehído. Los trofozoítos se permeabilizaron con Tritón-X-100 al 0.2 % y se bloquearon con Suero Fetal Bovino (1/100). Se preparó un control positivo para el ensayo para verificar que se lleve a cabo correctamente el proceso de transferencia de energía entre los fluoróforos; el cual consistió en incubar trofozoítos con el anticuerpo monoclonal 3C10 durante 1 h a 37 °C, y posteriormente usar dos anticuerpos secundarios anti-ratón: FITC cabra anti-ratón (ThermoScientific, 31569) y TRITC cabra anti-ratón (Jackson Immunoresearch, 115-025-033). En este caso se espera una asociación cercana al 100 %.

Para determinar la asociación de *EhRab21* y el receptor *Ehβ1FNR*, a partir de trofozoítos fijados, se incubó durante 1 h a 37 °C con los anticuerpos primarios 3C10 y c- α -Rab21. Posteriormente se lavó, y se incubó con los anticuerpos secundarios FITC cabra anti-ratón (ThermoScientific, 31569) y TRITC cabra anti-conejo (Abcam, AB50598), los cuales funcionan como fluoróforos aceptor y donador respectivamente.

Las áreas de quemado se establecieron en regiones de interés, y se fotoblanqueó cinco veces con el láser de 543 nm al 100 % para entonces observar la transferencia de energía a través del incremento en la intensidad de fluorescencia.

VII. RESULTADOS

7.1 Obtención de anticuerpos α -Rab21 en hámster

Debido a que en este estudio se usaron diversos anticuerpos y sondas para el análisis por microscopía confocal, se decidió producir anticuerpos en hámster contra la proteína Rab21 recombinante, con la finalidad de obtener anticuerpos de un hospedero diferente a los ya existentes (rata, conejo, ratón) para poder realizar las combinaciones necesarias para analizar la localización subcelular de *EhRab21* y la movilización junto al receptor *Eh β 1FNR*.

Al analizar los sueros individualmente y 15 días después de la tercera inmunización, se observa que solamente un individuo produjo anticuerpos contra la proteína recombinante, obteniendo un título del suero de (1/100 000), mientras que para los otros dos sueros no se observa reconocimiento de la proteína recombinante (Figura 8). Se observa el reconocimiento de bandas de ambos anticuerpos (c- α -Rab21 y h- α -Rab21) de un peso más alto al esperado para la proteína recombinante (25 kDa aproximadamente), que coincide con el patrón de tinción de la electroforesis en gel de poliacrilamida (Figura 7).

Posteriormente, se probaron los anticuerpos anti-Rab21, producidos en hámster y en conejo, en extracto total de trofozoítos. En la figura 9 se observa que ambos anticuerpos reconocen dos bandas; una de un peso aproximado de 24 kDa, la cual corresponde al peso esperado de *EhRab21*, y otra banda que corresponde a un peso de 75 kDa. La señal de ambos anticuerpos es muy débil, ya que solamente con el uso de un escáner aparecen ambas bandas, lo que sugiere que la concentración de *EhRab21* es muy baja en el extracto total.

Se realizó el western blot de extractos de trofozoítos estimulados con fibronectina a distintos tiempos (15, 60 y 180 min) para ver si la señal de *EhRab21* se incrementa bajo estas condiciones. Como se observa en la figura 10 la señal que aparece es muy débil, y se observa de manera similar en los tres extractos; sugiriendo que *EhRab21* no se induce con el estímulo de fibronectina.

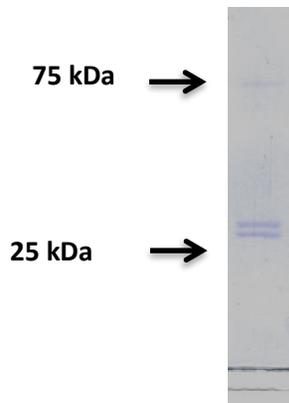


Figura 7. Purificación de la proteína *EhRab21* recombinante. Se observa un doblete a la altura de 26 kDa aproximadamente, la cual corresponde al peso esperado, sin embargo se observa una banda a la altura de 70 kDa

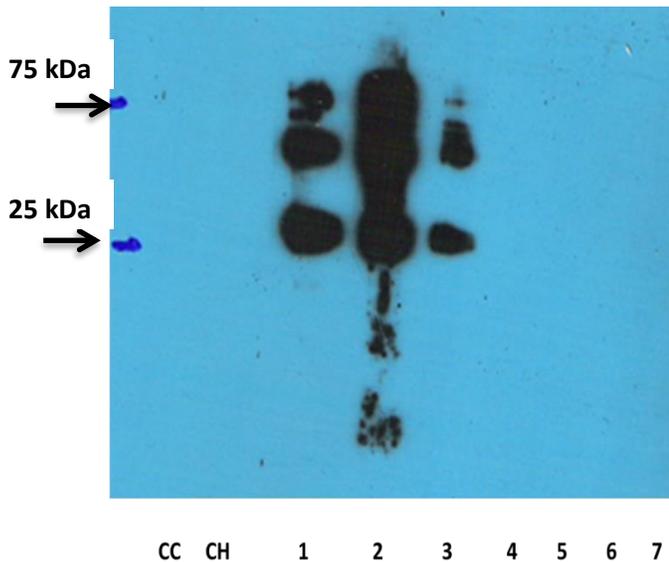


Figura 8. Producción de anticuerpos anti-Rab21 en hámster (titulación con Rab21 recombinante). Se sacrificaron los hámsteres, se obtuvo el suero y se probaron individualmente a diferentes diluciones. Se observa que solo un hámster produjo anticuerpos contra *EhRab21*, y que el patrón de reconocimiento es idéntico con el anticuerpo producido en conejo. CC) Control secundario Anti-conejo, CH) Control secundario Anti-hámster, 1) Conejo α -Rab21 (1/10 000), 2) Suero 1 (1/10 000), 3) Suero 1 (1/100 000), 4) Suero 2 (1/10 000), 5) Suero 2 (1/100 000), 6) Suero 3 (1/10 000), 7) Suero 3 (1/100 000).

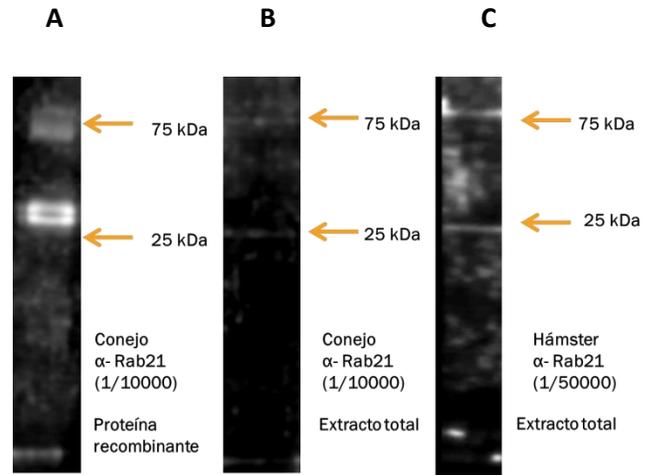


Figura 9. Western Blot de *EhRab21* en extractos totales de *E. histolytica*. A) Reconocimiento de la proteína recombinante, en el panel B) Reconocimiento de *EhRab21* en extractos totales de trofozoítos con el anticuerpo producido en conejo, C) Reconocimiento de *EhRab21* en extractos totales con el anticuerpo producido en hámster. En B y C se observa una banda por debajo de los 25 kDa, la cual corresponde al peso esperado de la proteína; se observa también el reconocimiento de una banda de aproximadamente 75 kDa

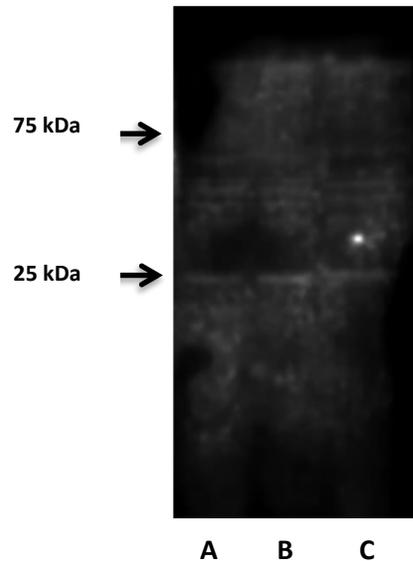


Figura 10. Western Blot de *EhRab21* en trofozoítos expuestos a fibronectina durante A) 15, B) 60 y C) 180 min usando el anticuerpo c- α -Rab21 (1/10 000). De manera similar, se da el reconocimiento de una banda por debajo de 25 kDa, la cual permanece constante en las 3 condiciones, sugiriendo que *EhRab21* no se induce con el estímulo de fibronectina.

7.2 Movilización y localización subcelular del receptor *Eh* β 1FNR y de *Eh*Rab21

Para analizar la movilización de *Eh*Rab21 y *Eh* β 1FNR, se observaron trofozoítos expuestos a fibronectina (15, 30, 60 min y 5 h) usando el microscopio confocal. Además, como control se incluyeron trofozoítos adheridos a vidrio (15 min y 5 h).

En trofozoítos adheridos a vidrio durante 15 min, tanto *Eh*Rab21 como *Eh* β 1FNR se encuentran en el citoplasma y no se observa colocalización entre ambas proteínas (Figura 11).

Sin embargo, en trofozoítos expuestos a fibronectina por 15 min, *Eh*Rab21 se relocaliza hacia la membrana celular, mientras que el receptor *Eh* β 1FNR aún se encuentra en el citoplasma. En este tiempo ambas moléculas se colocalizan en pequeñas vesículas en algunas células (Figura 12).

En trofozoítos expuestos a fibronectina durante 30 min, *Eh*Rab21 se encuentra nuevamente en el citoplasma, al igual que el receptor *Eh* β 1FNR; sin embargo, ya es posible observar vesículas bien definidas en donde colocalizan ambas moléculas, las cuales se aprecian de color oscuro en el la imagen de campo claro (Figura 13).

A 60 min de interacción con fibronectina, en la mayoría de las células, el receptor *Eh* β 1FNR se encuentra en la membrana celular como se ha reportado previamente (Hernández Ramírez *et al*, 2006), y *Eh*Rab21 se mantiene en el citoplasma; sin embargo, en algunas células donde el receptor aún no se encuentra en la membrana celular, se observan nuevamente vesículas donde colocalizan ambas proteínas (Figura 14).

A 5 h de interacción con fibronectina, se generan vesículas en donde se internaliza el receptor *Eh* β 1FNR, como se reportó por Javier-Reyna *et al* (2007), así como otra población vesicular más pequeña, en donde el receptor, colocaliza con *Eh*Rab21. Además se da la formación de una gran cantidad de vesículas en donde

se encuentra *EhRab21* en forma independiente (Figura 15). Se realizó una condición de interacción a vidrio durante 5 h para comprobar que el reclutamiento de *EhRab21* es debido al estímulo de fibronectina. En la figura 16 se observa que *EhRab21* se encuentra en el citoplasma y que el receptor se encuentra en vesículas al interior de la célula.

En esta cinética de interacción, la participación de *EhRab21* en la movilización del receptor *Ehβ1FNR* no es evidente. Como se ha reportado previamente, la localización subcelular del receptor es dependiente del estímulo con fibronectina (Hernández-Ramirez, *et al*, 2007); sin embargo, no se ha analizado la movilización retirando el estímulo. Por lo tanto, se analizó la movilización del receptor en trofozoítos interaccionados con fibronectina durante 60 min, y posteriormente, estos trofozoítos fueron despegados e incubados en vidrio durante 30 min. Debido a que el cultivo es asincrónico, se observan varias condiciones en los trofozoítos.

En una de ellas, se observa que el receptor *Ehβ1FNR* se encuentra en la membrana celular y en vesículas de gran tamaño (Figura 17A); mientras que *EhRab21* se encuentra en la membrana celular, y posiblemente en las vesículas donde se encuentra el receptor; sin embargo, no se observa una colocalización evidente entre proteínas.

En otros trofozoítos de la misma preparación, se observa que el receptor y *EhRab21* se encuentran colocalizando en el citoplasma (17B), por lo que posiblemente, se sugiere que estas dos proteínas podrían establecer una interacción directa entre ellas.

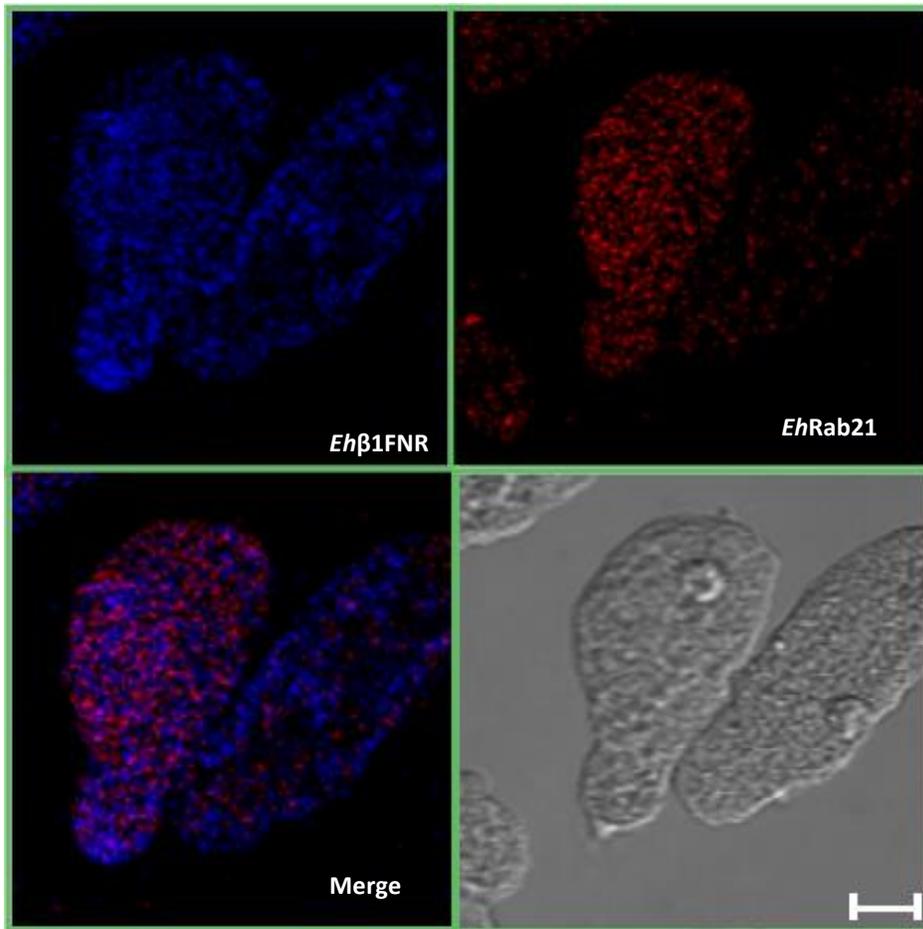


Figura 11. Localización de *Ehβ1FNR* y *EhRab21*. Control de interacción con vidrio durante 15 min. La señal de ambas proteínas se encuentra el citoplasma y no se observa colocalización entre ambas. Barra=10μm.

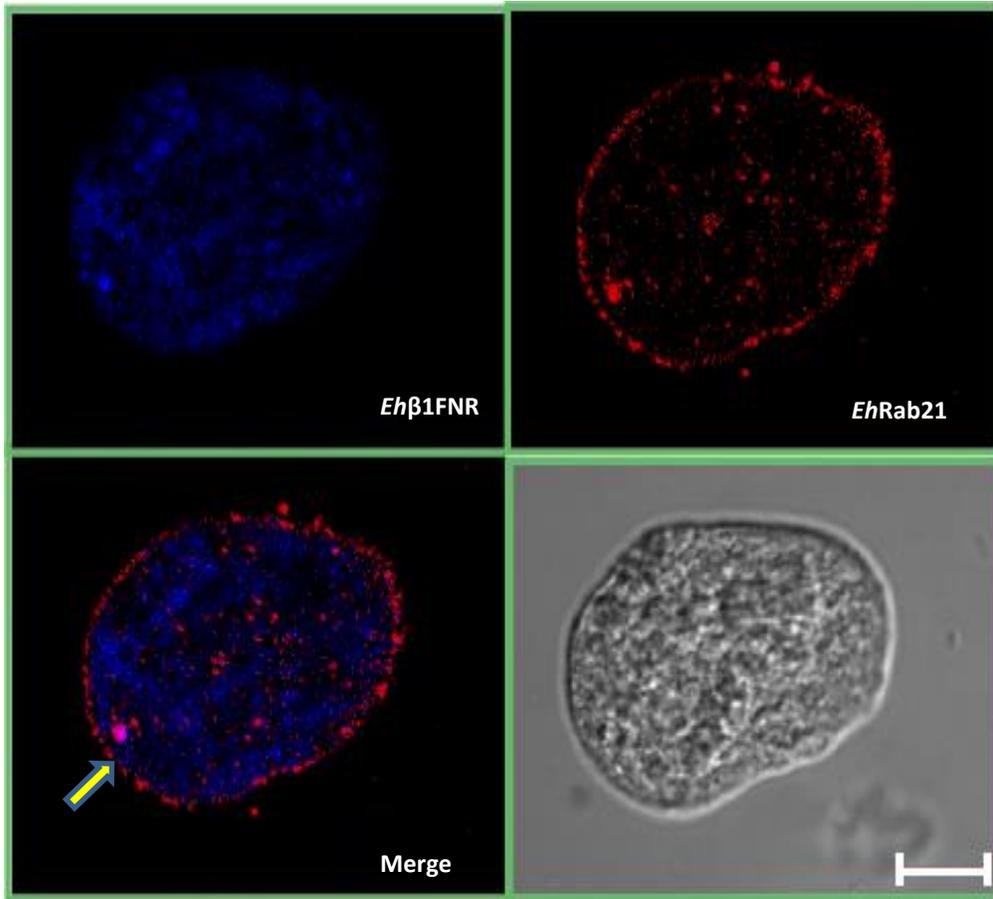


Figura 12. Localización de *Ehβ1FNR* y *EhRab21*. Interacción de trofozoítos con fibronectina durante 15 min. La señal del receptor aún se encuentra en citoplasma, pero hay una relocalización de *EhRab21* hacia la membrana plasmática. Se puede observar una colocalización marginal entre ambas proteínas en una pequeña vesícula (flecha). Barra=10μm.

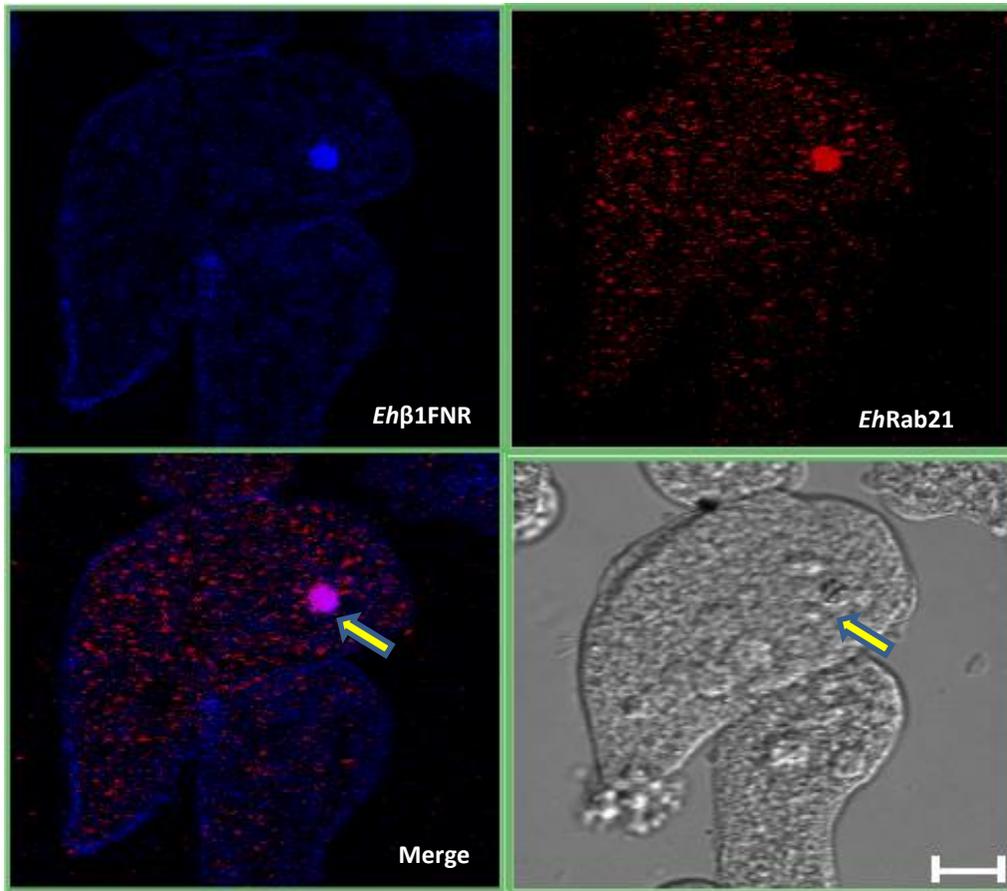


Figura 13. Localización de *Ehβ1FNR* y *EhRab21*. Interacción de trofozoítos con fibronectina durante 30 min. Se observa que parte del receptor ya se encuentra en la membrana plasmática, mientras que *EhRab21* se encuentra nuevamente en el citoplasma. Ambas moléculas colocalizan en una vesícula, la cual se logra observar en el campo claro (se indica con una flecha). Barra=10µm.

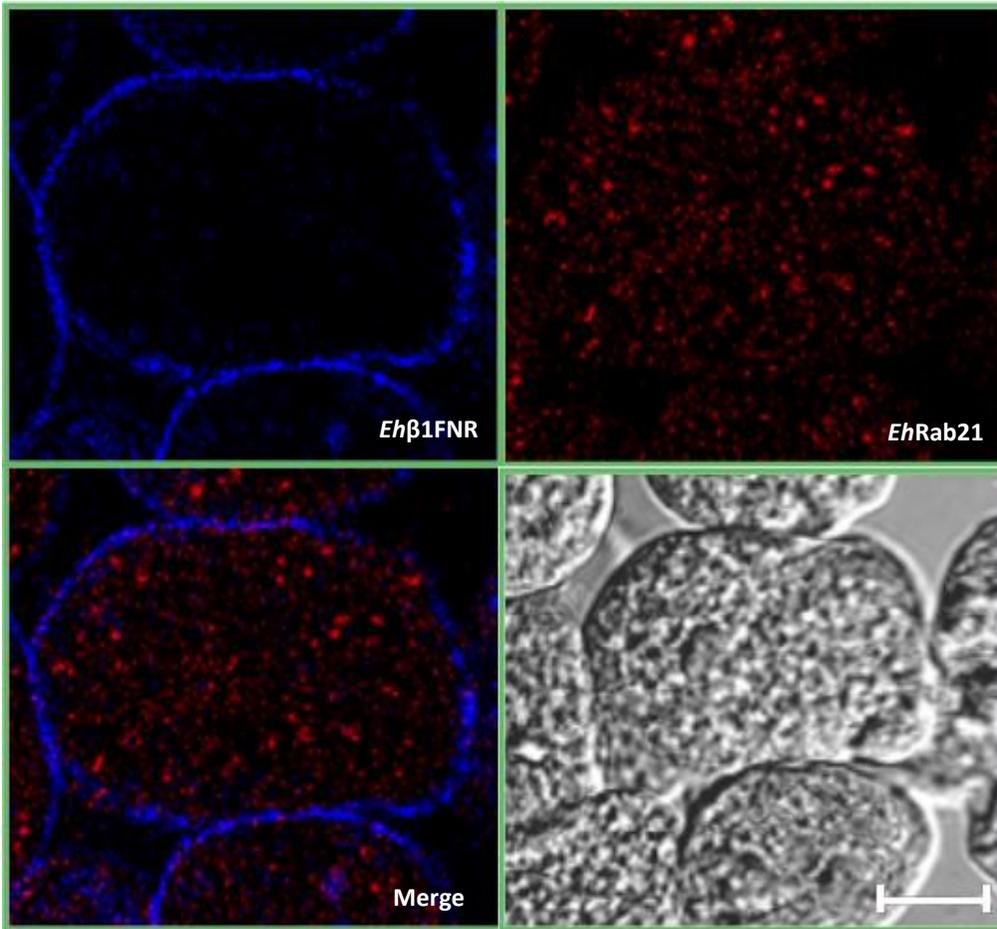


Figura 14. Localización de *Ehβ1FNR* y *EhRab21*. Interacción de trofozoítos con fibronectina durante 60 min. El receptor se ha movilizado casi en su totalidad hacia la membrana, mientras que *EhRab21* aún se encuentra en el citoplasma. Barra=10µm.

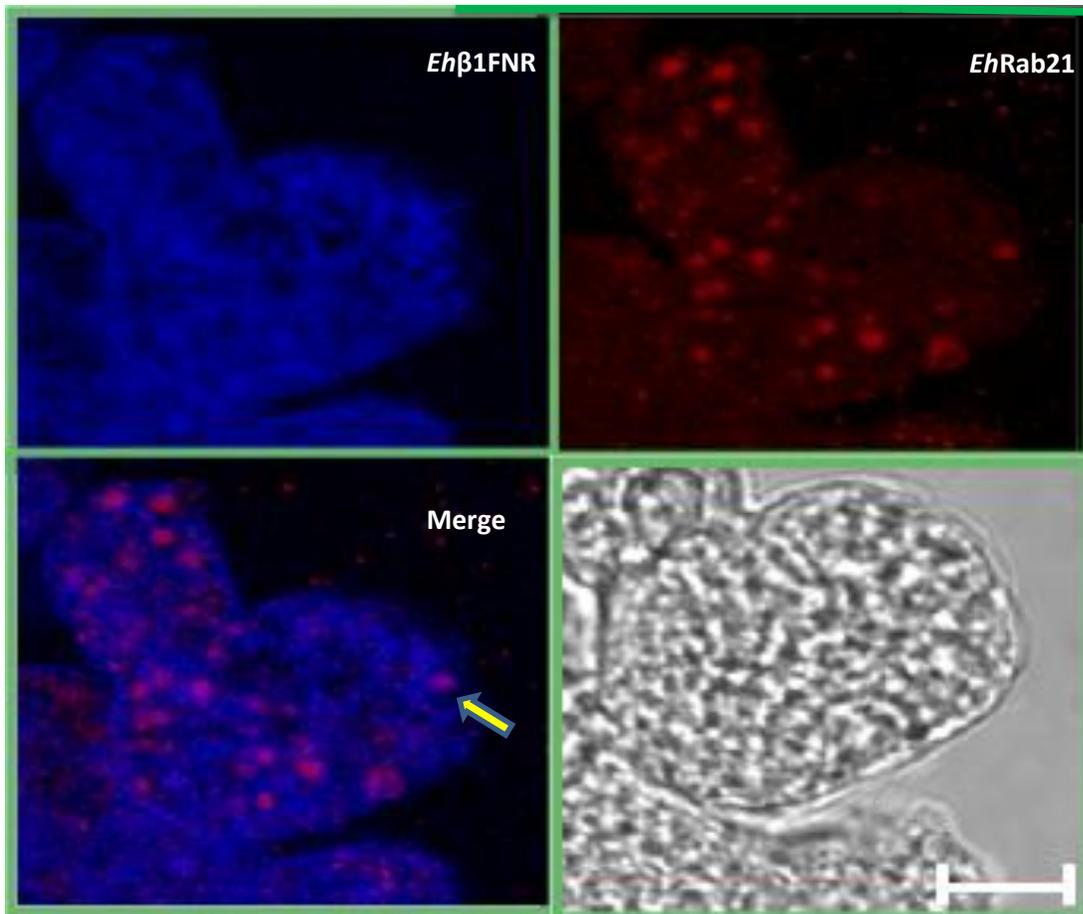


Figura 15. Localización de *Ehβ1FNR* y *EhRab21*. Interacción de trofozoítos con fibronectina durante 5 h. Se presentan las proyecciones máximas. Se observa el reclutamiento de *EhRab21* a vesículas, algunas de las cuales muestran colocalización con el receptor. Barra=10µm.

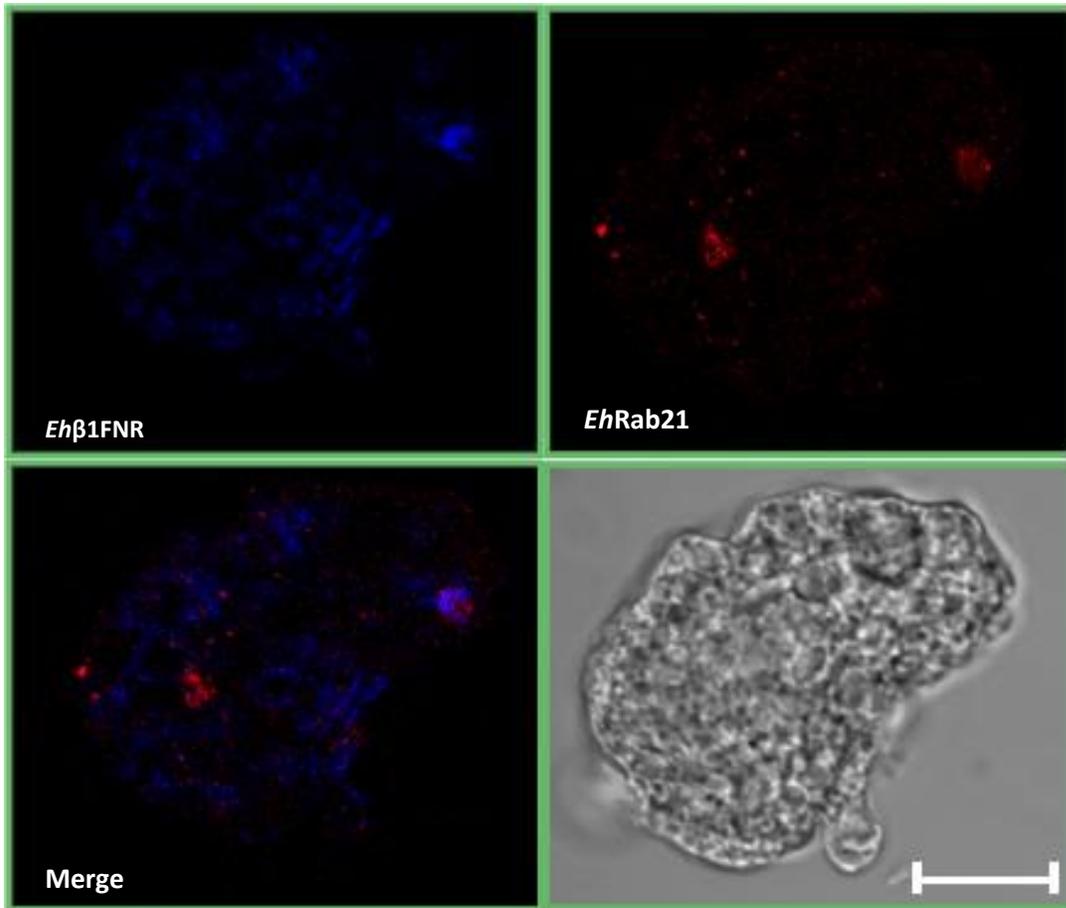


Figura 16. Localización de *Ehβ1FNR* y *EhRab21*. Control de interacción con vidrio durante 5 h. La señal de ambas proteínas se observa en el citoplasma, *EhRab21* no se localiza en vesículas, mientras que el receptor *Ehβ1FNR* si se encuentra localizado en vesículas. Barra=10μm.

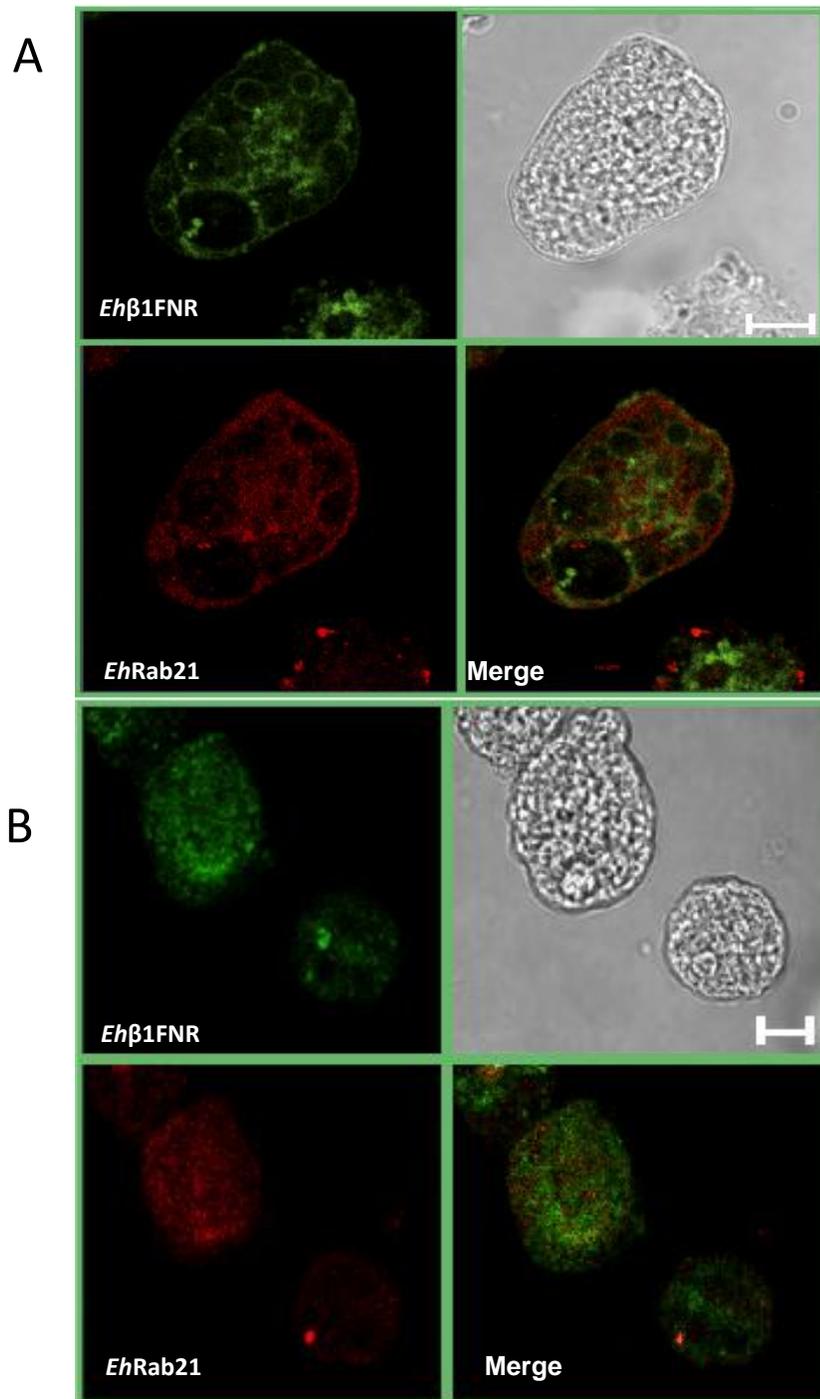


Figura 17. Localización de *Ehβ1FNR* y *EhRab21*. Trofozoítos incubados durante 30 min en vidrio después de 1 h de interacción con fibronectina. Se presentan dos trofozoítos en esta condición. A) Formación de vesículas en las cuales se encuentra el receptor, y se observa una relocalización de *EhRab21* hacia la membrana. B) Otro trofozoíto de la misma preparación, sin embargo en este, el receptor se encuentra en citoplasma, al igual que *EhRab21*, pero se observa colocalización de ambas proteínas en el citoplasma y en una pequeña vesícula. Barra=10μm.

7.3 Ruta de internalización del receptor *Eh* β 1FNR y de *EhRab21*

Para determinar la ruta de internalización de *EhRab21* y la ruta de tráfico vesicular con el receptor *Eh* β 1FNR se usaron diferentes marcadores de organelos. Para determinar si *EhRab21* podría estar participando también en la vía exocítica, se utilizó un marcador del aparato de Golgi.

El uso de la sonda NBD-C6-Ceramide, la cual tiene afinidad por el aparato de Golgi, no mostró colocación aparente entre *EhRab21* y este organelo, lo que permite concluir que *EhRab21* no es residente de este organelo (Figura 18).

Para determinar si *EhRab21* participa en la formación de fagosomas, se interaccionó bacterias de la cepa *E.coli* DH5- α /pEGP con trofozoítos de *E. histolytica* en relación 100:1 durante 15 min. Se observa que *EhRab21* colocaliza con la señal de la proteína GFP, indicando que *EhRab21* participa en la internalización de las bacterias, en la figura 19A, se observa que la bacteria ya está en proceso de degradación, mientras que en la figura 19B se observa una bacteria que no ha sido degradada y que no colocaliza con *EhRab21*. En esa misma ameba en otro corte, se encuentra una bacteria que sí colocaliza con *EhRab21* sugiriendo que *EhRab21* participa en una ruta específica dentro de la internalización de las bacterias.

Se analizó si *EhRab21* participa en la formación de endosomas, por lo que se usó dextrán acoplado a FITC. En la figura 20 se observa que la mayor parte de la señal del FITC-dextrán, no colocaliza con *EhRab21*, por lo que este último no participa en la formación de endosomas.

También se analizó la participación de *EhRab21* y *Eh* β 1FNR durante la eritrofagocitosis. Para ello se interaccionaron eritrocitos previamente fijados y teñidos con faloidina rodaminada con trofozoítos en relación 100:1 respectivamente, durante 15 min en medio sin suero. En la figura 21, se observa la internalización de los eritrocitos, aparentemente en vacuolas en donde se encuentra el receptor *Eh* β 1FNR, y se observa en la proyección máxima, que *EhRab21* se recluta a una gran cantidad de vacuolas, y en donde algunas, se

observa colocación con la marca de la faloidina, probablemente resultado de la degradación de los eritrocitos.

Estos resultados nos indican que *EhRab21* participa en una ruta específica en la internalización de bacterias y eritrocitos, probablemente localizándose en lisosomas. Para comprobar si efectivamente *EhRab21* se encuentra en este organelo se usó la sonda Lysotracker la cual marca específicamente lisosomas, en trofozoítos en interacción con fibronectina durante 1 h y 5 h. En trofozoítos estimulados durante 5 h (figura 22B), se observa una vesícula similar a las descritas previamente, en donde colocan *EhRab21*, *Ehβ1FNR* y el lisotracker. También se observan otros tipos de vesículas donde solamente colocan *EhRab21* y el receptor en trofozoítos interaccionados durante 1 h (Figura 22A). Estos resultados indican que *EhRab21* participa en la vía de degradación.

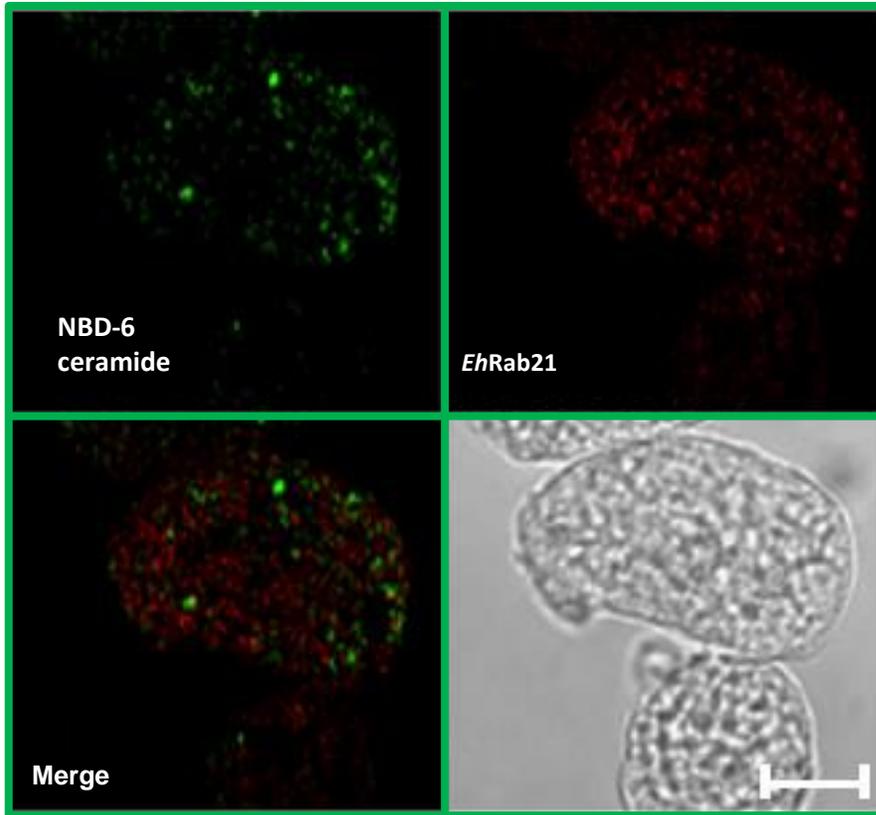


Figura. 18. Marcaje de aparato de Golgi y *EhRab21*. Se realizó el marcaje del aparato de Golgi usando la sonda NBD-6-Ceramide junto con el anticuerpo c- α -*EhRab21*. Se aprecia que *EhRab21* no es residente de este organelo. Barra=10 μ m.

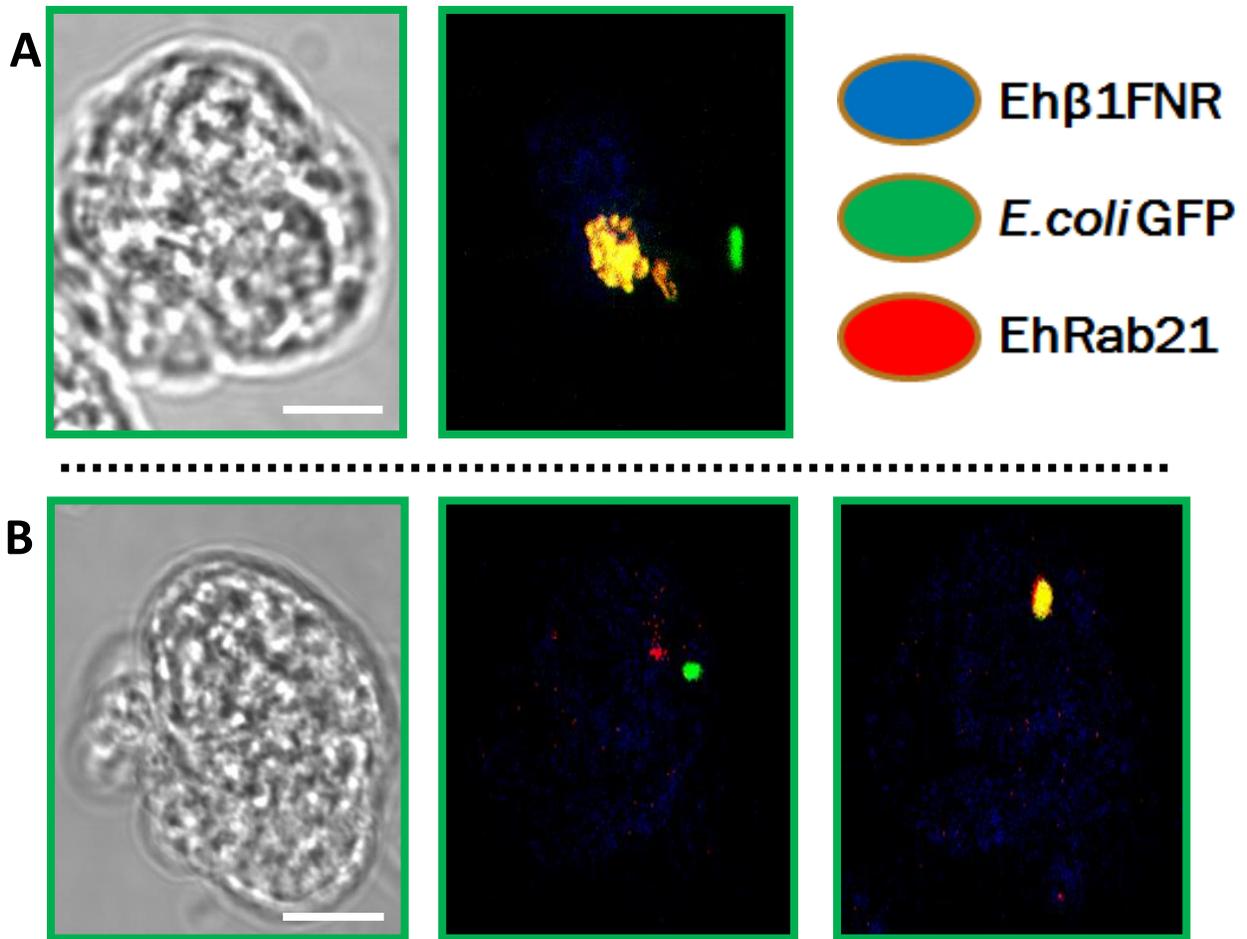


Figura 19. Marcaje de fagosomas. Se observa la señal de *E.coli* fluorescente, en la cual se observa colocalización con *EhRab21* en estructuras vesiculares en donde ya está en proceso de degradación (panel A) y en estructuras en donde la bacteria aún conserva su forma Panel B. Sin embargo, hay bacterias que no colocalizan con *EhRab21*. Barra=10 μ m.

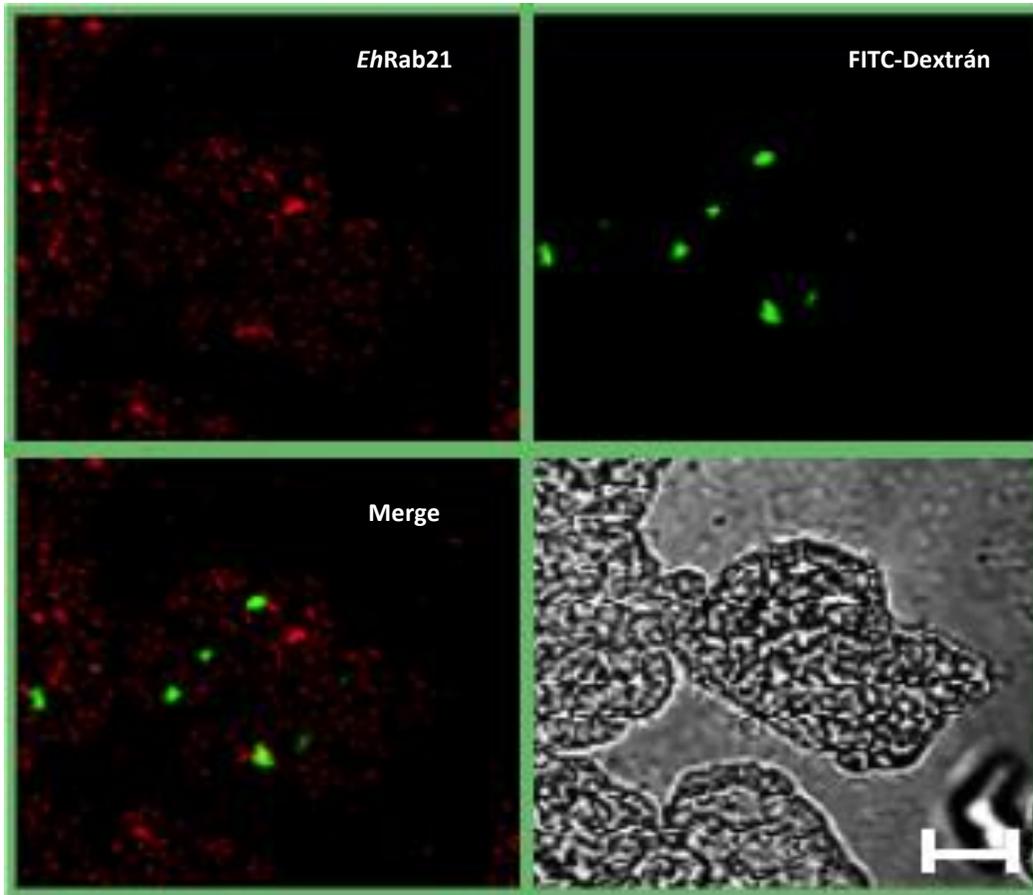


Figura 20. Marcaje de endosomas con FITC-Dextrán. No se observa que *EhRab21* se reclute a los endosomas por el cual se internaliza el Dextrán, por lo que no participa en la formación y transporte de endosomas. Barra=10 μ m.

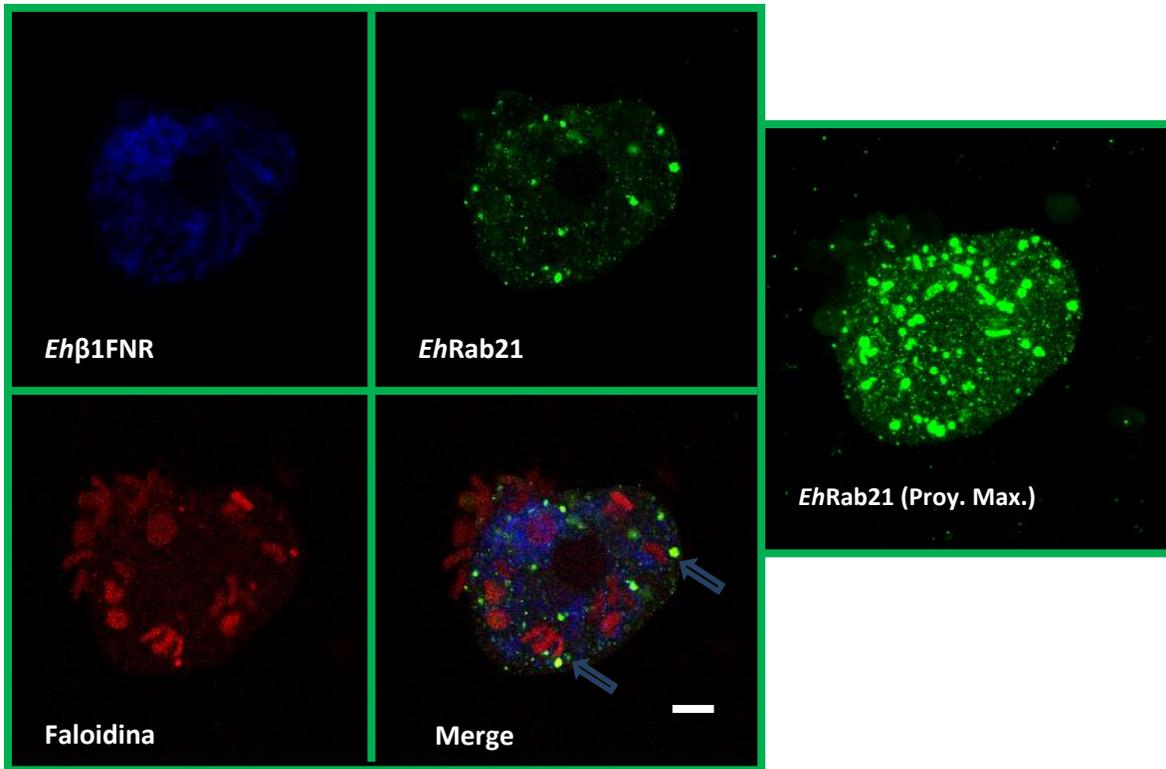


Figura 21. Inmunofluorescencia de *EhRab21* y *Ehβ1FNR* durante la eritrofagocitosis. Los trofozoítos fueron interaccionados con eritrocitos fijados teñidos previamente con faloidina rodhamina durante 15 min. En la proyección máxima (Imagen derecha) se observa el reclutamiento de *EhRab21* a vesículas en respuesta a la internalización de eritrocitos. Se puede observar vesículas en donde colocalizan *EhRab21* y la faloidina (Flecha). Barra=10 μ m.

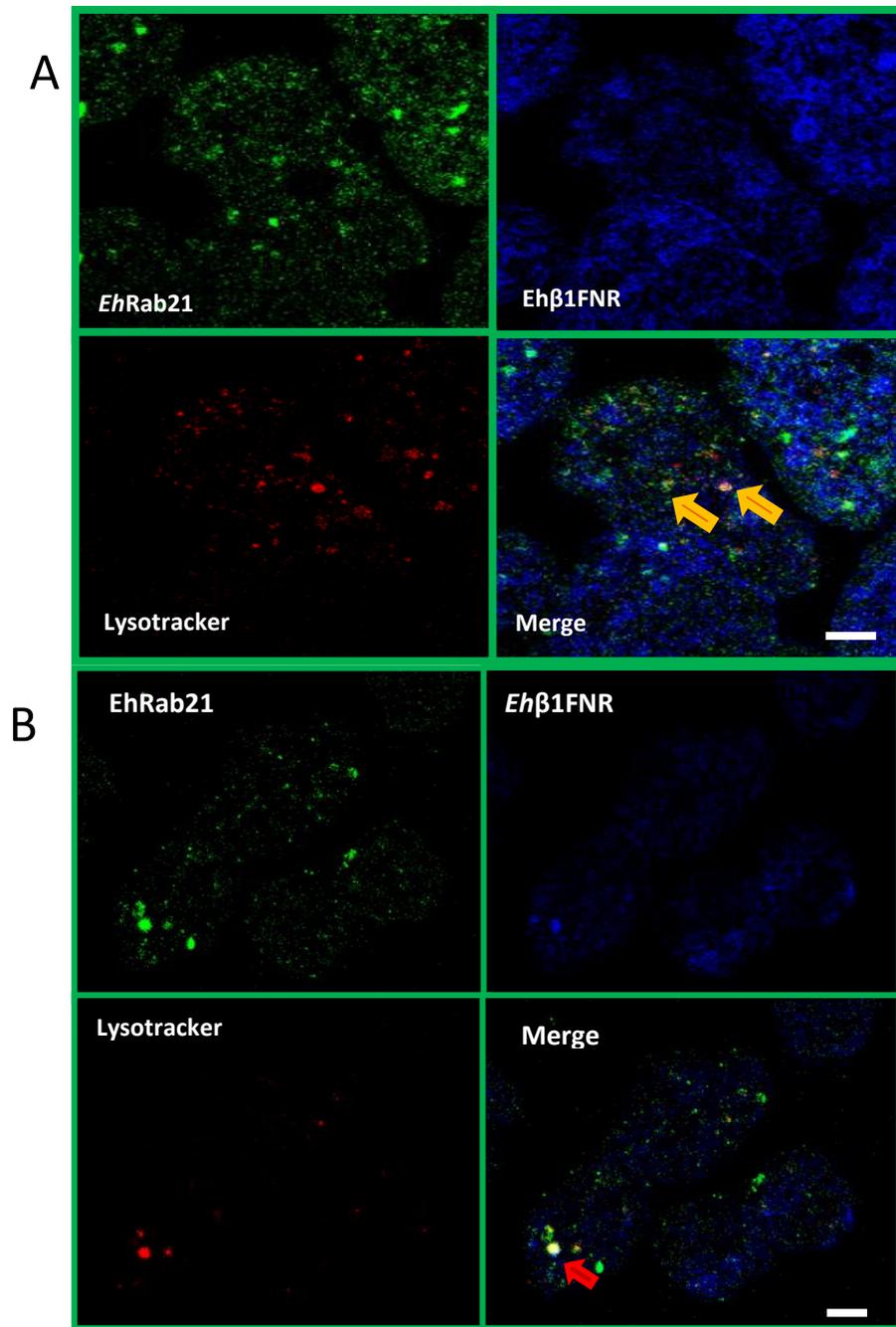


Figura 22. Marcaje de lisosomas durante 12 h, y posteriormente se realizó la interacción de trofozoítos con fibronectina durante una hora (panel A) y 5 horas (Panel B). Se observa que a una hora de interacción hay colocalización de *EhRab21* y el Lysotracker en pequeñas vesículas (flecha naranjas). A las 5 horas se observó colocalización del receptor, de *EhRab21* y Lysotracker en una vesícula de mayor tamaño (Flecha roja). Barra=10µm.

7.4 Interacción entre *Eh*β1FNR y de *Eh*Rab21 (Análisis por FRET)

El análisis por FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer) es un proceso fotofísico distante-dependiente en donde ocurre transferencia no radiactiva de energía desde un fluoróforo donador excitado a un fluoróforo aceptor adecuado. El donador y el aceptor deben guardar una distancia muy cercana para que se lleve a cabo la transferencia de energía, por lo que este fenómeno sólo ocurre en distancias que van de 1 a 10 nm; por lo cual constituye una herramienta útil para determinar la asociación de proteínas.

Para estandarizar el ensayo se realizó un control positivo con el fin de verificar que se esté llevando a cabo el fenómeno de FRET, es decir que sí ocurra la transmisión de energía entre los dos fluoróforos, para lo cual los trofozoítos se marcaron con el anticuerpo monoclonal 3C10 como único anticuerpo primario y posteriormente las células se incubaron con dos anticuerpos secundarios, uno de ellos acoplados a FITC y el otro acoplado a TRITC.

En la figura 23A se observan los resultados obtenidos en este ensayo, el cual dio un 71 % de pixeles positivos para FRET.

Posteriormente, se realizó el análisis usando los anticuerpos primarios 3C10 y c-α-Rab21 y los anticuerpos secundarios FITC cabra anti-ratón y TRITC cabra anti-conejo con trofozoítos interaccionados con fibronectina durante 1 h. Este ensayo dio un 69 % de pixeles para FRET (Figura 23B), confirmando así la asociación entre ambas moléculas ya que estas se encuentran lo suficientemente cercanas para que se lleve a cabo la transferencia de energía entre los fluoróforos.

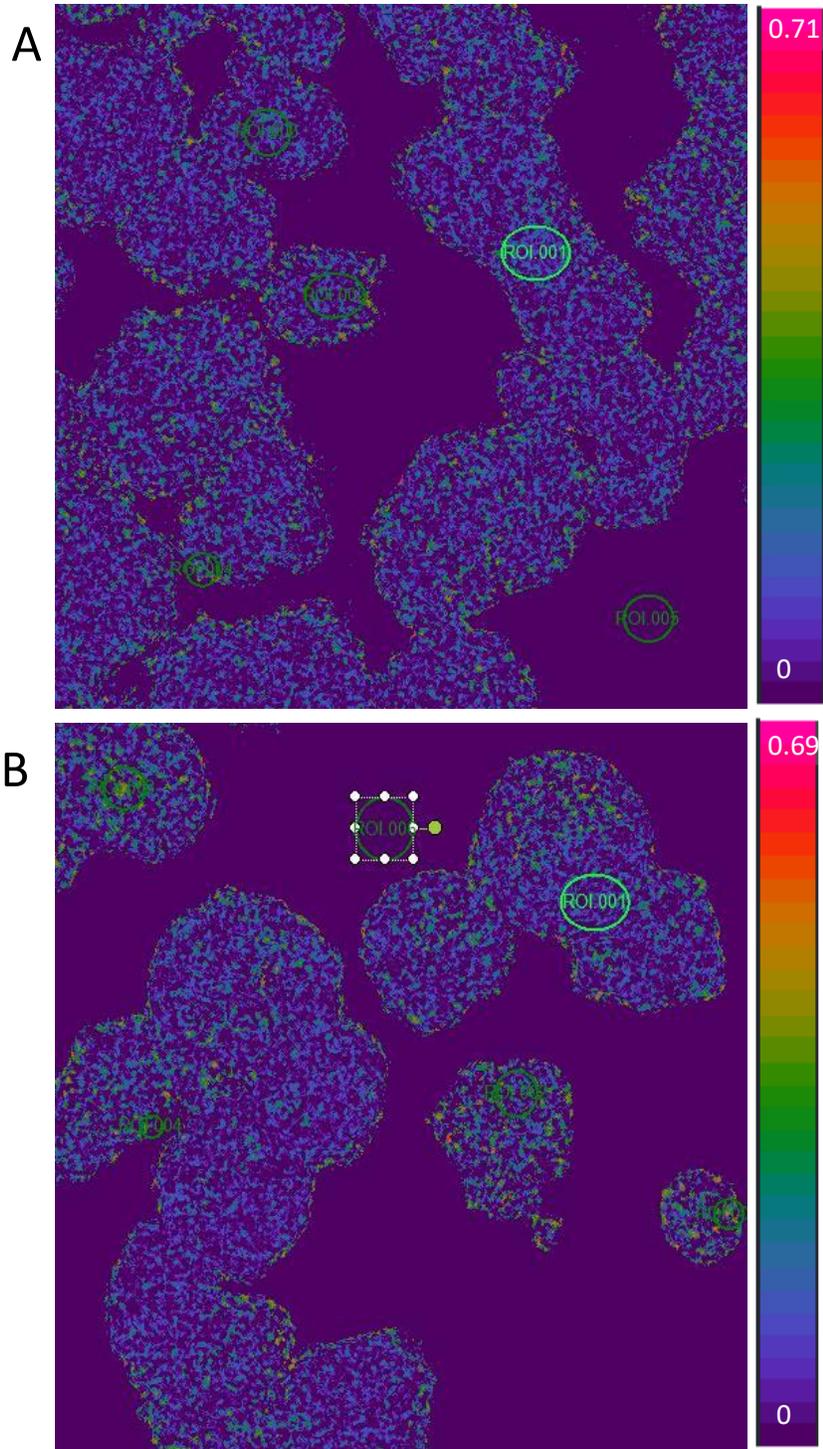


Figura 23. Análisis de FRET. A) Se muestra el control positivo que obtuvo una eficiencia de transferencia de energía del 71% B) Se muestra el análisis de *EhRab21* y *EhβFNR* que obtuvo una eficiencia del 69 %. Los puntos de color indican la zona en donde se detectó en mayor medida el fenómeno de transferencia de energía. Se ve que en la membrana plasmática es donde mayormente ocurre la interacción de ambas moléculas.

VIII. Discusión

Las GTPasas pequeñas de la familia Rab juegan una función durante la regulación del tráfico vesicular en eucariontes (Tang & Ling, 2009). El genoma de *E. histolytica* contiene alrededor de 100 genes que codifican para estas GTPasas, a diferencia del genoma humano que contiene alrededor de 60 genes (Saito-Nakano *et al*, 2005), lo cual indica la alta complejidad del tráfico vesicular en el parásito, el cual debe ser regulado de manera eficiente.

Trabajos previos en el laboratorio han demostrado que el receptor amibiano a fibronectina es una molécula altamente dinámica cuya localización subcelular se modifica en función de la interacción con su ligando, la fibronectina (Hernández-Ramírez *et al*, 2007). Debido a esta observación se decidió explorar la posible participación de *EhRab21* en el proceso de relocalización de esta molécula, dada su similitud antigénica y funcional con las integrinas $\beta 1$ en células eucariontes y el papel de Rab21 en el reciclaje de este tipo de moléculas (Pellinen *et al*, 2006). Con el fin de analizar la participación de *EhRab21* en el proceso, era necesario contar con herramientas adecuadas para dar seguimiento a dicha molécula y también para realizar estudios combinando anticuerpos y sondas para analizar en forma simultánea a las dos moléculas y a diferentes organelos vinculados al tráfico vesicular como son los endosomas, el aparato de Golgi y los lisosomas. Por lo anterior, en el laboratorio se prepararon anticuerpos policlonales en diferentes hospederos utilizando como inmunógeno a la proteína amibiana Rab21 recombinante.

El análisis por western blot de extractos totales de trofozoítos usando anticuerpos anti-Rab21 producidos en el laboratorio (de conejo y hámster), dieron señal positiva para dos bandas, una de 25 kDa y otra de 75 kDa aproximadamente. El peso molecular esperado para *EhRab21* es de 24.23 kDa, el cual concuerda con la banda obtenida de 25 kDa. Sin embargo, la señal de la banda de alto peso no corresponde con *EhRab21* o con alguna otra proteína Rab, ya que el peso molecular de todas las proteínas Rab varía entre los 20 y los 30 kDa.

A pesar de que la secuencia de las proteínas Rab no tiene regiones de anclaje a membrana, éstas realizan su función en estrecha asociación con la membrana de algún compartimiento en específico. Para que las proteínas Rab se anclen a la membrana, necesitan dos grupos geranilgeranilo, una modificación post-traducciona de tipo isoprenoide de 20 carbonos, cuya principal función es servir como sitio de anclaje a membrana (Pereira-Leal, 2000). Esta modificación cambia el patrón electroforético de las proteínas. Sanford *et al* (1995) analizaron la geranilación de Rab5 a través de un sistema de transcripción *in vitro* usando reticulocitos de conejo. En estos estudios encontraron que después de agregarse el grupo geranilo, el corrimiento electroforético de Rab5 cambia, en el que se observa un peso menor aparente con respecto a la proteína sin la modificación.

Debido a esta modificación postraducciona, es posible encontrar tanto la forma geranilada como la forma no geranilada al realizar el análisis por western blot. Este es el caso de *EhRab7*, en donde al realizar el western blot usando anticuerpos producidos contra un péptido específico de *EhRab7*, dichos anticuerpos reconocen dos bandas de peso similar, aunque en este caso de peso similar (Welter *et al*, 2007). La diferencia de peso molecular entre las dos bandas es sólo de 1-2 kDa. Sin embargo, en el caso de *EhRab21*, el análisis de western blot arroja una banda de 25 kDa y otra de 75 kDa.

Una posible explicación para este resultado, es que *EhRab21* se dimerize o se trimerize. Así mismo, al realizar el western blot utilizando como antígeno a la *EhRab21* recombinante, se observa el reconocimiento de bandas de peso molecular diferente al esperado, a pesar de que se purificó la proteína recombinante por electroelución.

Daitoku *et al* (2001), reportan que Rab5 (la cual está relacionada en secuencia con Rab21) es capaz de dimerizarse. La arginina 81 en la región de "Switch" es necesaria para llevar a cabo la dimerización. Esto no se ha comprobado para otras proteínas Rab, sería necesario demostrar con ensayos adicionales en efecto que *EhRab21* es capaz de dimerizarse. Sin embargo, como estrategia alternativa, para

comprobar que ambas bandas corresponden a *EhRab21*, se trabaja en la producción de anticuerpos policlonales contra un péptido específico de *EhRab21*.

Rab21 en conjunto con Rab4, Rab5, Rab7 y Rab11, participan en la vía endocítica en mamíferos (Bhuin *et al*, 2014). Rab21 y Rab5 son proteínas emparentadas con base en la homología de sus secuencias, y se encargan de la internalización y reciclaje de las integrinas $\beta 1$ en células de mamífero. Rab21 es capaz de interactuar directamente con las integrinas $\beta 1$ (Bridgewater *et al*, 2012).

Con base en estos antecedentes, se esperaba que *EhRab21* participara en el reciclaje del receptor *Eh* $\beta 1$ FNR, ya que este último está relacionado inmunológica y funcionalmente con las integrinas $\beta 1$ (Segupta *et al*, 2009). Previamente, en el laboratorio se encontró que el receptor *Eh* $\beta 1$ FNR se regula principalmente por la movilización de citoplasma a membrana y/o viceversa, en vez de síntesis y/o degradación (Hernández-Ramírez *et al*, 2007). La correcta movilización de este receptor puede ser importante para la patogenia de *E. histolytica*.

Sin embargo, de acuerdo con los resultados obtenidos, se puede sugerir que *EhRab21* no participa en el reciclamiento del receptor. En la cinética de interacción a fibronectina, ambas proteínas se encuentran en el citoplasma y, al estimular los trofozoítos con fibronectina, se da la movilización de *EhRab21* a la membrana celular a los 15 min de interacción, mientras que el receptor *Eh* $\beta 1$ FNR se encuentra aún en el citoplasma; caso contrario en la interacción de 30 y 60 min, en donde el receptor *Eh* $\beta 1$ FNR se encuentra en la membrana celular y *EhRab21* se encuentra en el citoplasma. En estos tiempos se observan vesículas donde colocalizan ambas proteínas, sin embargo, el número de estas es limitado para ser consideradas vesículas de reciclaje, ya que ambas proteínas se movilizan por separado. En el tiempo de interacción de 5h, se observa el reclutamiento de *EhRab21* a una gran cantidad de vacuolas, en donde alguna de estas, colocaliza el receptor *Eh* $\beta 1$ FNR. Por otro lado, en esta misma condición, la internalización del receptor se lleva en vacuolas diferentes a las que se encuentra *EhRab21*, probablemente estas vesículas podrían corresponder al punto la selección de

proteínas que van a ser recicladas o enviadas a degradación, pero tendría que ser demostrado.

Al analizar la localización subcelular de *EhRab21*, este no es residente del aparato de Golgi, lo que indica que posiblemente no participa en la vía exocítica. Tampoco se encuentra en los endosomas tempranos, ya que no se colocaliza con el FITC-Dextrán. Welter *et al* (2002) demostraron que *EhRab7* participa en la formación de endosomas ya que esta molécula se recluta a las vesículas en donde se encuentra el FITC-Dextrán y difiere al comportamiento de *EhRab21*.

Sin embargo al analizar su participación en la fagocitosis de bacterias y la eritrofagocitosis, se observa que *EhRab21* colocaliza con las bacterias verdes fluorescentes, en un punto donde la bacteria ya se encuentra en proceso de degradación; sin embargo también se puede apreciar que también hay bacterias ya internalizadas que no colocalizan *EhRab21*.

De manera similar, en la eritrofagocitosis se observa el reclutamiento de *EhRab21* a una gran cantidad de vesículas, en donde algunas colocalizan con la señal de los eritrocitos. Estos resultados podrían sugerir que *EhRab21* se recluta a lisosomas. Para comprobar esta hipótesis, se realizó un marcaje de lisosomas confirmando que en efecto que *EhRab21* sí se recluta a estas vesículas. Es probable que *EhRab21* participe en la vía de degradación de proteínas, y que intervenga en la fusión de lisosomas con endosomas tardíos. En otros protozoarios, los homólogos de Rab21 no participan en el reciclaje de receptores. En la amiba de vida libre *Dictyostelium discoideum*, Rab21 regula la fagocitosis a través de la interacción con dominios proteicos de dedos de Zinc, LimF y ChLim (Khurana *et al*, 2005). En *Trypanosoma brucei*, Rab21 se localiza en endosomas y su principal función es en el transporte de los endosomas hacia los lisosomas. Esto indica que Rab21 se conserva en los eucariontes, ya que es una de las proteínas Rab que pertenece a un clado ancestral endocítico junto con Rab5, Rab20, Rab22, Rab24 y Rab50, el cual se predice estar presente en el último ancestro común eucariótico (Ali *et al*, 2014). Sin embargo, funcionalmente, hay

diferencias de acuerdo al organismo, ya que tiene diferente localización subcelular y función según la especie.

Además de *EhRab21*, existen diversos homólogos de proteínas de Rab humanas en el genoma de *E. histolytica*, sin embargo, la función y localización de estas es diferente en el parásito respecto a las células de mamíferos. En mamíferos, Rab5 y Rab7 participan de manera específica y coordinada en la formación y maduración de endosomas, Rab5 participa en la formación de endosomas tempranos y es un marcador específico de estos compartimientos; posteriormente Rab5 es sustituido por Rab7, lo cual es necesario para la maduración de endosomas tempranos a tardíos, por lo que Rab7 es usado como un marcador específico de endosomas tardíos (Rink *et al*, 2005). Los homólogos del parásito de estas proteínas Rab, tienen una función y localización diferente. *EhRab5* participa exclusivamente en la formación de fagosomas, lo cual es esencial para la internalización de eritrocitos y es importante para el empaquetamiento de hidrolasas lisosomales, antes de dirigirse hacia los lisosomas (Saito-Nakano *et al*, 2004). Por otro lado, *EhRab7* se localiza y participa en la formación de endosomas tempranos y no se encuentra en endosomas tardíos o lisosomas, por lo que es un marcador específico de endosomas tempranos y tiene una función en la formación de éstos (Welter *et al*, 2002).

EhRab21 no participa en el reciclamiento del receptor como su homólogo humano, sin embargo, en los trofozoítos incubados durante 30 min después de una hora previa de interacción con fibronectina, *EhRab21* se relocaliza a la membrana celular, y en algunos otros trofozoítos en la misma condición ambas proteínas se encuentran en el citoplasma y colocalizan.

A partir de los resultados obtenidos en este trabajo no es posible establecer la función de *EhRab21* en la membrana plasmática, pero si se puede sugerir que participa de alguna manera en la movilización del receptor. El análisis de FRET indica que *EhRab21* interactúa directamente con *Ehβ1FNR* en trofozoítos estimulados con fibronectina durante 1 h y esta interacción se observa principalmente en la membrana plasmática.

En humanos, además de Rab21, Rab25 es capaz de interactuar con las integrinas. Filogénicamente, Rab25 pertenece a la subfamilia de Rab11, la cual participa en la vía endocítica en el reciclamiento tardío de receptores (Luen Tang & Ling Ng, 2009). El papel de Rab25 en el cáncer ha sido más estudiado que el de Rab21 (Luen Tang & Ling Ng, 2009). Caswell *et al* (2007) encontró que en células de cáncer de ovario transfectadas con Rab25, esta molécula es capaz de interactuar con las integrinas $\beta 1$ y que se asocia principalmente al heterodímero $\alpha 5\beta 1$, el cual tiene como ligando principal a la fibronectina.

Por lo tanto es probable, que en *E. histolytica*, más de una proteína Rab sea capaz de asociarse con el receptor *Eh* $\beta 1$ FNR, debido a la alta complejidad del tráfico vesicular y al gran número de genes de proteínas Rab que posee en el parásito, por lo que posiblemente otra proteína Rab diferente a *Eh*Rab21, sea la encargada de llevar a cabo el reciclaje del receptor *Eh* $\beta 1$ FNR.

IX. Conclusión

EhRab21 no participa en el reciclamiento del receptor *Ehβ1FNR*, sin embargo, estas dos proteínas interactúan directamente. *EhRab21* participa en la vía de degradación, en donde se recluta a lisosomas y participa en la fusión de endosomas tardíos y lisosomas. Esta función de *EhRab21* podría ser importante para el ciclo de vida del parásito, ya que participa directamente en la vía de degradación, y subsecuentemente en la obtención de nutrientes a través del material internalizado. Por otro lado, en ciertas condiciones se encontró a *EhRab21* en la membrana plasmática, y es en este organelo en donde lleva a cabo principalmente la interacción con el receptor. Sin embargo, no se tiene claro el tráfico del receptor mediado por *EhRab21*, ni la posible función que esté llevando a cabo en la membrana plasmática.

X. Perspectivas

*Comprobar la función de *EhRab21* a través de la generación de mutantes que sobreexpresen la forma funcional de *EhRab21* y una dominante negativa.

*Comprobar la interacción de *EhRab21* y *Ehβ1FNR* por ensayos de inmunoprecipitación.

*Dilucidar la participación de *EhRab21* en la movilización del receptor *Ehβ1FNR*.

*Caracterizar el tráfico del receptor *Ehβ1FNR* completamente y determinar las proteínas Rab que se asocien y regulen la movilización del receptor.

*Identificar y caracterizar los efectores que interactúan con *EhRab21*

XI. Literatura citada

- Ali M, Leung KF, Field MC. 2014. The ancient small GTPase RAb21 functions in intermediate endocytic steps in trypanosomes. *Euk Cell*. 13:304-319.
- Bhuin T, Roy JK. 2014. Rab proteins: The key regulators of intracellular vesicle transport. *Exp Cell Res*. <http://dx.doi.org/10.1016/j.yexcr.2014.07.027>.
- Bouvard D, Pouwels J, De Franceschi N, Ivaska J. 2013. Integrin inactivators: balancing cellular functions in vitro and in vivo. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 14:430-442.
- Bridgwater RE, Norman JC, Caswell PT. 2012. Integrin trafficking at a glance. *J of Cell Sci*. 125:3695–3701.
- Carlton JM, Hirt RP, Silva JC, Delcher AL, Schatz M, Zhao Q, Wortman JR, Bidwel SL, Alsmark UC, Besteiro S, Sicheritz-Ponten T, Noel CJ, Dacks JB, Foster PG, Similion C, Van der Peer Y, Miranda-Saavedra D, Barton GJ, Westrop GD, Müller S, Dessi D, Fiori PL, Ren Q, Paulsen I, Zhang H, Bastida-Corcuera FF, Simoes-Barbosa A, Smith AJ, Vanacova S, Villalvazo M, Haas BJ, Pertea M, Feldblyum T, Utterback TR, Shu CL, Osoegawa K, de Jong PT, Hrdy I, Horvathova L, Zubacova Z, Dolezal P, Malik SB, Logsdon Jr JM, Henze K, Gupta A, Wang CC, Dunne, RL, Upcroft JA, Upcroft P, White O, Salsberg SL, Tang P, Chiu CH, Lee YS, Embley TM, Coombs GH, Mottram JC, Tachezy J, Fraser-Liggett CM, Johnson PJ. 2007. Draft genome sequence of the sexually transmitted pathogen *Trichomonas vaginalis*. *Science*. 315:207-212.
- Caswell PT, Spence HJ, Parsons M, White DP, Clark K, Cheng KW, Mills GB, Humphries MJ, Messent AJ, Anderson KI, McCafrey MW, Ozanne BW, Norman JC. 2007. Rab25 associates with alpha5 beta1 integrin to promote invasive migration in 3D microenvironments. *Dev Cell* 13:496–510.
- Daitokou H, Isida J, Fujiwara K, Nakajima T, Fukamizu A. 2001. Dimerization of small GTPase Rab5. *Int J Mol Med*. 4:397-404.

- Eva R & Fawcett J. 2014. Integrin signalling and traffic during axon growth and regeneration. *Curr Op Neurobiol.* 27:179–185.
- Grosshans BL, Ortiz D, Novik P. 2006. Rabs and their effectors: Achieving specificity in membrane traffic. *PNAS.* 103:11821-11827.
- Haque R, Huston CD, Hughes M, Houpt E, Petri WA Jr. 2003. Amebiasis. *N Engl J Med.* 348:1565–1573.
- Hernandes-Alejandro M, Calixto-Gálvez M, López-Reyes I, Salas-Casas A, Cázares-Ápatiga J, Orozco E, Rodriguez MA. 2013. The small GTPase EhRabB of *Entamoeba histolytica* is differentially expressed during phagocytosis. *Parasitol Res.* 112:1631-1640 pp.
- Hernández-Ramírez VI, Rios A, Angel A, Magos MA, Pérez-Castillo L, Rosales-Encina JL, Castillo-Henkel E, Talamás-Rohana P. 2007. Subcellular distribution of the *Entamoeba histolytica* 140 kDa FN-binding molecule during host–parasite interaction. *Parasitol.* 134:169–177.
- Hernández-Ramírez VI, Osorio-Trujillo C, Ventura-Juárez J, Villegas-Pineda JC, Constantino-Jonapa LA Talamás-Rohana P. 2014. Rab21, the endosomal traffic of the $\beta 1EhFNR$, and their participation in amoebic pathogenesis. Poster presented in ICOPA XIII. Distrito Federal, México.
- Huotari J & Helenius A. 2011. Endosome maturation. *EMBO J.* 17:3481-3500.
- Hutagalung A & Novick PJ. Role of Rab GTPases in membrane traffic and cell physiology. *Physiol Rev.* 91:119-149.
- Javier-Reyna R, Hernández-Rámirez VI, González-Robles A, Galván-Mendoza I, Osorio-Trujillo C. Talamás-Rohana P. 2012. Rab7 and actin cytoskeleton participate during mobilization of $\beta 1EhFNR$ in fibronectin-stimulated *Entamoeba histolytica* trophozoites. *Micr Res & Tech.* 75:285–293.
- Juárez-Hernández LJ, García-Pérez RM, Salas-Casas A, Orozco E. 2013. *Entamoeba histolytica*: The over expression of a mutated EhRabB protein

- produces a decrease of in vitro and in vivo virulence. *Experimental Parasitology*. 133:339-345.
- Khurana T, Brzostowski JA, Rimmel RA. 2005. A Rab21/LIM-only/CH-LIM complex regulates phagocytosis via both activating and inhibitory mechanisms. *EMBO*. 24:2254–2264.
- Kornilova ES. 2014. Receptor-mediated endocytosis and cytoskeleton. *Biochemistry (Moscow)*. 79:865-878.
- Legate KR, Wickstrom SA, Fassler R. 2009. Genetic and cell biological analysis of integrin outside-in signaling. *Genes Dev*. 23:397-418.
- Laemmli UK. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 15:680-685.
- Loftus B, Anderson I, Davies R, Alsmark UCM, Samuelson J, Amedeo P, Roncaglia P, Berriman M, Hirt RP, Mann BJ, Nozaki T, Suh B, Pop M, Duchene M, Ackers J, Tannich E, Leippe M, Hofer M, Bruchhaus I, Willhoeft U, Bhattacharya A, Chillingworth T, Churcher C, Hance Z, Harris B, Harris D, Jagels K, Moule S, Mungall K, Ormond D, Squares R, Whitehead S, Quail MA, Rabinowitsch E, Norbertczack H, Price C, Wang Z, Guillén N, Gilchrist C, Stroup SE, Bhattacharya S, Lohia A, Foster PG, Sicheritz-Ponten T, Weber C, Singh U, Mukherjee C, El-Sayed NB, Petri-Jr WA, Clark CG, Embley TM, Barrell B, Fraser CM, Hall N. 2005. The genome of the protist parasite *Entamoeba histolytica*. *Nature*. 433:865-868.
- Marie C & Petri-Jr WA. 2014. Regulation of virulence of *Entamoeba histolytica*. *Annu Rev Microbiol*. 68:493-520.
- Maxfield FR & McGraw. 2004. Endocytic recycling. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 5:121-132.
- McGugan G & Temesvari LA. 2003. Characterization of a Rab11-like GTPase, *EhRab11*, of *Entamoeba histolytica*. *Mol Biochem Parasitol*. 129:137-146.

- Meza. 2000. Extracellular matrix-induced signaling in *Entamoeba histolytica*: its role in invasiveness. *Parasitol Today*. 16:23–28.
- Mitra BN, Saito-Nakano Y, Nakada-Tsukui K, Sato D, Nozaki Tomoyoshi. 2007. Rab11B small GTPase regulates secretion of cysteine proteases in the enteric protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. *Cell Microbiol*. 9:2122-2125.
- Orozco E, Benitez-Bibriesca L, Hernandez R. 1994. Invasion and metastasis mechanism in *Entamoeba histolytica* and cancer cells. Some common cellular and molecular features. *Mut Res*. 305:229-239.
- Pellinen T, Arjonen A, Vuoriluoto K, Kallio K, Fransén JAM, Ivaska J. 2006. Small GTPase Rab21 regulates cell adhesion and controls endosomal traffic of β 1-integrins. *JCB*. 173:767-780.
- Pellinen T, Tuomi S, Arjonen A, Wolf M, Edgren H, Meyer H, Grosse R, Kitzing T, Rantala JK, Kallioniemi O, Fässler R, Kallio M, Ivaska J. 2008. Integrin trafficking regulated by Rab21 is necessary for cytokinesis. *Develop Cell*.15:371–38.
- Pereira-Leal JB & Seabra MC. 2000. The mammalian Rab family of small GTPases: Definition of family and subfamily sequence motifs suggests a mechanism for functional specificity in the Ras superfamily. *J Mol Biol* 301:1077–1087.
- Ralston KS & Petri-Jr WA. 2011. Tissue destruction and invasion by *Entamoeba histolytica*. *Trends Parasitol*. 27:254-263
- Ramsay AG, Marshall JF, Hart IR. 2007. Integrin trafficking and its role in cancer metastasis. *Cancer Met Rev*. 26:567–578
- Repnik U, Cesen MH, Turk B. The endolysosomal system in cell death and survival. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 5:a008755.

- Sanford JC, Foster L, Kapadia Z, Wessling-Resnick. 1995. Analysis of the stoichiometry of Rab protein prenylation. *Analytical Biochem.* 224:547-556.
- Saito-Nakano Y, Yasuda T, Nakada-Tsukui, Leippe M, Nozaki T. 2004. Rab5-associated vacuoles play a unique role in phagocytosis of the enteric protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. *J Biol Chem.* 279:49497-49500.
- Saito-Nakano Y, Loftus BJ, Hall N, Nozaki T. 2005. The diversity of Rab GTPases in *Entamoeba histolytica*. *Exp Parasitol.* 110:244-252.
- Scott CC, Vacca F, Gruenbeg J. 2014. Endosome maturation, transport and function. *Seminars in Cell & Developmental Biology.* 31:2-10.
- Segunpta K, Hernández-Rámirez VI, Rios A, Mondragón R, Talamás-Rohana P. 2001. *Entamoeba histolytica*: Monoclonal antibody against the $\beta 1$ integrin-like molecule (140 kDa) inhibits cell adhesion to extracellular matrix components. *Exp Parasitol.* 98:83-89.
- Segunpta K, Hernández-Rámirez VI, Rosales-Encina JL, Mondragón R, Garibay-Cerdenares OL, Flores-Robles D, Javier-Reyna R, Pertuz S, Talamás-Rohana P. Physical, structural, and functional properties of the $\beta 1$ integrin-like fibronectin receptor ($\beta 1EhFNR$) in *Entamoeba histolytica*. *Inf Gen & Evol.* 9:962–970
- Talamás-Rohana P, Hernández-Ramirez VI, Perez-García JN, Ventura-Juaréz J. 1998. *Entamoeba histolytica* contains a $\beta 1$ Integrin-like molecule similar to fibronectin receptors from eukaryotic cells. *J Euk Microbiol.* 45:356-360.
- Tang BL & Ling Ng EL. 2009. Rabs and cancer cell motility. *Cell Motil & Cytoskel* 66:365-370.
- Teixeira JE & Mann BJ. 2002. *Entamoeba histolytica*-induced dephosphorylation in host cells. *Infect & Immun.* 70:1816-1823.
- Weedall GD & Hall N. 2011. Evolutionary genomics of *Entamoeba*. *Res Microbiol.* 162:637-645.

- Welter B, Powell R, Leo M, Smith CM, Temesvari LA. 2005. A unique Rab GTPase, *EhRabA*, is involved in motility and polarization of *Entamoeba histolytica* cells. *Mol & Biochem Parasitol.* 140:161-173.
- Welter BH, Laughlin RC, Temesvari LA. 2002. Characterization of a Rab7-like GTPase, *EhRab7*: a marker for the early stages of endocytosis in *Entamoeba histolytica*. *Mol & Biochem Parasitol.* 121:254-264.
- World Health Organization. 1997. Amoebiasis, *Weekly Epidemiological Record.* 72:97-98.
- Ximénez C, Morán P, Rojas L, Valadez A, Gómez A. 2009. Reassessment of the epidemiology of amebiasis: State of the art. *Infec Gen & Evol.* 9:1023–1032.