



CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y
ESTUDIOS AVANZADOS DEL INSTITUTO
POLITECNICO NACIONAL

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE BIOQUIMICA

**“CLONACIÓN Y CARACTERIZACIÓN PARCIAL DE LAS
HELICASAS Prp5 y UAP56/Sub2 DE *Entamoeba histolytica*”**

TESIS

Que presenta

IBT. Vicente Aquino Santos

Para obtener el grado de

MAESTRO EN CIENCIAS

En la especialidad de

BIOQUÍMICA

Director de tesis

Dr. Jesús Valdés Flores

Ciudad de México

septiembre de 2019

AGRADECIMIENTOS

Al Conacyt por la beca otorgada durante el transcurso del posgrado.

Al Dr. Jesús Valdés Flores por darme la oportunidad de formar parte de su equipo de trabajo y por todo el tiempo dedicado al apoyo para mi desarrollo profesional en este ámbito.

A mis asesores el Dr. Edgar Morales Ríos por los consejos y apoyo en la realización de este proyecto, así como al Dr. Miguel Ángel Vargas Mejía por darme el apoyo y consejos de como poder realizar algunos experimentos.

Al QBP José Manuel Galindo (JM Sensei) por apoyarme en la obtención de unas clonas, así como todos esos consejos y las enseñanzas impartidas durante mi estancia en el laboratorio.

A mi familia, mis padres Magdalena Santos y Nolberto Aquino sin su apoyo, consejos y sobre todo sus palabras de aliento para continuar con mis sueños de seguirme preparando. A mi hermano Rubén Aquino por apoyarme en esta aventura, por nunca dejar de creer en mí y más que nada por ser ese pilar y ejemplo en mi formación educativa desde el comienzo de ella. A mis hermanas Martha Elena y Roxana Aquino por darme su apoyo y palabras de aliento durante todo este tiempo. También me gustaría agradecer a mis tíos Rosalinda Santos y Mariano Ruíz que me apoyaron y alentaron para continuar con mi preparación académica. También agradezco a mis primos Gabriel, Daniel y Javier, así como a su esposa Carmen y mi sobrina Denis.

A mis amigos Nicole, Cristian Julio Cesar y Jesús Alberto que siempre estuvieron conmigo e hicieron muy amena la estancia durante estos 2 años de maestría, así como a José Manuel Jauregui (Chema), Adrián Trujillo, Ricardo Ávila. De igual forma quisiera agradecer a mi gran amiga Ana María por todos esos consejos, su apoyo y sobre todo por todos esos grandiosos momentos compartidos.

A todo el equipo de trabajo del laboratorio 11 Gretter, Tea, Martín, a los ya mencionados Cristian, Jesús, JM y el Dr. Jesús Valdés.

Contenido

RESUMEN.....	I
ABSTRACT.....	II
INTRODUCCIÓN.....	1
<i>Entamoeba histolytica</i>	1
<i>Splicing</i> y el espliceosoma.....	2
<i>Splicing</i> en <i>E. histolytica</i>	2
<i>Splicing Factor 1</i> (SF1).....	3
Importancia de las helicasas con caja DExD/H.....	4
Clasificación de las helicasas DExD/H box.....	4
Funciones biológicas de las helicasas DExD/H box.....	7
Helicasas en <i>E. histolytica</i>	10
Participación de Sub2 y Prp5 durante el <i>splicing</i>	11
Participación de Prp5 en el <i>splicing</i> y la transición del complejo E-A.....	11
Participación de Sub 2 en el <i>splicing</i> y la transición del complejo E-A.....	12
JUSTIFICACIÓN.....	14
HIPÓTESIS.....	14
OBJETIVOS.....	15
Objetivo General.....	15
Objetivos particulares.....	15
ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.....	16
Objetivo Especifico 1.....	16
Objetivo Especifico 2.....	16
Objetivo Especifico 3.....	16
Objetivo Especifico 4.....	16
MATERIALES Y MÉTODOS.....	17
Extracción de DNA genómico.....	17
Amplificación y clonación de Sub2, Prp5 y GST-SF1.....	17
Inducción y purificación de las proteínas recombinantes.....	18
Purificación de la proteína recombinante GST-SF1.....	19
Purificación de las proteínas recombinantes His(6)-Sub2 y -Prp5.....	19
Ensayos de Cambio de Movilidad Electroforética (EMSA).....	20
Análisis estadístico de las señales de retardo.....	21

RESULTADOS	22
Amplificación y Clonación de EhSub 2 y EhPrp5	22
Inducción y purificación de las proteínas recombinantes EhSub 2, EhPrp5 y QA2-SF1.	23
Inducción y purificación de EhSub 2	23
Inducción y purificación de Prp5	24
Inducción y purificación de QA2-SF1	25
Caracterización parcial de la función de las proteínas EhPrp5 y EhSub 2.....	25
Interacción de QA2-SF1 con la sonda marcada.	25
Interacción de EhSub 2 y EhPrp5 con la sonda del BP de levadura.	26
DISCUSIÓN	30
CONCLUSIÓN	33
PERSPECTIVAS	34
Anexos.....	35
Secuencias de oligos utilizados	35
Ensayos realizados con la sonda del BP de <i>E. histolytica</i>	36
Bibliografía	37

RESUMEN

Comentado [DEM1]: Falta el resumen en inglés.

El *splicing* es el proceso mediante el cual a la cadena naciente de pre-mRNA se le retiran los intrones para tener un mRNA maduro. Durante este proceso, es de vital importancia la unión del snRNA U1 al sitio de *splicing* 5' (5'ss), así como la unión de SF1 al sitio de ramificación (BP) y U2AF65/35 (factores auxiliares del U2 snRNP de 65 y 35 kDa) al tracto de pirimidinas (pY) y al 3'ss, respectivamente. Acto seguido el snRNA U2 sustituye a SF1 del BP, ocurriendo la transición del complejo temprano E al complejo A.

Prp5 y UAP56/Sub2 son helicasas de la familia DExD/H que además de ser ATPasas participan en el ensamblaje del spliceosoma. En tanto que O'Day (1996) demostró la presencia de Prp5 durante el *splicing*, Zhen Xu y cols. (2004) demostraron que Prp5 es también esencial para la transición del complejo E al A durante el *splicing*. Además, Fleckner y cols. (1997) determinaron la interacción de UAP56/Sub2 con U2AF65, así como su participación durante el *splicing* y su requerimiento para la transición de complejo E al A. Por otra parte, Valdés y cols. (2018) encontraron a Prp5 y Sub2 en ribonucleopartículas de mensajero de *E. histolytica*.

En el laboratorio se demostró que la presencia de U2AF84 en *E. histolytica* bloquea la sustitución de SF1 por U2 en el BP, inhibiendo la transición del complejo E al A durante el ensamblaje del pre-spliceosoma. Teniendo en cuenta que EhPrp5 y EhSub 2 están presentes durante la transición de estos complejos, en este trabajo identificaremos la función de empalme o desempalme que puedan tener entre U2 snRNA y el BP. Una vez conociendo su función, se planea elucidar su participación en la sustitución de SF1 por U2 snRNA del BP.

Nuestros resultados demuestran que las proteínas EhPrp5 y EhSub 2, independientemente, interaccionan con la secuencia consenso del BP de *E. histolytica*, pero en presencia del snRNA U2, la interacción de ambas en conjunto se potencia. Por otra parte, se reprodujo la interacción del dominio QA2-SF1 con el BP en presencia del snRNA U2, y la adición independiente de EhPrp5 o EhSub 2 generó un segundo retardo adicional al de QA2-SF1/snRNA U2, mismo que disminuyó cuando ambas proteínas estuvieron presentes.

Con los resultados obtenidos concluimos que las proteínas pueden interaccionar con el BP siempre y cuando esté presente el U2 snRNA, pero debe existir algún otro cofactor que permita que se genere un retardo evidente. Por otra parte, la presencia de SF1 ayuda a generar un segundo complejo de retardo, pero no es suficiente para que sea mayoritario o único, pudiendo existir algún otro cofactor necesario para que esto ocurra.

ABSTRACT

Splicing is the process whereby introns are removed during pre-mRNA maturation. To this end, binding of snRNA U1 to the 5' splicing site, as well binding of SF1 to the branch point, and binding of U2 snRNP auxiliary factors of 65 and 35 kDa to the polypyrimidine tract (pY) and 3' splice site, respectively, is vital. Then, U2 snRNA replaces SF1 at the BP, thus transition from early complex E to complex A occurs.

ATPases of the DExD/H-box family RNA helicases Prp5 and UAP56/Sub 2 participate in the assembly of the spliceosome and are essential for splicing complex E to complex A transition (O'Day, 1996; Zhen Xu et al., 2004). In addition, Fleckner et al. (1997) determined the interaction of UAP56/Sub 2 with U2AF65. On the other hand, Valdés et al. (2018) found Prp5 and Sub2 in messenger ribonucleoproteins of *E. histolytica* assembled *in vivo*.

Our laboratory demonstrated that EhU2AF84 blocks the replacement of SF1 by U2 in the BP, inhibiting the transition of complex E to A during the assembly of the pre-spliceosome. This is the reason why, considering that EhPrp5 and EhSub 2 are involved in the transition of these complexes, we wanted to pinpoint their function in U2 snRNA and BP hybrid formation and replacement of SF1.

Our results demonstrate that the EhPrp5 and EhSub 2, independently interact with the consensus sequence of *E. histolytica* BP, but in the presence of the U2 snRNA the interaction of both together is enhanced. On the other hand, the interaction of the QA2-SF1 domain with the BP was reproduced in the presence of snRNA U2, and the independent addition of EhPrp5 or EhSub 2 generated a second complex in addition to that of QA2-SF1/snRNA U2; the signal of such complex decreased when both proteins were present.

We conclude that EhSub 2 and EhPrp5 can interact with the BP provided U2 snRNA is present. On the other hand, the presence of SF1 helps to generate a second shifted complex, which is not sufficient to recruit the majority of the probe, suggesting that full-complex formation could require additional cofactors.

INTRODUCCIÓN

Entamoeba histolytica

El ser humano es blanco de muchas infecciones. Estas pueden ser causadas por bacterias, virus, protozoos, etc. Un protozoo que infecta a los seres humanos es *Entamoeba histolytica*, el agente causal de la amebiasis. Datos de la organización mundial de la salud indican que este protozoo infecta aproximadamente al 10% de la población en países en vías de desarrollo, principalmente aquellos que presentan un clima tropical, además de que este protozoo causa alrededor de 100 mil muertes por año a nivel mundial [1].

El ciclo biológico de *E. histolytica* comienza con la ingesta de agua o alimentos contaminados con quistes del protozoo, al llegar al intestino delgado estos se desenquistan y convierten en trofozoítos. Una vez que llegan al intestino grueso, estos pueden proliferar o volver a enquistarse, estos últimos son desechados junto con la materia fecal y dar inicio al ciclo de nuevo (Fig. 1) [2]. Por otra parte, los trofozoítos pueden colonizar el intestino grueso como comensales inofensivos o bien invadir la mucosa intestinal y causar destrucción tisular. También pueden invadir con menos frecuencia a otros órganos como hígado, pulmones, el cerebro y la piel [3].

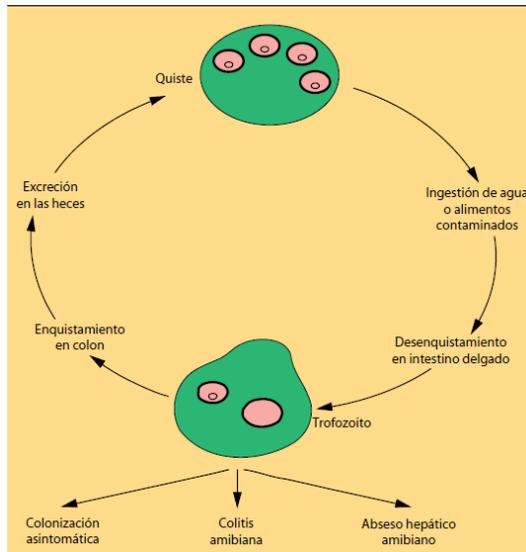


Figura 1. Ciclo biológico de *E. histolytica*. inicia con la ingesta de alimentos o agua contaminada con el parásito y este se desenquista en el intestino para generar colitis amebiana, absceso hepático amebiano o una colonización asintomática. Además, este puede quedarse enquistado y ser excretado por las heces fecales.

Comentado [DEMR2]: Los pies de figura no van en itálicas.

Splicing y el espliceosoma

Desde el origen de la vida, la evolución y adaptación de los microorganismos a su entorno han desarrollado en una gran variedad de formas de vida, cada uno de estos se diferencia uno del otro por su información genética, así como la forma en que la almacenan y la expresa.

Durante la expresión, el *splicing* es el mecanismo por el cual se lleva a cabo una parte de la maduración del pre-mRNA. Este proceso da variabilidad en la expresión de genes. El *splicing* es llevado a cabo co-transcripcionalmente. Durante este proceso, se ensamblan secuencialmente distintas snRNP (*small nuclear ribonucleoprotein*), compuestas de proteínas y snRNA (*small nuclear RNA*), a la cadena nascente de pre-mRNA para formar el espliceosoma [4]. Esta es una maquinaria muy dinámica, permitiéndole tomar distintas conformaciones para poder eliminar el o los intrones del pre-mRNA dando lugar a la fusión de exones que conforma un mRNA maduro.

La formación del espliceosoma inicia con la unión de U1 snRNA al 5' ss (*splice site*), seguido de SF1 (*splice factor 1*) uniéndose a la secuencia del BP (*branch point*) y U2AF65/35 (U2 *auxiliar factor* de 65 y 35 kDa) al tracto de polipirimidinas (pY) y al 3' ss, respectivamente. Posteriormente, en presencia de las RNA helicasas Sub2 y Prp5, el snRNA U2 reemplaza a SF1 del BP generando un híbrido RNA-RNA, de esta forma conformado el complejo prespliceosomal A. El espliceosoma precatalítico o complejo B es generado por la entrada de las tri-snRNP de U4/U6.U5, sustituyendo estos al snRNA U1 del 5' ss y, luego de que se forme el híbrido RNA-RNA U2/U6, el U4 snRNP se desprende de ellas, generando así el espliceosoma activado o Complejo B^{ACT}, que con la llegada de otras dos helicasas (Brr2 y Snu114) quedará catalíticamente activo (B*). Posteriormente la helicasa Prp2 reconvierte al complejo en catalítico C y ocurre la primera reacción de transesterificación en la cual el grupo hidroxilo de la adenosina del BP ataca al 5' ss, dando origen a un exón 5' libre y un intrón lariat-exón 3'. Otras dos helicasas, Prp22 y Prp16, propician la segunda reacción de transesterificación en el que el exón 5' libre ataca al exón 3' generando de esta forma un el mRNA y liberándose el complejo intrón lariat (Fig. 2) [5-7].

Splicing en E. histolytica

E. histolytica este proceso es similar. Este protozoo presenta alrededor de 2553 intrones en sus 9938 genes reportados [8,9]. Estos intrones conservan las secuencias consenso de los 5' ss (GUUUGU) y 3' ss (UAG), pero el sitio del BP no es conservado [15]. La gran mayoría de los intrones amebianos sólo han sido anotados *in silico* [9] y pocos han sido validados [9-16]. Otra diferencia importante en este protozoario es el tamaño de U2AF65 ya que en *E. histolytica* la subunidad grande de U2AF es de 84 kDa, es decir U2AF84 [9]. Por otra parte, se ha encontrado la presencia de los snRNA de U2, U4, U5 y U6 [86,87], pero la presencia del snRNA U1 no ha sido identificados por homología de secuencia, lo que sugiere que está ausente en el protozoario [88]. Sin embargo, la presencia de esta snRNP fue predicha por estudios bioinformáticos, pues los 3 factores que la conforman, U1-A, U1-C, and U1-70k [89-91] han sido anotados en el genoma amebiano. La ausencia del snRNA U1 reportadas por Dávila on en los estudios de Davis y colaboradores en el 2008 [89], sugiere que algún

otro snRNA, como U6, podría estar realizando las funciones de U1 en la unión con el 5' ss como se ha reportado previamente [90].

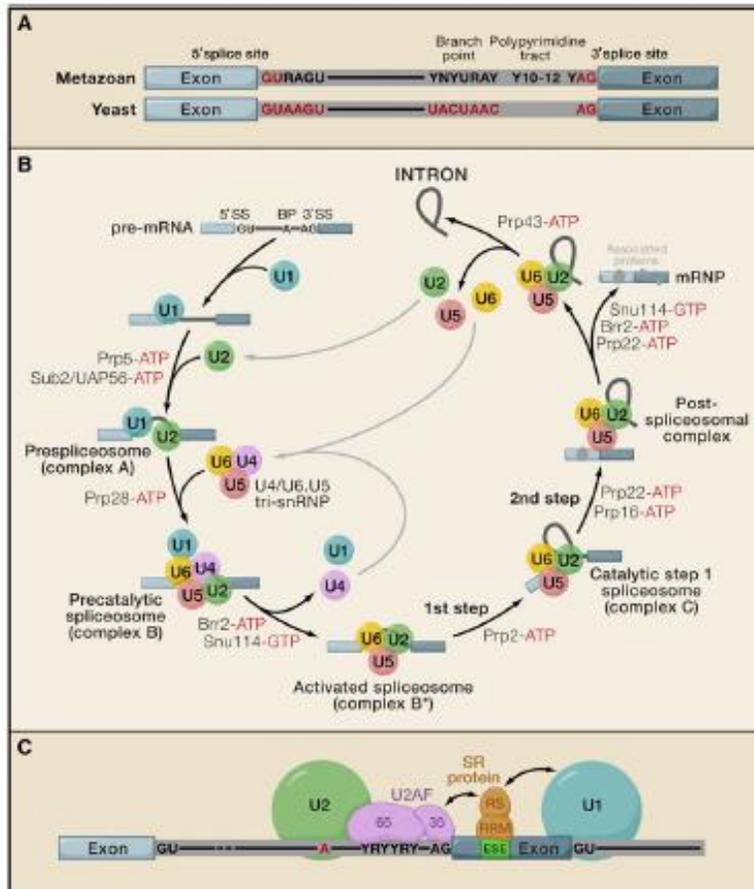


Figura 2. Splicing del pre-mRNA y spliceosoma. Regiones consenso de componentes de un intrón (a). Esquema del proceso de splicing (b) y ensamble de las snRNP participantes en la formación del complejo A de splicing (c).

Comentado [DEMR3]: Letra regular

Splicing Factor 1 (SF1)

Como se mencionó anteriormente, la proteína SF1 interactúa con la secuencia del BP y se une a ella. SF1 es una proteína de la familia STAR (*signal transduction and activation of RNA*) [100], las cuales poseen un dominio QA2 (*Quaking homology 2*) localizado en el Carboxilo terminal del dominio KH [101]. Por otra parte, se ha encontrado que la región del KH-QA2 y los dedos de zinc (Zn) localizados además en el carboxilo terminal de SF1 han estado implicadas en la unión al sitio del BP del pre-mRNA [102-104]. Es conocido que SF1 es sustituida por U2 snRNA

dando inició al complejo A, pero antes de que esto suceda, SF1 y U2AF65 interaccionan para poder seguir con los siguientes pasos del *splicing* [105], pero si la Ser20 presente en SF1 no es fosforilada por PKG (*proteín kienase G*) genera así una inhibición de la interacción ocurrida entre SF1 y U2AF65 [106].

Importancia de las helicasas con caja DExD/H.

Una gran variedad de procesos genéticos requiere el desdoblamiento o generación de híbridos, ya sea DNA/DNA, RNA/RNA o DNA/RNA. Para que este pueda llevarse a cabo, se requiere la participación de una gran variedad de proteínas, entre las que se cuentan las helicasas [17].

Debido a la gran diversidad biológica que presentan las helicasas, y a que están presentes en la mayoría de los organismos, siendo estas altamente conservadas entre ellos, se sugiere que los genes que las codifican provienen de un ancestro en común [18].

Estas proteínas presentan 8 motivos altamente conservados. Los dominios I, Ia, Ib y II-VI son los dominios de unión e hidrolisis de ATP, por lo cual estas proteínas son ATP dependientes (Fig 3). La conformación que pueden tomar estos en su estructura terciaria les proporcionan distintas funciones a estas helicasas como en la catálisis y la unión a sustrato [19].

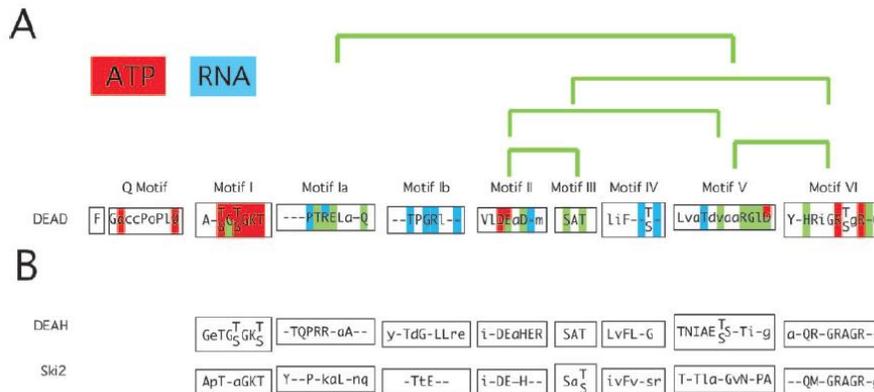


Figura 3. Representación esquemática de los motivos conservados de la familia DEAD-box. (A) Secuencia de consenso de la familia DEAD-box. Se resaltan los residuos identificados en la estructura de la proteína Vasa para interactuar con ATP (rojo), ARN (azul) o involucrados en interacciones intra-proteínas (verde). (B) Secuencias de consenso de la familia DEAH-box y Ski2. Las secuencias consenso (las letras mayúsculas representan los aminoácidos conservados al menos el 80%, las letras minúsculas representan los aminoácidos que se conservan del 50 al 79%) se tomaron de Tanner y Linder [10].

Clasificación de las helicasas DExD/H box.

Estas proteínas están clasificadas en tres familias, SF1, SF2 y SF3 [19]. Siendo la más caracterizada las SF2, esta superfamilia se caracteriza por presentar dos dominios de unión RecA, así como variación de sus aminoácidos en la DExD/H box y/o la extensión del carboxilo terminal. Estas cajas se denominan así debido a sus aminoácidos conservados de Asp, Glu, x= a cualquier otro aminoácido, ya sea Ala, Cis, Val, Asp/His [20]. Algunas de

estas helicasas funcionan como monómeros, pero se ha reportado que algunas funcionan como homodímeros [17,18].

Helicasas DEAD box.

Uno de los integrantes de la superfamilia de las SF2 son las RNA helicasas DEAD box, las cuales son encontradas en casi todos los organismos [19]. Estas proteínas son exclusivamente ATP dependientes, debido a la estimulación por la unión con el RNA. Cabe resaltar que ellas presentan una baja actividad de desdoblamiento, pero pueden interactuar con una sola hebra de RNA independientemente si esta es un dúplex o no. Una vez que las helicasas unen al ATP, estas sufren un cambio conformacional, lo que resulta en restricciones físicas que propicia la desestabilización del RNA unido a ella [20]. Es importante mencionar que en ciertas ocasiones el sustrato de estas proteínas puede ser una proteína que este unida al RNA. Por otra parte, hay proteínas de esta familia que reconocen una secuencia de RNA específica [20]. Los tres miembros de esta familia que participan durante el *splicing* son Prp5, Sub 2 y Prp28, estas presentan un alto grado de conservación de sus dominios centrales, además de que los extremos amino y carboxilo presentan poca conservación entre ellos (Fig. 4A). Un dato curioso es que, en eucariotas, Prp5 y Prp28 presentan en su amino terminal una secuencia repetida de residuos de Ser-Arg (SR), sientos encontrados estos residuos repetidos en factores de *splicing* de RNA que participan durante el *splicing* alternativo [21-23].

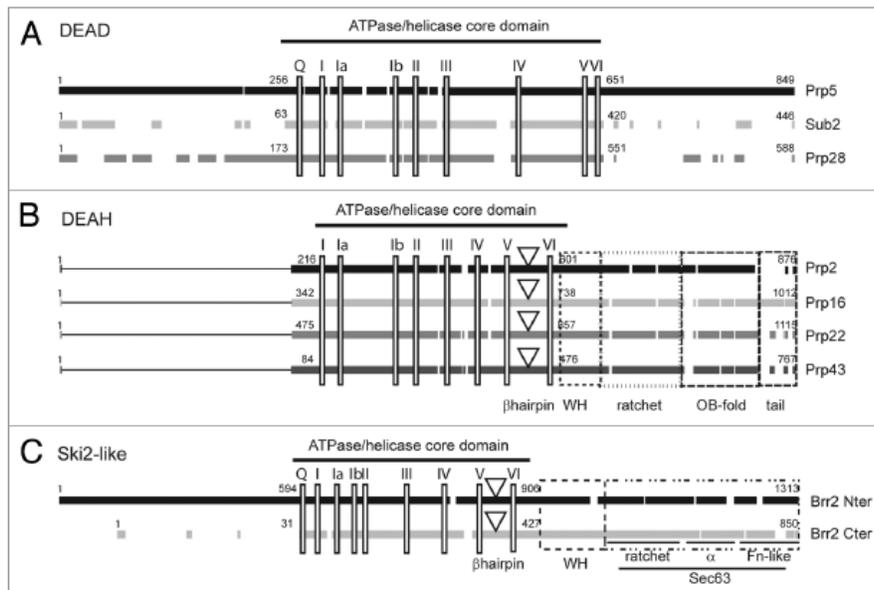


Figura 4. Las helicasas pertenecen a tres familias distintas. Alineación de secuencia primaria de las helicasas de *S. cerevisiae* de las familias DEAD-box (A), DEAH-box (B) y Ski2-like (C) involucradas en el empalme de pre-mRNA. Los bloques negros y grises representan las regiones conservadas dentro de cada familia. Las líneas en los extremos amino de las helicasas de la caja DEAH indican la falta de secuencias conservadas en esta región. Las posiciones de los motivos conservados se indican mediante rectángulos verticales. Para las helicasas tipo DEAH-box y Ski2, un triángulo hacia abajo

indica la posición de la horquilla β propuesta para actuar como un separador de hebras. Las cajas discontinuas indican los dominios conservados en los extremos carboxilo de las proteínas de la caja DEAH y en los dos módulos de helicasa de la helicasa Brr2 tipo Ski2 [17].

Helicasas DEAH box.

Otro miembro de esta super familia son las helicasas DEAH box, que en levadura se ha encontrado poseen su dominio central altamente conservado, con excepción del motivo Q del cual carecen estas proteínas, pero también poseen un carboxilo terminal altamente conservado. Como se puede observar en la figura 4B, todas poseen una organización similar en su organización secundaria, ya que tienen un dominio conservado llamado β -hairpin (5'HP), un dominio de *winged helix* (WH), un dominio involucrado en la unión de RNA y de translocación durante el empalme de RNA y un dominio DUF1605 (*Domain of Unknown Function*) que adopta una forma de unión a oligosacáridos (OB-fold) [24-27]. Los dominios conservados 5'HP y el DUF1605 participan en la unión al RNA, así como de su actividad de desenrollamiento. Estos dominios les confieren a las helicasas DEAH box la habilidad de requerir una sola hebra de sustrato para poder interactuar [36]. De las 6 helicasas DEAH box que están presente en *S. cerevisiae*, cuatro de ellas participan en el *splicing*, Prp2, Prp16, Prp22 y aunque Prp43 participa en el *splicing* se ha observado que participa también en el procesamiento del rRNA [36].

Debido al amplio rango de conservación de estas helicasas, se sugiere un mecanismo de acción y regulación similar. En el spliceosoma, la actividad de ATPasa de Prp2 y Prp43 es accionada por proteínas G-patch, como Spp2 y Spp382 respectivamente [5,26,28,29], mismas que median la regulación de Prp2 y Prp43 a través de la interacción con el dominio OB-fold de las helicasas [25].

Helicasas Ski2-like.

El último miembro de esta superfamilia de la SF2 son las helicasas Ski2-like, de esta familia solo Brr2 es la única que está participando durante el *splicing* [18]. Estas helicasas presentan una estructura similar a las DEAD box y las DEAH box anteriormente mencionadas, ya que poseen una versión del motivo Q presente en las helicasas DEAD box y un espacio parecido al motivo 5'HP presente en las helicasas DEAH, este espacio se encuentra entre los motivos V y VI (Fig 4C) [15]. Santos y colaboradores en el 2012, resolvieron la estructura cristalográfica del fragmento que comprende los residuos 395-2129 de la helicasa de Brr2 humana [35], esta estructura confirmó la organización modular de Brr2 y, en particular, la contribución del primer dominio Sec63 (ratchet) a la formación de un túnel en el que podría unirse RNA y trasladar durante el desenrollamiento del mismo. El segundo dominio helicasa y el segundo dominio Sec63 (α) forman un túnel similar, aunque es posiblemente a la presencia de residuos cargados negativamente que se evite la unión a RNA. Aunque se ha propuesto que este segundo túnel formado en la helicasa ha conservado su capacidad de unión a ATP, pero no su capacidad de hidrólisis [36].

Funciones biológicas de las helicasas DExD/H box

Se han descrito un amplio número de funciones para las proteínas de las familias de las helicasas DExD/H box, la mayoría de estas funciones están involucradas en distintos pasos del procesamiento del RNA. En células eucariotas, estas funciones van desde la transcripción a la degradación del RNA, pasando por el *splicing* del pre-mRNA, exportación del mRNA, biogénesis del ribosoma, iniciación de la traducción del mRNA, y la expresión de genes en organelos (Fig. 5).

Transcripción

Varias helicasas DExD/H box han sido involucradas durante la transcripción, tales proteínas son de la familia de helicasas DEAD box y una de la familia de las helicasas DEIH (Dhx9). Fuller-Pace en 2006 [37] revisó varias proteínas que presentan esta función, las cuales son Dhx9 [78], DP103 (Ddx20) [79], p68 (Ddx5) [80], p72 (Ddx17) [81], RHII/Gua (Ddx21) [82-84] y DP97 (Ddx54) [85].

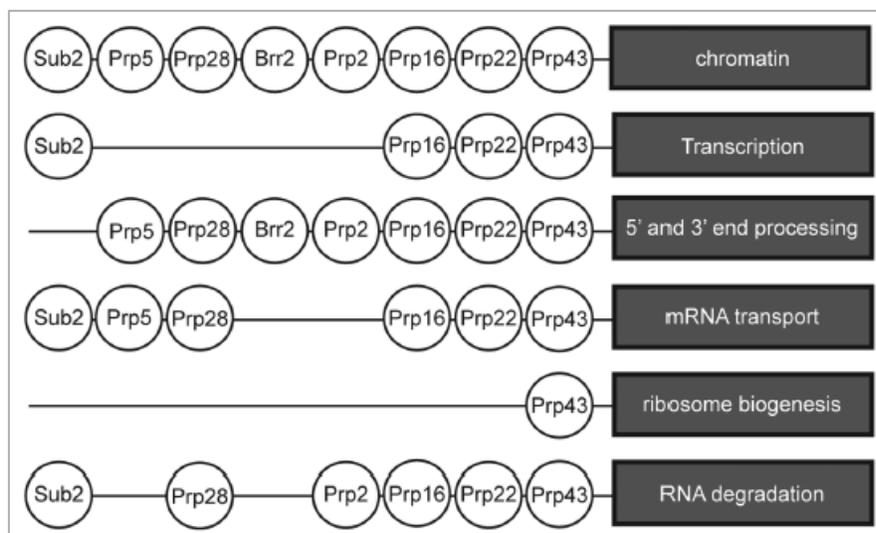


Figura 5. Participación de las helicasas DExD/H. Se observa su participación en distintos procesos del metabolismo del mRNA, desde el *splicing* del pre-mRNA, transporte del mRNA hasta la degradación del RNA [36].

Splicing del pre-mRNA

Debido a que un gran número de proteínas participan durante el *splicing* (>200) [44], todas estas proteínas generan cambios conformacionales en el spliceosoma y muchas de estos cambios requieren un consumo energético considerable, dicha función recae en las helicasas DExD/H box. En levaduras, algunas de las helicasas que participan durante este proceso son las ya mencionadas Sub2, Prp5, Prp28 [45]. En eucariontes, se demostró que p68 participa

tanto en *splicing* constitutivo y durante el alternativo [46,47]. Además, se requieren Prp2, Prp16, Prp22, Prp43 y Brr2 [45,48-54]. Curiosamente, las helicasas DEAD box son requeridas para la estabilización de un spliceosoma funcional, además de que las proteínas DEAH box son indirectamente indispensables para las reacciones de transesterificación, así como para el relajamiento del mRNA y la reutilización de los componentes del spliceosoma (Fig. 6).

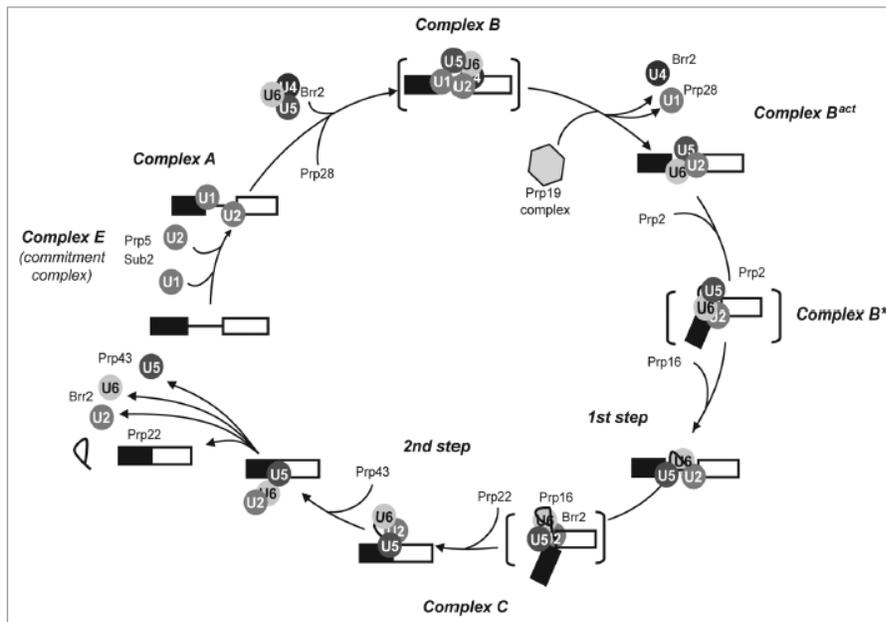


Figura 6 RNA helicasas en la vía de ensamblaje / desensamblaje del spliceosoma. El orden de ensamblaje de U snRNPs y los pasos de asociación y actividad de las helicasas se muestran en una transcripción que contiene un solo intrón [36].

Biogénesis del ribosoma.

Son muchos factores que participan en el proceso de biogénesis de los ribosomas [55,56], así como algunas proteínas de las helicasas DEAD box, DEAH box y Ski2-like. El número de estas proteínas varía según la especie donde se vea, es decir, en procariotas como *Borrelia burgdorferi* no participan estas helicasas, mientras que en *Escherichia coli* participan 3 de estas proteínas 5, por otra parte, en *S. cerevisiae* son requeridas 14 helicasas DEAD box para la biogénesis del ribosoma [40,57,58].

Los ribosomas eucariotas se componen de 4 rRNA y 78 proteínas [56], tres de las especies de rRNA maduros se transcriben como un gran pre-rRNA y, durante la reacción de ensamblaje, se procesan a los tres 18S maduros, así como 5.8S y 25S rRNAs. En reacciones posteriores, el 18S y 25S rRNA son modificados por pseudouridinaciones y metilaciones,

siendo estas modificaciones dirigidas por snoRNAs (nucleolar RNAs) [59]. Es por lo cual, las proteínas DEAD-box podrían desempeñar un papel en la reorganización de los complejos pre-ribosómicos al llevar a cabo la disociación de los snoRNAs de los pre-rRNA, para permitir que se lleven a cabo nuevas interacciones RNA-RNA [77].

Exporte nuclear

En células eucariotas la transcripción y la traducción son realizados en compartimentos separados, por lo que el mRNA debe ser transportado del núcleo al citoplasma a través de los poros nucleares. En levadura, mutaciones realizadas para disminuir los niveles de expresión en el gen de la helicasa Dbp5/Rat8 mostró una acumulación de mRNA poliadenilado en el núcleo, indicando de esta forma que esta proteína participa en la exportación [42,60]. Por otra parte, Schmitt y colaboradores en 1999 [43], realizaron una mutación dirigida a la proteína Nup159 del complejo del poro nuclear que resultó en la acumulación de la helicasa de Dbp5 en el citoplasma y no en la periferia nuclear. Lo cual sugiere que Dbp5 participa en el transporte, pero del lado citoplasmático. Para elucidar la participación de esta proteína en la exportación nuclear Estruch y Cole en 2006 [61] demostraron interacciones genéticas y físicas de Dbp5 de levadura con la maquinaria de transcripción. Otras proteínas que se ha visto que participan en la exportación nuclear son UAP56/Bat1 (en eucariotas) y su ortólogo Sub2 en levaduras. Esta función la llevan a cabo además de su ya mencionada función durante el *splicing* del pre-mRNA [62-65]. Es interesante que este factor de *splicing* también se requiere para la exportación del mRNA que no contienen intrones, argumentando en contra del escenario simple de que Sub2 permanece vinculado al mensaje después del *splicing*. Por lo tanto, las proteínas UAP56/Bat/Sub2 desempeñan dos funciones en la vida del mRNA [77].

Degradación del RNA

Varios estudios han demostrado el requisito de las helicasas DEXD/H en la degradación del RNA en *E.coli* [38,66,67]. En los eucariotas, la degradación del RNA se produce principalmente a través del exosomas, esto es asistido por las RNA helicasas de la familia Ski2 [68-71]. Sin embargo, ninguna proteína DEAD box parece ser requerida directamente para la progresión del exosoma. Por otra parte, se ha demostrado que la proteína Dhh1 desempeña una función esencial en la degradación del mRNA [72,73]. Curiosamente, las proteínas de la misma subfamilia desempeñan funciones importantes en el marcado del mRNA en eucariotas superiores [74,75].

Expresión de genes en organelos

Estudios realizados por Huang y colaboradores en 2005 [76] demostraron que en levadura dos proteínas DEAD box Mss1 16 y Mrh4 son requeridas para la expresión de genes en la mitocondria. Se observó que la proteína Mss1 16 está involucrada durante el *splicing* mitocondrial. Cabe resaltar que en humanos no existen homólogos de estas proteínas, pero la proteína DEAD box, Ddx28, está presente en mitocondrias [41], aunque no se sabe cuál es su función dentro de la misma.

En conjunto, la familia de proteínas DEAD box poseen una actividad de disociación no posesiva. Esta actividad se observa particularmente en muchos procesos metabólicos de RNA

en células eucariotas. Es probable que, en estos procesos, las proteínas DEAD box sean importantes marcadores de posición o proteínas de punto de control, permitiendo que los procesos se desarrollen de manera eficiente en una dirección y se conecten con los pasos anteriores o siguientes en la maquinaria del metabolismo del RNA [77].

Helicasas en *E. histolytica*.

Marchat y colaboradores en 2008 [91] realizaron estudios *in silico* y encontraron la presencia de 33 helicasas putativas de la familia DEAD y DExH box en *E. histolytica*. Por otra parte, Valdés y colaboradores en el 2014 encontraron en ribonucleopartículas del mensajero de *E. histolytica* la presencia de distintas snRNP y proteínas participantes en el *splicing*, destacando entre ellas la presencia de varias helicasas, así como 13 DExH/D helicasas que están en distintas etapas de la formación del spliceosoma para la maduración del pre-RNA (Tabla 1) [95].

Tabla 1. Comparación de factores de *splicing* en *E. histolytica* vs humanos y levaduras. Sobresalen en gris los componentes del complejo poscatalítico y el intrón-lariat del *splicing* (PILC por sus siglas en inglés) [95].

Particle/class	Splicing factor	Remodeling	<i>E. histolytica</i> protein	Locus ^a	UniProtKB
U2 snRNP U2-related U2 snRNA	U2A'		leucine rich repeat protein	EhI_167290	C4MAF8
	SF3a120		splicing factor	EhI_058680	C4LWT7
	SF3a60/Prp9 ^{PILC}		splicing factor 3A subunit 3	EhI_038600	C4LZP4
	SF3b1 ^{PILC}		splicing factor 3B subunit 1	EhI_049170	C4MAD8
	SF3b3 ^{PILC}		splicing factor 3b subunit 3	EhI_048160	C4MAA7
	U2AF65		U2 snRNP aux. fact. large subunit	EhI_098300	C4LXB3
	U2AF35		U2 snRNP auxiliary factor	EhI_192500	C4M1H0
	Prp43	ILS-disassembly	EhDEX49	EhI_184530	C4M6S9
	Prp43	ILS-disassembly	EhDEXH13	EhI_090040	C4MA27
	Prp43	ILS-disassembly	EhDEXH7	EhI_096230	C4LWD6
	Prp5	E-A (U2-3'ss)	EhDEAD3	EhI_013960	C4LXN8
U5 snRNP U5 snRNA	Snu114 ^{PILC}	B-B ^{act}	U5 snRNP subunit	EhI_021380	B1N373
	Brr2 ^{PILC}	B-B ^{act} ; C-Post splicing	EhDEXH10/U5 snRNP-specific 200kd	EhI_045170	C4LTD0
	Brr2 ^{PILC}	B-B ^{act} ; C-Post splicing	EhDEXH1	EhI_131080	C4LXH6
	220K/Prp8 ^{PILC}		splicing factor Prp8	EhI_060350	C4M6K0
	102K/Prp6		pre-mRNA splicing factor	EhI_093960	C4LY17
	Prp28	A-B	EhDEAD4	EhI_021440	C4M058
	U4/U6 snRNP	CPP6		peptidyl-prolyl cis-trans isomerase	EhI_020340
U4/U6 snRNA	CPP6		peptidyl-prolyl cis-trans isomerase	EhI_125840	O15729
U4/U6-U5 tri-snRNP	65K/SAD1		ubiquitin C-term hydrolase	EhI_152110	C4LSP9
	Prp38		PRP38 family protein	EhI_000490	C4LZA0
Prp19C/IBC	Prp19 ^{PILC}		WD domain containing protein	EhI_130870	C4LXF5
	CDc5 ^{PILC}		myb-like DNA-binding	EhI_000550	C4LZA6
	Aquarius		regulator of nonsense transcripts	EhI_193520	C4M4V4
	Syf1 ^{PILC}		Hypothetical protein	EhI_073300	C4LXJ5
	RBM22 ^{PILC}		pre-mRNA splicing factor cwc2	EhI_126150	C4LW00
EJC	CWC22 ^{#PILC}		cell cycle control protein	EhI_093720	C4LYG3
	Sub2p/UAP56	E-A (U2-3'ss)	EhDEAD18	EhI_151600	C4LSK1
RES complex	MGC13125 ^{PILC}		EF-hand calcium-binding	EhI_150550	C4M234
Complex B ^{act}	Prp2	B ^{act} -B'	EhDEXH4	EhI_033720	C4M435
Complex C	Abstrakt		EhDEAD1	EhI_175030	C4LZM8
Step 2 factors	Prp22 ^{PILC}	Post splicing-ILS	EhDEXH3	EhI_077640	C4M8N6
	Prp16	C-Post splicing	EhDEXH5	EhI_122790	C4M5M5

Comentado [DEM4]: Las cabezas de tabla tampoco van en itálicas. Corregir todas.

Participación de Sub2 y Prp5 durante el *splicing*

Como se describió en el capítulo anterior, Sub2 y Prp5 son helicasas de la familia DEAD box que están presentes en distintos procesos durante la vida del RNA. Ahora vamos a hablar sobre la importancia de estas proteínas durante el *splicing*, principalmente durante la transición del complejo temprano E al complejo pre-spliceosomal A de este proceso, que, como se puede observar en las figuras 2 y 6, es la etapa donde participan estas helicasas.

Participación de Prp5 en el *splicing* y la transición del complejo E-A

Esta proteína es una RNAasa ATP dependiente [37] y como ya es conocido que para que el snRNA de U2 pueda unirse al BP es necesaria energía, que es proporcionada por la hidrólisis de ATP.

En 1993 Ruby y colaboradores [96] encontraron que para que el snRNA de U2 pudiera entrar en el spliceosoma era necesario la presencia de la helicasa de Prp5. Pero fue hasta 1996 cuando O'Day y colaboradores [97] observaron que al estar ausente la proteína de Prp5 no se generaba *splicing*, mientras que al estar presente la helicasa era reconstituida, demostrando de esta forma que la presencia de Prp5 era esencial durante el *splicing* (Fig. 7).

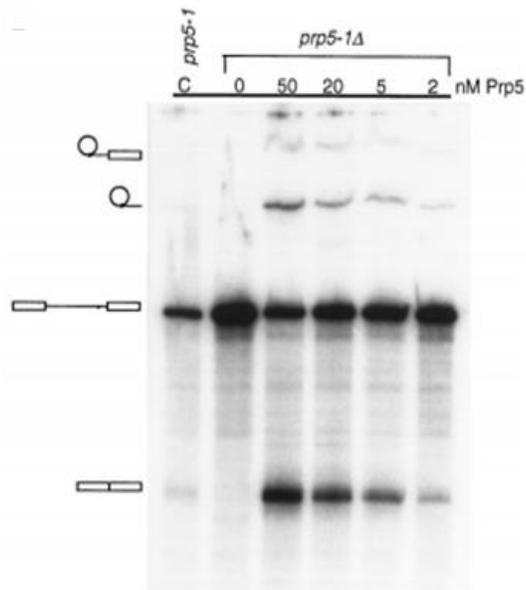


Figura 7. Demostración de la actividad de *splicing* al estar presente Prp5. Se observa que a concentraciones bajas (2nM) de Prp5 la actividad de *splicing* se ve reconstituida [97].

Por otra parte, fue hasta el 2004 cuando Xu y colaboradores [98] que se demostró que la presencia de Prp5 era esencial para que la unión de la snRNA de U2 con el RNA del intrón fuese estable (Fig. 8), es decir que esta helicasa es esencial para la formación del complejo A de *splicing*.

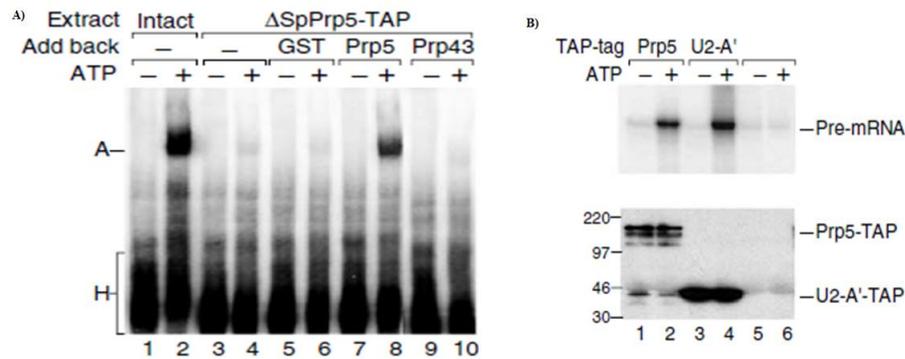


Figura 8. Participación de Prp5 en la formación del complejo A. a) GST-SpPrp5 reconstituye los extractos carentes de SpPrp5-TAP. Extractos intactos y carentes SpPrp5-TAP fueron incubados con pre-mRNA marcados con ^{32}P -/+ ATP a 30°C. GST, GST-SpPrp5 o Prp43p fueron adicionados a los extractos carentes. Las muestras se corrieron en un gel de poliacrilamida al 4% y visualizado por autoradiografía. b) SpPrp5-TAP está presente en complejo con el pre-mRNA. Extractos preparados de cepas conteniendo SpPrp5-TAP, U2-A'-TAP o carentes de proteína, fueron incubados con pre-mRNA marcado con ^{32}P -/+ ATP y los complejos fueron seleccionados por afinidad usando IgG-sepharosa para unir el TAP. Pre-ARNm copurificado (superior); Proteínas etiquetadas con TAP seleccionadas por IgG detectadas por análisis Western para la etiqueta TAP (inferior) [98].

Participación de Sub 2 en el *splicing* y la transición del complejo E-A

Sub2 es ortólogo en levadura de la proteína UAP56 de humanos. Ésta es como ya se mencionó anteriormente una RNAasa dependiente de ATP. Es por eso por lo que han encontrado que participa esta proteína en muchas funciones del RNA (ver funciones de las DEXD/H box).

El 1997 Fleckner y colaboradores [99], demostraron que la proteína UAP56 (Sub 2) es reclutada por U2AF65 para que el snRNA de U2 pueda interactuar con el BP. Demostrando primero que la presencia de Sub 2 es esencial para la reconstitución parcial del *splicing* (Fig. 9). Después observaron que efectivamente Sub 2 es crucial para que se pueda formar el complejo A (Fig. 10).

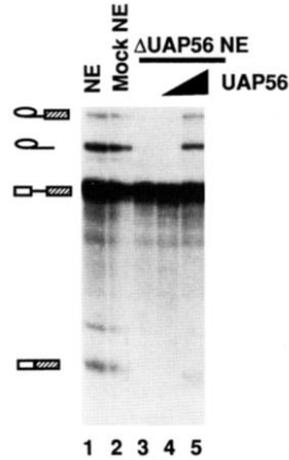


Figura 9 Importancia de Sub2 (UAP56) durante el splicing. Las reacciones de splicing se llevaron a cabo en presencia de extractos nucleares (carril 1), extractos nucleares carentes de antisuero preimmune (carril 2) o de extractos nucleares carentes de UAP56 (carril 3-5). UAP56 inmunopurificada fue adicionada a una concentración de 2 (carril 4) o 5 ng/μL (carril 5) [99].

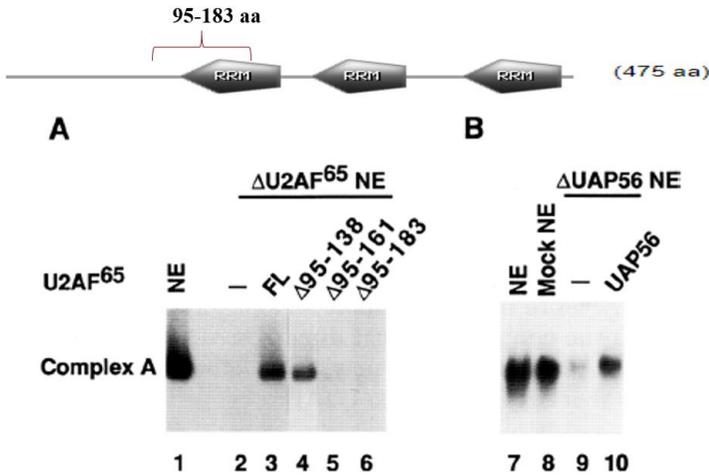


Figura 10. UAP56 es requerida para la interacción de U2 snRNA y el BP. A) análisis de mutantes deletadas en zonas de U2AF65. La formación del complejo A dentro los sustratos de $\Delta 5'$ AdMLP pre-mRNA, fue analizado por gel de electroforesis nativo, extractos nucleares (carril 1), extractos carentes de U2AF65 (carril 2) o extractos nucleares carentes de U2AF65, pero suplementados con las distintas U2AF65 depletadas a una concentración de 25 ng/μL (carril 3-6). (FL) longitud completa de U2AF65. B) Ensayo de complementación bioquímica. La formación del complejo A dentro los sustratos de $\Delta 5'$ AdMLP pre-mRNA, fue analizado por gel de electroforesis nativo, extractos nucleares (carril 7), extractos nucleares carentes de depleción (carril 8), extractos nucleares carentes de UAP56 (carril 9) o extractos nucleares carentes de UAP56 suplementados con UAP56 inmunopurificados a una concentración final de 10 ng/μL (carril 10) [99].

JUSTIFICACIÓN

Durante el *splicing*, diversas proteínas interaccionan para formar el spliceosoma, pero durante la etapa temprana de este, principalmente durante la transición del complejo E al complejo A, están presentes 4 proteínas: SF1 que interactúa con la secuencia del BP, U2AF84 que se une al tracto de pirimidinas, así como las helicasas de Prp5 y Sub 2 que, aunque esenciales para el *splicing* y particularmente en la transición del complejo E al A, aún se desconoce su función. Además, es primordial para dicha transición el snRNA U2.

Por otra parte, el dominio KH-QA2 de U2AF84 bloquea la transición del complejo E al A durante el *splicing*. Tal bloqueo se logra impidiendo la sustitución de SF1 por el U2 snRNA en el BP.

Tomando en cuenta que Prp5 y Sub2 están presentes durante esta misma etapa y que presentan actividad de helicasas, una de las dos podría desestabilizar la unión de SF1 con el BP y ayudar a formar el híbrido de snRNA U2 con el BP y la otra podría participar en la reacción de desestabilización del híbrido de RNA, posiblemente eliminando de esta forma la acción de bloque que presenta U2AF84 durante esta etapa del *splicing*, resultando en la transición del complejo E al A.

HIPÓTESIS

Prp5 y Sub2 tienen una acción de empalme o desempalme del BP y el snRNA U2 de *E. histolytica*.

OBJETIVOS

Objetivo General

Identificar la función empalme/desempalme de Prp5 y Sub2 durante la transición del complejo E al A en el *splicing* de *Entamoeba histolytica*.

Objetivos particulares

1. Obtener clonas recombinantes de Prp5 y Sub 2 (rEhPrp5 y rEhSub2).
2. Determinar la función de EhPrp5 y EhSub 2 en el reconocimiento de un BP amebiano
3. Realizar ensayos de empalme y desempalme de snRNA U2 y el BP amebiano por rEhPrp5 y rEhSub 2.
4. Determinar la función en la sustitución de SF1 del BP por el snRNA U2.

ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

Objetivo Especifico 1

Se amplificarán, clonarán y secuenciarán los gDNA/cDNA de Prp5 y Sub2 de *E. histolytica* en un plásmido que permita su expresión recombinante en *E. coli*. Una vez confirmado que las clonas poseen los genes de interés, se transformarán células de la cepa BL21 de *E. coli* que serán inducidas con IPTG para la expresión de las proteínas recombinantes de Prp5 y Sub2. Finalmente, se purificarán las proteínas recombinantes mediante columnas de níquel (Sub2, Prp5 y QA2-84) y glutatión sefarosa (GST-SF1).

Objetivo Especifico 2

Se realizarán el marcaje con ^{32}P en el Fosforo (P) Gamma (γ) del primer nucleótido del extremo 5' de secuencias del BP de levadura y de *E. histolytica*. Después se va a determinar la interacción de las proteínas EhPrp5 y EhSub 2 con el BP. Estos serán analizados mediante SDS-PAGE al 12% y serán visualizados por autoradiografía.

Objetivo Especifico 3

Posteriormente, se realizarán ensayos de hibridación y deshibridación de U2 y el BP, en presencia de EhPrp5, EhSub 2 y estando ambas presentes.

Objetivo Especifico 4

Una vez conocida la función de ambas helicasas, se realizarán ensayos con los BP marcados radiactivamente para determinar la participación de EhPrp5 y EhSub 2 en la sustitución de SF1 del BP.

MATERIALES Y MÉTODOS

Extracción de DNA genómico

La extracción se realizó por el método de CTAB, adicionando 250 μL de Buffer de lisis (0.25 % SDS en 0.1 M de EDTA pH 8.0) y 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de proteinasa K (3 μL de un stock 10 mg/mL con 100 U de RNase por mL) al pellet de amebas previamente centrifugadas a 7500 rpm durante 5 minutos y contadas por cámara de Neubauer. Esto se homogenizó por vortex e incubó a 55°C durante 20 minutos. Transcurrido el tiempo se adicionó 75 μL de NaCl 3.5 M y mezcló, posteriormente se añadieron 42 μL de 10 % CTAB/0.7 M NaCl, esto se mezcló e incubó a 65°C durante 10 minutos. La mezcla se deja atemperar y se adicionaron 400 μL de cloroformo y mezcló por inversión, después se centrifugó a 15000 rpm por 5 minutos. El sobrenadante se transfirió a un nuevo tubo y se le adicionaron 400 μL de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1), se mezcló por inversión y centrifugo a 15000 rpm por 5 minutos. El sobrenadante fue transferido a un nuevo tubo y se añadió 2 volúmenes de etanol absoluto, se incubó a temperatura ambiente por 5 minutos y centrifugó a 15000 rpm durante 10 minutos. Se descartó el sobrenadante y al pellet se adicionó 200 μL de etanol al 70 %, esto se centrifugó por 5 minutos a 15000 rpm y descartó el sobrenadante. Se dejó secando el tubo y resuspendió el pellet en 50 μL de H₂O mQ estéril. Se cargaron 2 μL en un gel de agarosa al 1 % para verificar la presencia del DNA y se cuantificó por espectrofotometría en el Thermo Scientific NanoDrop™, según las instrucciones del proveedor.

Amplificación y clonación de Sub2, Prp5 y GST-SF1

Para la amplificación del cDNA de Sub2 se realizó con las concentraciones descritas por el proveedor de DNA, 10x KAPA Taq Buffer, primers forward y reverse, 10 mM dNTPs y KAPA Taq DNA polimerasa y 2 mM de MgCl₂ y H₂O mQ a un volumen de 50 μL de reacción. La reacción se llevó a cabo en un termociclador marca “Eppendorf Mastercycler Personal” teniendo por condiciones de reacción 95 °C por 5 minutos / 95 °C por 30 segundos, 56 °C por 30 segundos, 72 °C por 1 minuto 50 segundos (estas 3 condiciones se repitieron 35 ciclos) / 72 °C por 7 minutos y 4 °C por tiempo indefinido. Una vez terminada la reacción, esta se verificó en un gel de agarosa al 1 %. Se cortó la banda de interés y se colocó en una columna de extracción, se incubó a -20 °C durante una hora y posteriormente se centrifugó a 15000 rpm por 1 minuto. El resto de la reacción de PCR se precipitó de la manera siguiente: se adicionó agua mQ a un volumen final de 100 μL , más $\frac{1}{10}$ v/v de Acetato de sodio 5 M, más 2.5 volúmenes de etanol absoluto y 10 μL de glicógeno (stock de 10 mg/ml), y el homogenando se incubó por 1 hora en hielo seco. Transcurrido el tiempo, se centrifugó 10 minutos a 15000 rpm, se descartó el sobrenadante y la pastilla se lavó con 1 mL de etanol al 75% y se centrifugó con las mismas condiciones anteriormente descritas. Se descartó el sobrenadante y la pastilla se resuspendió en 25 μL de H₂O mQ estéril. Después, se midió su concentración por NanoDrop.

Una vez conocida la concentración del cDNA, se procedió a cortarlo con enzimas de restricción (Not I y Xho I) al igual que el vector a utilizar (pET-28a), estos se dejaron incubar con Not I durante 16 horas y con Xho I por 3 horas, posteriormente las digestiones fueron verificadas en un gel de agarosa al 1 %. Una vez digeridos el vector y el inserto, estos fueron ligados utilizando T4 DNA ligasa #EL0011 Thermo Scientific, siguiendo las instrucciones del proveedor. La ligación se verificó mediante gel de agarosa al 1 %. Ya ligados, se procedió a transformar por choque térmico en *E. coli* cepa TOP10. Para ello, 10 μ L del producto ligado se añadieron a una alícuota de células competentes y se incubó en hielo por 20 minutos, posteriormente se incubó 45 segundos a 42°C y se transfirió al hielo inmediatamente, ahí se dejó incubando por 2 minutos. Después se adicionaron 800 μ L de medio SOB y dejó incubando por 90 minutos a 37°C, transcurrido el tiempo se tomó una alícuota que se inoculó por plaqueo en una caja Petri con medio LB suplementado con kanamicina, esta se dejó incubando toda la noche a 37°C. Se realizó una minipreparación de DNA a partir de las colonias candidatas utilizando QIAprep® Spin Miniprep Kit #27104, siguiendo las instrucciones del proveedor. Conociendo cuales colonias presentan el plásmido con el inserto, una de ellas se ocupó para transformar cepas de *E. coli*, BL21 por el método de choque térmico anteriormente descrito. De igual forma, se transformó esta cepa con las construcciones de QA2-84 y GST-SF1 con las que se contaban en laboratorio (GST-SF1 está dentro del vector pGEX y presenta resistencia a ampicilina, mientras que QA2-84 está dentro del vector pET28a anteriormente mencionado).

El gen sintético de Prp 5 (GeneScript), clonado en el vector de transición pUC57, fue digerido con enzimas de restricción Bam HI y Hind III y posteriormente ligados al vector pET28a como se describió anteriormente para Sub2. Con ello se transformaron células TOP10 y realizó una miniprep como se mencionó anteriormente, y se comprobó la presencia del fragmento utilizando las mismas enzimas de restricción. Posteriormente, se procedió a transformar cepas de *E. coli*. BL21 por choque térmico y plaqueo en medio LB adicionado con kanamicina.

Inducción y purificación de las proteínas recombinantes

Se picaron varias colonias de cada una de las cajas de las transformantes de BL21 con sus respectivas proteínas y se dejaron incubar toda la noche a 37°C. Transcurrido el tiempo, se tomó una alícuota de 50 μ L del precultivo y se adicionó a 2 mL de medio Terrific Broth con su antibiótico correspondiente (ampicilina para GST-SF1 y kanamicina para Sub2 y Prp5, además de sus respectivos controles, BL21, pET28a, pGEX), estos se incubaron a 37°C hasta alcanzar una O.D de 0.6 - 0.8. Luego se añadió IPTG a concentraciones de 0, 0.4 y 1 mM y se incubaron durante 4 y 24 horas. Una vez transcurrido el tiempo de incubación, se tomaron alícuotas de 100 μ L y las bacterias se centrifugaron a 15000 rpm por 5 minutos. El sobrenadante se retiró y la pastilla se resuspendió en 60 μ L de H₂O mQ más 20 μ L de buffer de carga 4X (50mM de Tris-HCl pH 6.8, 2 % SDS, 20 % Glicerol, 0.1 % azul bromofenol, 0.33 mL β -mercaptoetanol). Los extractos se calentaron a 100°C por 7 minutos, y posteriormente se realizó lisis mecánica con una jeringa para insulina. Se cargaron 20 μ L en un gel de poliacrilamida al 10% y corrió a 150 mV por 50 minutos. El gel se tiñó con solución

de Coomassie (0.2 % Azul R250, 50 % Metanol, 7 % ácido acético) por 20 minutos y se destiñó con solución de desteñido (30 % Metanol, 7 % ácido acético).

Comentado [DEMR5]: Revisa si es R o G.

Para la purificación de las proteínas recombinantes, se adicionaron 10 mL de precultivo a 500 mL de medio Terrific Broth con su respectivo antibiótico, este se incubó como se mencionó anteriormente hasta la O.D deseada. Posteriormente se adicionaron 500 mL más de medio con su antibiótico y una concentración de IPTG de 1mM, se incubó por 4 horas (para Prp5) y 24 horas (para Sub2 y GST-SF1). Las bacterias se centrifugaron a 8000 rpm por 40 minutos, se retiró el sobrenadante y se resuspendieron en 50 mL de buffer de lisis nativo (50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 10 mM imidazol, 10 mM PMSF, pH 8.0 utilizando NaOH). Posteriormente las células se lisaron por sonicación (2 minutos de pulsos con 5 s de sonicación por descansos de 1 min). El lisado fue centrifugado a 18000 rpm por 1 hora (se recomienda hacerlo a ultravelocidad), el sobrenadante se recolectó y se purificó por filtración en "Micropore" de 45 µm.

Purificación de la proteína recombinante GST-SF1

A una columna con perlas de Glutación Agarose (prod# 16100), se equilibró con 5 mL de buffer de lisis nativo, posteriormente, se añadió el sobrenadante y el filtrado fue recolectado en un tubo falcón, después se realizaron dos lavados con 2 mL de PBS 1X, posteriormente se adicionó 1 mL de buffer de elución (10 mM glutatión reducido en 50mM de Tris-HCl pH 8.0) en 3 ocasiones (los lavados y la elución se agilizaron mediante aplicación de , después vació por 5 segundos y recolecto el líquido en el mismo tubo recolector en turno). Cada una de las fracciones recolectadas (input, lavados y eluciones) se analizaron en un gel de poliacrilamida al 10% a 150 V por 45 minutos.

Purificación de las proteínas recombinantes His(6)-Sub2 y -Prp5

Por medio de columnas acondicionadas con Ni (Hi Trap GE 5 mL), se realizó un primer paso de purificación por afinidad de las banderas de His al Ni. Esto se llevó a cabo en un FPLC modelo AKTA de la marca GE en colaboración con el Maestro Dan Zavala del laboratorio del Dr. Morales, equilibrando la columna primero con buffer de lisis, posteriormente se inyectó la muestra al equipo para proceder a pasarla por la columna de Ni a un flujo de 3 mL por minuto, el líquido recuperado de la columna fue colectado en tubos, una vez que pasó toda la muestra, se procedió a realizar 5 lavados con buffer A (buffer de lisis 1X, 5 mM imidazol pH 7, 2 mM benzamidina, 0.2 mM PMSF y 0.001% β-mercaptoetanol) a un flujo de 1 mL/min y colectados de igual forma. Posteriormente, se realizó la elución a concentraciones crecientes de imidazol con una combinación de buffer A y buffer B (buffer de lisis 1X, 5mM imidazol pH 7, 500 mM benzamidina, 0.2 mM PMSF y 0.001% β-mercaptoetanol), de acuerdo con lo observado en el cromatograma de cada una de las proteínas purificadas, fueron tomadas las fracciones donde se observaron picos más altos. Estas junto con los lavados y lo no pegado a la columna fueron cargadas en un gel de poliacrilamida al 10% y corridas a 150 V por 45 minutos.

Debido a que las proteínas purificadas presentaban gran contaminación se realizó un siguiente paso de purificación, utilizando exclusión molecular para separar las proteínas por tamaños. Para ello se utilizó una columna de filtración molecular Superdex 200 10/300, para

poder analizar a la proteína, primero se concentraron por separado utilizando amicones (Amicon Ultra-15 100K, #UFC9110008) hasta tener un volumen final de 500 μ L, esta se colectó en un tubo Eppendorf y centrifugó a 10000 rpm por 1 minuto. El sobrenadante se cargó con una jeringa para insulina al FPLC y paso por la columna a un flujo de 0.1 mL/min. Ya que paso toda la muestra se procedió a realizar lavados con buffer TEV (50% glicerol, 750mM de KCl, 100mM de Tris pH7.5) hasta observar la salida de la proteína en el cromatograma, estas fracciones fueron corridas en un gel de poliacrilamida al 10% a 150 V por 45 minutos

Ensayos de Cambio de Movilidad Electroforética (EMSA)

Para marcar la sonda consenso del BP de *E. histolytica* (P+ AACUUUUUUUUU) y Levadura (C+ UAUACUAACAA) se utilizó P³² (Metrix, 150 mCi/mL) conforme a las indicaciones del fabricante de la Polinucleotido Kinase T4 (Thermo scientific, #EK0031). Una vez marcadas las sondas, se cuantificaron las cuentas para tener el rendimiento de lo marcado. Por otra parte, se realizó un ensayo de cuantificación para poder observar cuantas cuentas eran suficientes para observar bien la sonda en las placas, para ello se cargaron 2000, 5000, 10000 y 20000 cuentas por pozo en un gel de poliacrilamida al 6% que corrió a 90 V por 1 h, y se secó a 80°C por 30 minutos al vacío. El gel se expuso a placas fluorográficas para ser visualizadas al día siguiente en el STORM.

Para determinar la concentración a la cual se une la proteína QA2-SF1 a la sonda del BP, se adicionaron 4, 40 y 200 ng en presencia de buffer de retardo (BB 5x: 50mM Hepes-KOH pH 7.6, 40mM MgCl₂, 20mM espermidina, 0.1mM DTT, 0.5mM EDTA, 1.5mM ATP, 50% glicerol) en presencia de 10000 cuentas de la sondas, se corrió en un gel de poliacrilamida al 12% a 90V durante 2 horas. Posteriormente se secó a 80°C por 45 minutos y puesto en colocaron en unas placas fluorográficas para ser visualizadas al día siguiente en el STORM.

Los ensayos para determinar la actividad de las helicasas se realizaron adicionando BB 5x, 1000 cuentas de la sonda de *E. histolytica* y concentraciones de 50, 150, 300 y 500 ng de EhPrp5, los mismo para el caso de EhSub 2 por separado y estando presentes ambas proteínas, en presencia y ausencia de 50 ng de la sonda de la región consenso de reconocimiento de U2 snRNA al BP (CAAGUGUAGUA). Esto se corrió en un gel de poliacrilamida al 17% a 90V por 2 horas, posteriormente se procedió a secarlo a 80°C por 45 minutos y puesto después en una placa fluorográfica para ser visualizadas al día siguiente en el STORM. El ensayo anterior también se realizó adicionando 1mM de tRNA para quitar uniones inespecíficas y en presencia y ausencia de 20 mM de KCl con la finalidad de eliminar uniones inespecíficas por carga.

Para determinar si las proteínas podrían ayudar a sustituir al QA2-SF1 del BP, se adicionó 40 ng de esta proteína, además de 150 ng de las proteínas EhPrp5, EhSub 2 por separado y estando presente ambas, en presencia o ausencia de 50 ng de la sonda de U2 snRNA. Esto se corrió en un gel de poliacrilamida al 17% a 90V por 2 horas y media, posteriormente se secó y guardo como se describió en el párrafo anterior.

Análisis estadístico de las señales de retardo.

El análisis estadístico se llevó a cabo con el programa ImageJ 1.50i, tomando en cuenta las señales de interés, posteriormente se procedió a eliminar el fondo del gráfico obtenido para quedarnos solo con los valores absolutos de las señales. Posteriormente se realizó una estadística de los datos obtenidos de las réplicas de los geles. Con estos valores se procedió a realizar los gráficos en el programa Prism 8 de GraphPad.

RESULTADOS

Amplificación y Clonación de EhSub 2 y EhPrp5

Se clonó el gen de EhSub 2, con un tamaño aparente de 1.2 kb, que corresponde al tamaño reportado en el locus EHI_151600 encontrado en la base de datos de “amoebadb.org”. Como se puede observar en la figura 11, la inserción del cDNA en el vector pET-28a fue satisfactoria.

Por otra parte, la extracción del gen sintético de EhPrp5, a partir del vector de transición pUC57 (Fig. 12a), se obtuvo con el peso esperado de 2.1 kpb correspondiente al locus EHI_013960 en la base de datos “amoebadb.org”. Además, su clonación en el vector pET-28a fue exitosa, como se observa en la figura 12b.

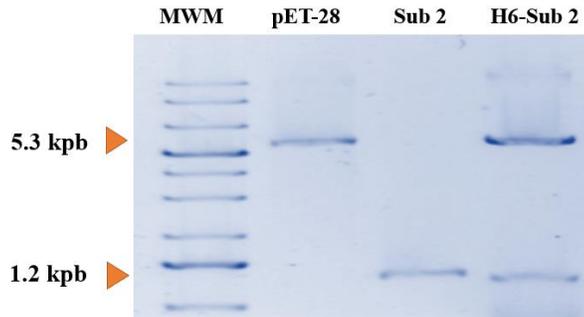


Figura 11. Clonación del Sub2. Se observa en el cuarto carril (His(6)-Sub2) la presencia del gen de EhSub 2 y el vector pET28a después de una doble digestión con las enzimas de restricción NotI y XhoI.

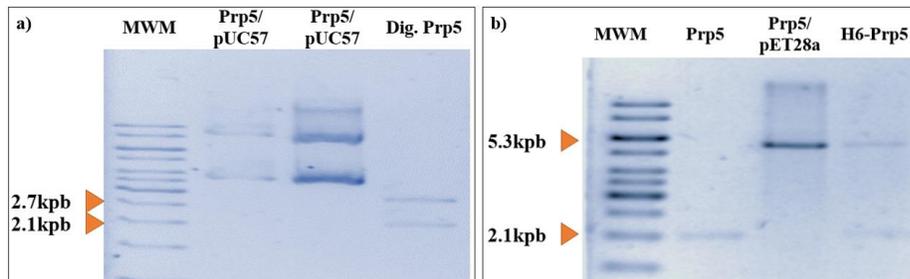


Figura 12. Extracción y clonación de EhPrp5 del gen sintético de pUC57. A) El gen fue extraído del vector de transición pUC57 con las enzimas de restricción Bam HI y HindIII (Dig. Prp5); b) Clonación del gen Prp5 dentro del vector pET28a. El inserto de EhPrp5 fue liberado con las enzimas de digestión Bam HI y HindIII (carril 1) y ligado al vector pET28a (carril 2). La clona His (6)-Prp5 se digirió con las enzimas Bam HI y HindIII (carril 3)

Inducción y purificación de las proteínas recombinantes EhSub 2, EhPrp5 y QA2-SF1.

Inducción y purificación de EhSub 2

La concentración de IPTG a la cual se encontró mejor resultado para inducir la proteína recombinante EhSub 2 fue 1mM incubada durante 24 h a 37°C (Fig13a). La proteína aislada tiene un peso molecular de 52.45 kDa. Durante la purificación por afinidad, se observó que a una concentración de 50 mM de imidazol se desprendió de las columnas de Ni (Fig 13b). Además, se observó contaminación por otras proteínas después de esta purificación (Fig. 13c), por ello se realizó una purificación por exclusión molecular, observando la elución de la proteína a partir de la fracción B6 a la C1, correspondiente a un volumen de 14-16 mL de TEV (Fig. 13d), con esto se logró obtener a la proteína totalmente pura (Fig. 13e).

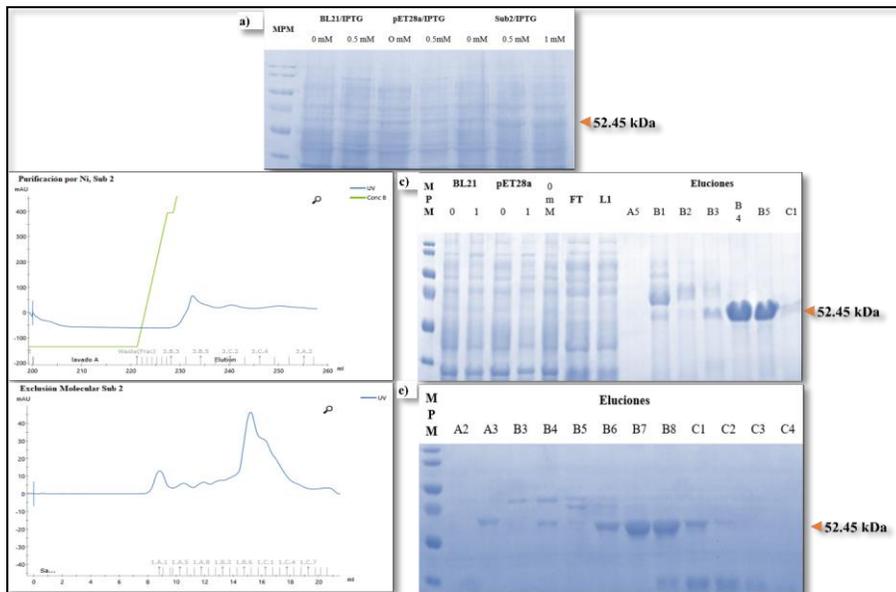


Figura 13. Inducción y purificación de la proteína recombinante de EhSub 2. a) condiciones de inducción a distintas concentraciones de IPTG, observándose inducción a partir de 0.5 mM de IPTG (carril 7 y 8) b) cromatograma de la purificación de la proteína de EhSub 2 por columnas de Ni observándose la elución de la proteína a partir de la fracción B3 y culminando está en la fracción C1, c) gel de electroforesis de las fracciones colectadas, se observa la presencia de la proteína en las fracciones B4 y B5 (Carril13 y 14). d) Cromatograma de la exclusión molecular, las fracciones con presencia de la proteína fueron B6-C1 (inicio del pico más grande). e) Gel de electroforesis de las fracciones colectadas de la exclusión molecular, observando la presencia de la proteína en las fracciones B6-B8 (Carril 6-8).

Inducción y purificación de Prp5

La concentración idónea de IPTG para la inducción de la proteína fue del rango de 0.8-1 mM, incubada a 37 °C durante 4 hrs (Fig. 14a), presentando su peso molecular de 97.4 kDa. La purificación se llevó a cabo como se describe en materiales y métodos, observando el desprendimiento de la proteína de las columnas de Ni a una concentración de 25mM de imidazol (Fig. 14b), las fracciones colectadas presentaban contaminación con otras proteínas (Fig. 14c) por lo cual se realizó un paso más de purificación por exclusión molecular, observando la elución de la proteína a partir de la fracción C1 hasta la C5, correspondiendo esto a un volumen de 12 mL de buffer TEV (Fig. 14d), con esto se logró observar una clara eliminación de las proteínas contaminantes y obteniendo la proteína pura (Fig. 14e).

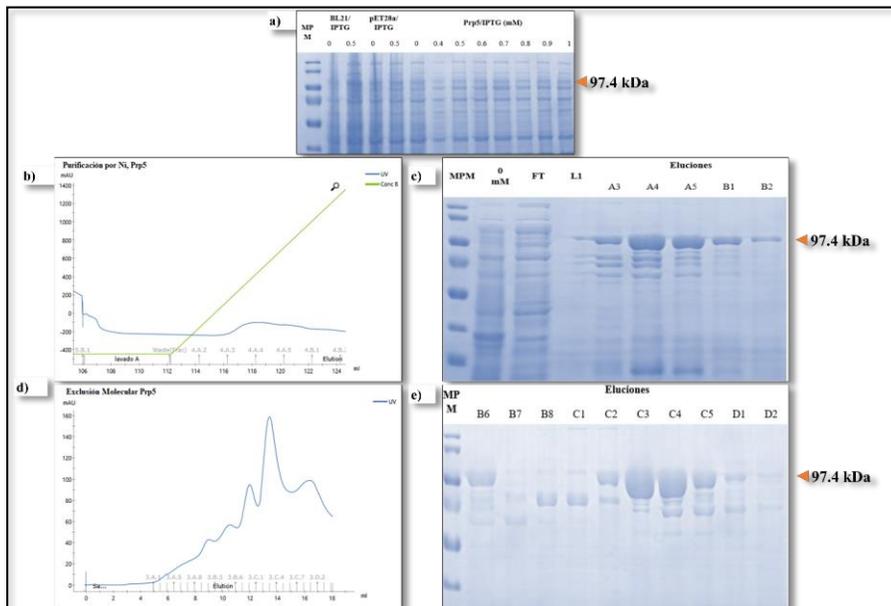


Figura 14. Inducción y purificación de la proteína recombinante de EhPrp5. a) condiciones de inducción a distintas concentraciones de IPTG, observándose inducción a partir de 0.5 mM de IPTG (carril 8-13), b) cromatograma de la purificación de la proteína de EhPrp5 por columnas de Ni observándose la elución de la proteína a partir de la fracción A3 y culminando está en la fracción B2, c) gel de electroforesis de las fracciones colectadas, se observa la presencia de la proteína en las fracciones A3-B2 (Carril 5-9). d) Cromatograma de la exclusión molecular, las fracciones con presencia de la proteína fueron C2-C5 (inicio del pico más grande). e) Gel de electroforesis de las fracciones colectadas de la exclusión molecular, observando la presencia de la proteína en las fracciones C2 a C5 (Carril 6-9).

Inducción y purificación de QA2-SF1

La condición de inducción adecuada se dio a una concentración de 1mM de IPTG, incubado a 37 °C durante 24 hrs (Fig.16a), esta se vio con un peso molecular de 45.2 kDa, pero presentó una migración anómala debido a su punto isoeléctrico ácido (5.4). La purificación de la proteína se dio como se menciona en materiales y métodos, observando la proteína totalmente pura con las mismas condiciones anteriormente mencionadas (Fig. 16b).

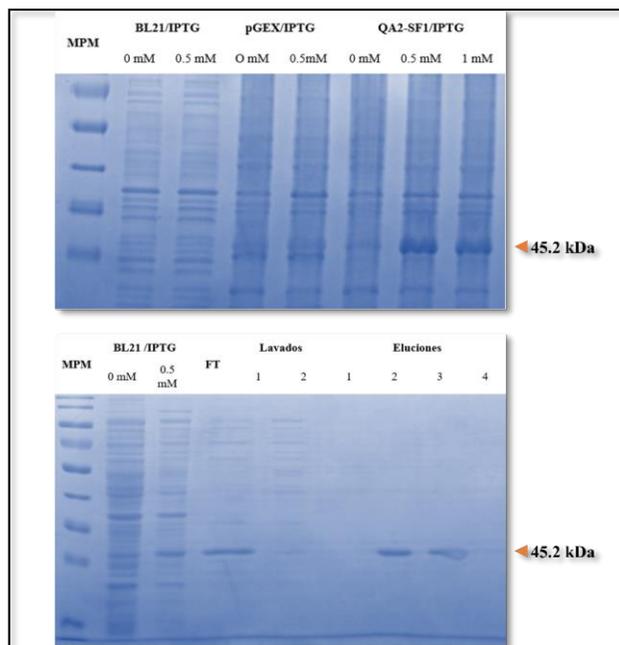


Figura 15. Inducción y purificación de la proteína recombinante de EhQA2-SF1. a) condiciones de inducción a distintas concentraciones de IPTG, observándose la inducción a partir de una concentración de 0.5 mM de IPTG (Carril 7 y 8), b) Purificación de la proteína de QA2-SF1 por columnas de GST, observando la presencia de ella en el segundo y tercer lavado (Carril 8 y 9).

Caracterización parcial de la función de las proteínas EhPrp5 y EhSub 2.

Interacción de QA2-SF1 con la sonda marcada.

La interacción del QA2-SF1 con la sonda del BP de *E. histolytica* se observó a partir de una concentración de 4 ng incrementando esta conforme va aumentando la concentración de proteína, por otra parte, para la sonda de levadura fue necesario 5 ng de la proteína, pero fue aumentado conforme la concentración de la proteína iba creciendo (Fig 16).

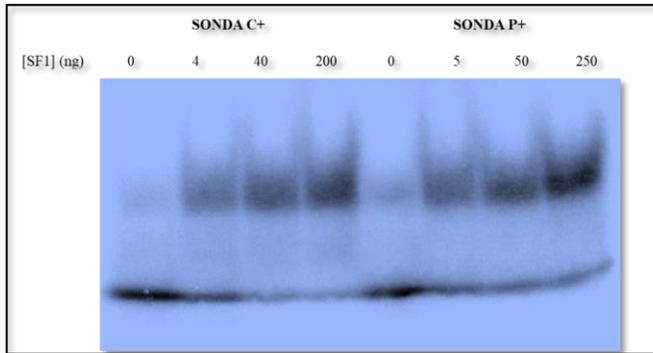
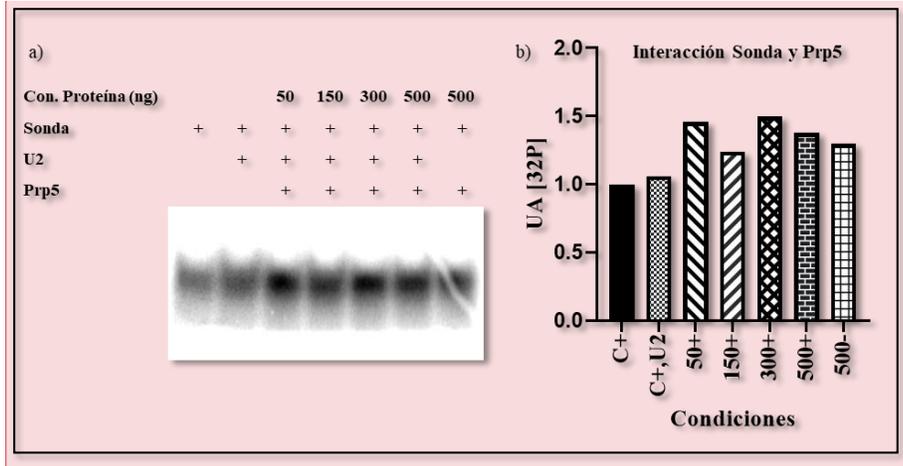


Figura 16. Interacción del QA2-SF1 con la sonda de Levadura (C+) y *E. histolytica* (P+). En presencia de concentraciones pequeñas de la proteína se observa un retardo en comparación con la sonda sola (Carril 2, 1 y 5,6 respectivamente), pero esta interacción aumenta mientras más concentración de proteína sea adicionada (carril 3,4 y 7,8).

Interacción de EhSub 2 y EhPrp5 con la sonda del BP de levadura.

La interacción de ambas proteínas es evidente en presencia de la sonda de U2 snRNA pero curiosamente EhSub 2 presenta mejor afinidad con la sonda y U2 snRNA a concentraciones elevadas de la proteína (50, 150, 300, 500 ng) (Fig. 18a y 18b), caso contrario con EhPrp5 que a bajas concentraciones de proteína (50, 150 y 300 ng) la interacción es estable pero al aumentar esta concentración a 500 ng, la interacción se ve disminuida. (Fig. 17a y 18b). Para descartar que estas interacciones no fueran realizadas por uniones inespecíficas debido a cargas, se realizó un ensayo en presencia de KCl, además de un ensayo donde se observara la interacción de ambas proteínas juntas con la sonda. En este ensayo ambas proteínas en presencia de la sonda y U2 snRNA presentan mejor afinidad que estando las proteínas por separado. Esto concuerda parcialmente con lo descrito por Willhoeft y cols. (1999), y por Schmid y Linder (1992), quienes observaron que las helicasas pueden interactuar como monómeros u homodímeros. Además, se evidenció que la interacción de las proteínas con la sonda y U2 snRNA es específica ya que se observó que se mantiene aún en presencia de KCl. Estos resultados se observan claramente en el gráfico de la figura 19b, donde el valor de las interacciones de las proteínas, el U2 snRNA y la sonda (carril K,50-K,300+) son mayores comparado con los observados estando la sonda sola (carril K,C+).



Comentado [DEMR6]: Faltan las n y la desv. Estándar.

Figura 17. Interacción de EhPrp5 con la sonda del BP de Levadura. a) Se observa que al adicionar 50 ng de proteína esta es capaz de interactuar con la sonda, migrando la señal del fondo a la parte superior, esto solo sucede en presencia de U2 snRNA (Carril 3-6) y en ausencia de esta es ausente la interacción (carril 7). b) Representación estadística de la interacción mostrada en el gel, se observa que la mayor interacción de la proteína se da a 50 y 300 ng de proteína estando presente el U2 snRNA. $n=3$, $SD= 0.21$

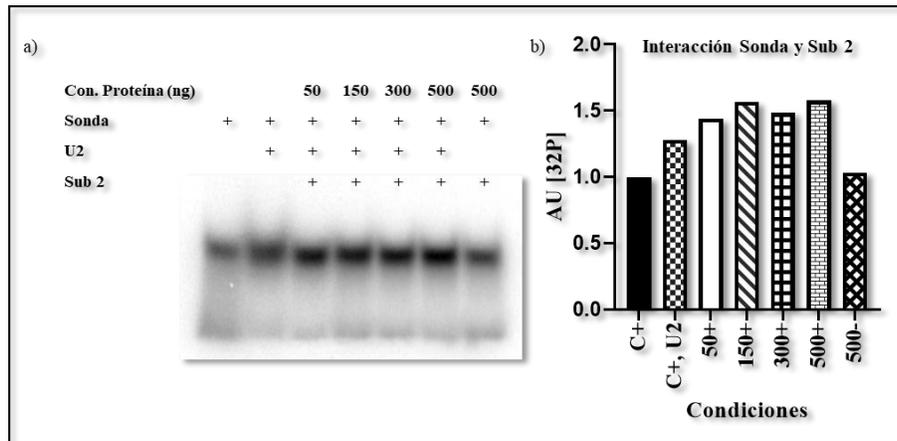
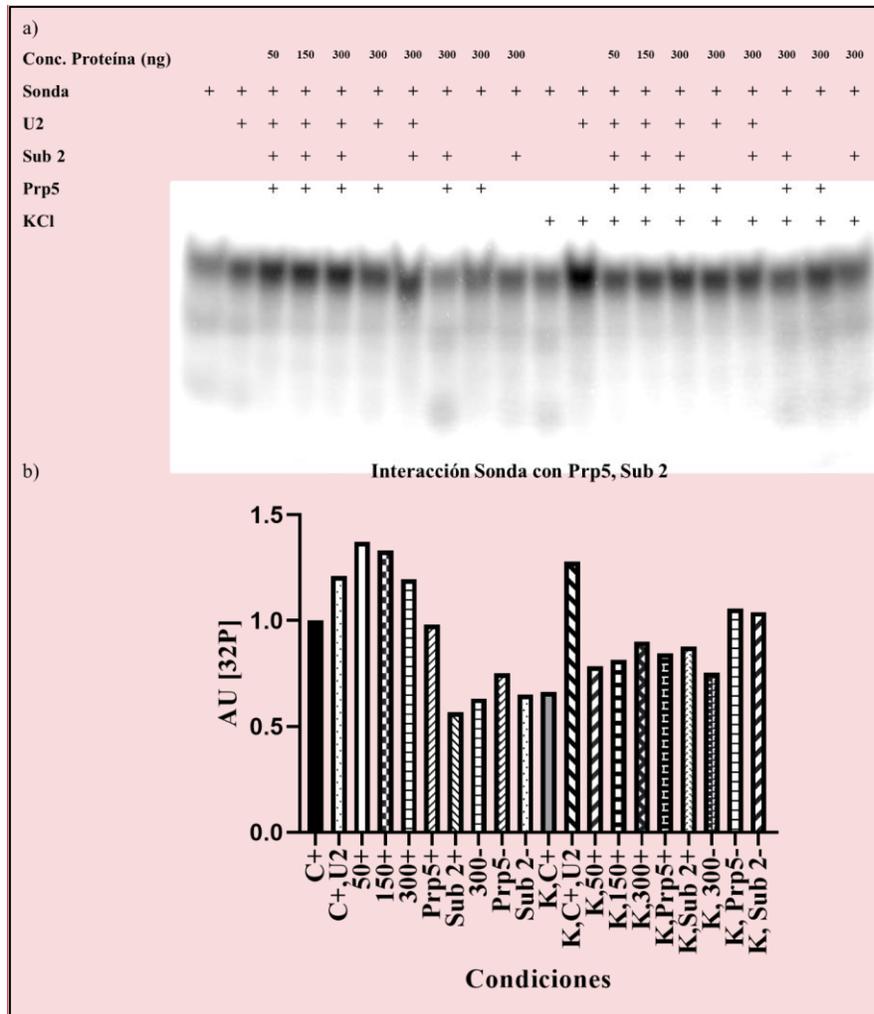


Figura 18. Interacción de EhSub 2 con la sonda del BP de Levadura. a) Se observa que al adicionar 50 ng de proteína esta es capaz de interactuar con la sonda, migrando la señal del fondo a la parte superior, esto solo sucede en presencia de U2 snRNA (Carril 3-6) y en ausencia de esta es ausente la interacción (carril 7). b) Representación estadística de la interacción mostrada en el gel, se observa que la mayor interacción de la proteína se da a 150 y 500 ng de proteína estando presente el U2 snRNA. $n=3$, $SD= 0.35$



Comentado [DEM7]: desviaciones

Figura 19. Interacción de EhSub 2 y EhPrp5 con la sonda del BP de Levadura sin y con KCl (carril 1-10 y 11-20 respectivamente). a) Se observa que al estar presentes ambas proteínas la interacción con el BP es más fuerte (carril 3-5 y 13-15) que estando por separado (6-7 y 16-17), pero esta interacción es casi nula sin la presencia del U2 snRNA (8-10 y 18-20). Cabe resaltar que la presencia del KCl muestra una diferencia de interacciones inespecíficas por carga (carril 11-20) pero sorprendentemente se observa un aumento de la interacción de la sonda con el U2 snRNA (carril 12). b) Representación estadística de la interacción mostrada en el gel, se observa mayor interacción estando ambas proteínas presentes (50+, 150+, 300+) en comparación con las proteínas solas (Prp5+, Sub 2+), pero al estar presente el KCl se observa que la interacción de la sonda con el U2 snRNA aumenta, mientras que al estar presentes ambas proteínas o solas, la interacción es muy parecida (carril K,50+ a K,Sub2-). n=3, SD= 0.96.

Por otra parte, para identificar la participación de EhPrp5 y de EhSub 2 en la transición del complejo E al complejo A, se realizó un ensayo donde estuviera presente SF1, así sabríamos

si estas proteínas pueden ayudar a sustituir a SF1 del BP e hibridar el snRNA U2 en esta zona. Sorprendentemente la presencia de U2 snRNA es necesaria para que el QA2-SF1 pueda interaccionar con la sonda, pero al estar presentes tanto EhPrp5 como EhSub 2 se genera un segundo complejo por debajo del ya generado por el QA2-SF1, disminuyendo este complejo al estar presente cada una de las proteínas por separado (Fig. 20). Notablemente, no se genera un único complejo, pero este segundo complejo tiene una formación parcial, dando a entender que hace falta algún otro factor para que sea completa esta formación del complejo.

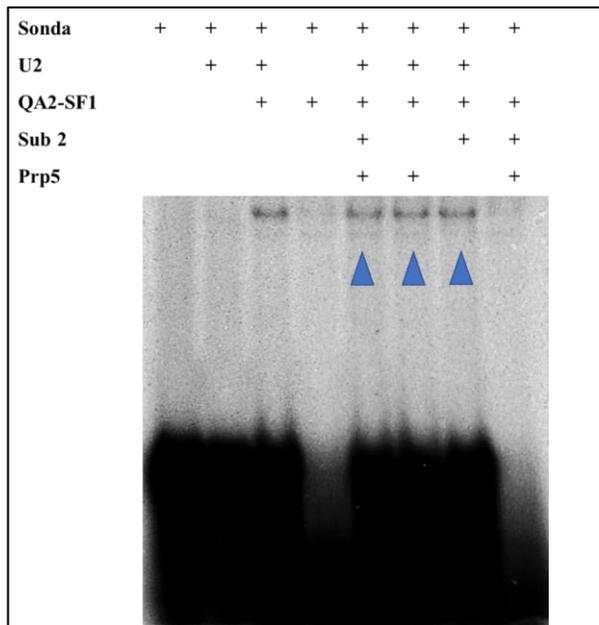


Figure 20. Interacción de EhSub 2 y EhPrp5 con la sonda del BP de Levadura en presencia de QA2-SF1. Se observa que al estar presentes las proteínas se genera un segundo complejo (carril 5-7) que no está presente en la generada solo por QA2-SF1 (carril 3), pero al estar presentes ambas proteínas el segundo complejo se genera con menos intensidad (carril 7).

DISCUSIÓN

Inicialmente aislamos las proteínas recombinantes necesarias para nuestro trabajo. Aparte de las helicasas EhSub 2 y EhPrp5, purificamos el dominio KH-QUA2 del factor amebiano SF1 (aquí denominado QA2-SF1).

De acuerdo con lo reportado en el laboratorio por Ricardo Martínez, el dominio QA2-SF1 mostró una migración anómala debido a su punto isoelectrico ácido (5.07). Esto tuvo concordancia con esos datos, nosotros, al inducir y purificar dicha proteína observamos la misma migración anómala.

Por otra parte, la inducción de la proteína EhPrp5 solo se presentó a las 4 horas, pero al aumentar el tiempo de inducción esta era nula. Esto nos indicó que esta proteína puede tener un efecto citotóxico para la cepa de *E. coli* BL21.

Posteriormente usamos las proteínas recombinantes en experimentos de retardo en movilidad electroforética. En dichos ensayos la interacción cualquiera de las proteínas EhPrp5 o EhSub 2 con la sonda del BP de *E. histolytica* generó bandas pocas definidas dificultando la interpretación de dichos experimentos. Esto pudo ser debido a alguna estructura secundaria de la molécula del BP que se genere espontáneamente (nótense las tres bandas de las sondas en los Anexos). Interesantemente algunas de las bandas que nosotros atribuimos a formas de estructura secundarias fueron efectivamente movilizadas durante los ensayos de EMSA, aunque no generaron un retardo típico. Estos resultados evidencian que las proteínas pueden interactuar con la sonda, pero con distinta afinidad.

Liang y Cheng (2015) demostraron que la helicasa Prp5 puede interaccionar con el U2 snRNA al mismo tiempo que puede reconocer el *branchpoint-interacting stem-loop*. Nuestros hallazgos aparentemente contradicen lo demostrado previamente dado que la presencia de U2 snRNA disminuyó la interacción de EhPrp5 con el BP. Se requieren experimentos adicionales (cinéticas, por ejemplo) para dilucidar si esa disminución en realidad refleja que EhPrp5 está interactuando simultáneamente con el BP y el U2 snRNA.

De igual forma, EhSub 2 puede interaccionar mejor con el BP en ausencia de U2 snRNA. Se sabe que Sub 2 tiene afinidad por U2AF84 al mismo tiempo que el U2 snRNA se incorpora al spliceosoma (Fleckner y cols, 1997). Nuestros datos mostraron que EhSub2 junto con EhPrp5 tuvieron más afinidad con el BP en presencia del U2 snRNA. Podemos especular que ocurrió un cambio conformacional en la estructura de U2AF84 colocando cerca a ambas proteínas EhPrp5 y EhSub 2 dentro del *branchpoint-interacting stem-loop* para una posible interacción entre estas y poder remplazar a SF1 del BP y finalmente unir a U2 snRNA. También cabe la posibilidad de que ambas helicasas están interactuando entre ellas dado que Gorbalenya y cols. (1989) observaron que proteínas de la familia DEAD box pueden reconocer a otras helicasas que están interactuando con una secuencia de RNA.

Comentado [DEMR8]: Parece como si la discusión la escribió alguien diferente a quien escribió las demás partes de la tesis.

Comentado [DEMR9]: Mejorar redacción.

Se reprodujo la interacción del QA2-SF1 con la secuencia del BP, previamente demostrada por Ricardo Martínez en su trabajo de maestría. Observamos además que la presencia de ambas helicasas EhPrp5 y EhSub 2 junto con el U2 snRNA de *E. histolytica*, resultaron en la generación parcial de un segundo complejo por debajo del complejo QA2-SF1/BP. Curiosamente la presencia independiente de EhPrp5 o EhSub 2 con la sonda de BP y de U2 snRNA el segundo complejo disminuyó de intensidad. Esto puede evidenciar la necesidad de proteínas o cofactores adicionales para que la sustitución de SF1 por el snRNA U2 en el BP sea total y no parcial. Nosotros creemos que la pieza faltante para la sustitución de SF1 pudiera ser U2AF84 (y no sólo el dominio KH-QUA2 de la misma). Esto sobre la base de los estudios realizados por Fleckner y col. (1997) quienes mostraron que Sub 2 interactúa con U2AF65 y esto permite la unión del BP con el U2 snRNA.

Comentado [DEMR10]: Mejorar redacción.

Por lo mencionado anteriormente, se sugiere que para llevarse a cabo la transición del complejo E al complejo A de *splicing* es necesario que después de la unión de SF1 a la secuencia del BP y de U2AF84 al tractor de pirimidinas, Sub 2 reconozca el RRM1 de U2AF84 generando un cambio conformacional en la proteína cuyo dominio KH-QA2 deja de interactuar con SF1. Posteriormente, Prp5 reconoce la secuencia del BP para unirse a ella y a su vez interactuar con el U2 snRNA. Ya realizadas estas interacciones, se sugiere que EhPrp5 y EhSub 2 pueden interactuar entre ellas y con su actividad de helicasas poder sustituir a EhSF1 del BP y generar el doble híbrido RNA-RNA entre la secuencia del BP y el U2 snRNA (Fig. 21).

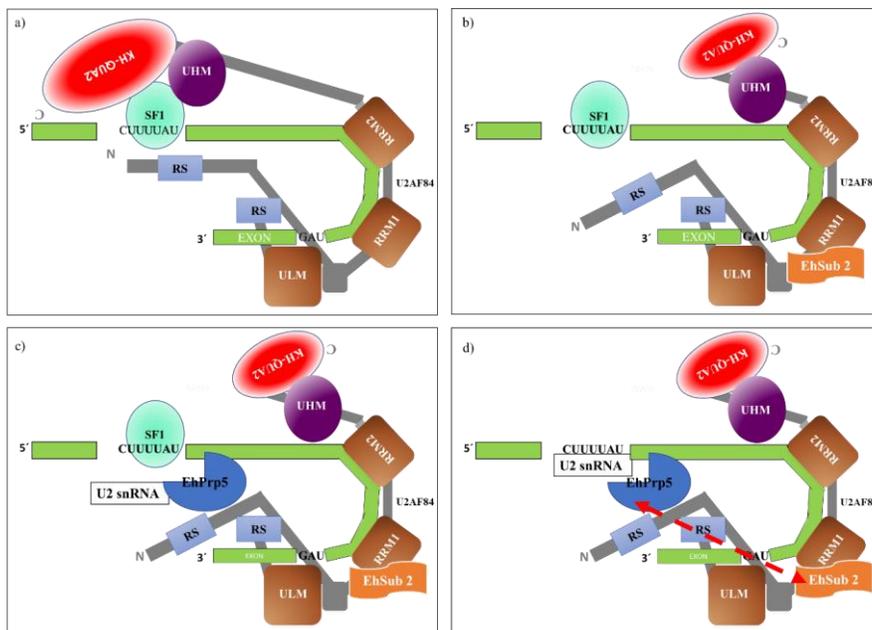


Figura 21. Modelo hipotético propuesto de la interacción de las proteínas participantes (Sf1, U2AF84, EhPrp5, EhSub 2) en la transición del complejo E al A de *splicing*. a) SF1 interactúa con la secuencia del BP y U2AF84 con el tractor de

pirimidinas, sobresaliendo que el dominio KH-QA2 interactúa con SF1 [4]. b) Sub 2 interactúa con el RRM1 de U2AF84 generando un cambio conformacional en el cual el dominio KH-QA2 de U2AF84 deja de interactuar con SF1[99]. c) Prp5 interactúa en el branchpoint-interacting stem-loop y a su vez con el U2 snRNA [107]. d) El cambio conformacional que se da en el presplicing permitiría una posible interacción de Prp5 y Sub 2 la cual generaría la eliminación de SF1 del BP y una posterior unión del U2 snRNA con el BP, permitiendo de esta forma la transición del complejo E al A de splicing.

CONCLUSIÓN

Se purificó las proteínas recombinantes EhPrp5, EhSub 2 y QA2-SF1 cuyo peso molecular en el gel coincide con los propuestos y la cantidad de proteína purificada, fue suficiente para poder realizar los ensayos propuestos.

Además, mostramos la función parcial de las helicasas EhPrp5 y EhSub 2 recombinantes para reconocer al BP, y se puso de manifiesto que entre ellas podrían reconocerse para interactuar mejor con el BP y el U2 snRNA.

La formación de un segundo complejo al estar presentes QA2-SF1 con el BP, además de EhPrp5 y EhSub 2 junto con U2 snRNA, nos indicó que la función de estas proteínas podría estar en el apoyo de sustituir al QA2-SF1 del BP para formar el híbrido entre el BP y U2 snRNA. Sin embargo, creemos que es necesaria otra pieza (proteína o cofactor) para que, con la ayuda de las helicasas EhPrp5 y EhSub 2, se pueda realizar la sustitución total del dominio KH-QUA2 de SF1 del BP y pueda unirse el U2 snRNA en esta zona.

Comentado [DEMR11]: Yo la cambiaría a: Se purificó a las proteínas recombinantes ... cuyo peso molecular en el gel coincide con los propuestos.

PERSPECTIVAS

- 1- Realizar ensayos de competencia estando presente las helicasas juntas o por separado, QA2- SF1, la sonda del BP, la secuencia consenso de U2 snRNA, pero teniendo presente a U2AF84 de longitud completa. Esto con la finalidad de observar la posible sustitución completa de QA2-SF1 del BP y la unión del U2 snRNA en esta zona, pero con apoyo de las helicasas.
- 2- Demostrar la interacción de EhSub 2 con U2AF84, como se observó en los estudios de Fleckner y col. en 1997.
- 3- Identificar la posible interacción entre las helicasas EhPrp5 y EhSub 2.
- 4- Demostrar cuál de las helicasas realiza la hibridación del BP con el U2 snRNA, esto a pesar de que Prp5 interacciona con el U2 snRNA.

Anexos

Secuencias de oligos utilizados

Nombre	Secuencia	Condiciones	Amplicon	Anotaciones	Vector
BP_Ss_C+	UAUAUUAACAA	N/A	N/A	N/A	N/A
BP_Ss_C-	UAUACCAACAA	N/A	N/A	N/A	N/A
BP_RXI_P+	AACUUUUUUU	N/A	N/A	N/A	N/A
BP_RXI_P-	AAUUUUUUU	N/A	N/A	N/A	N/A
U2_sirNA_HMM	CAAGUUGUA	N/A	N/A	N/A	N/A
U2_sirNA_Con	CAAGUUGUA	N/A	N/A	N/A	N/A
Ppfs F_Xho I	TCGAGTCTCGAGTTAAAGAAAGTTAGATATAACTTTTTCATGAAAGTACTTATC	Tm=56 °C; iem. Amp. 2.50', MgCl ₂ =2.5 mM	2164/2343	El gen tiene intrones	pET28a
UAP56 F_EcoRI	CGGAATTCATGACTGATCCAACTAACCAAAATCCAGAC	Tm=56 °C; iem. Amp. 1.50', MgCl ₂ =2.5 mM	1260 pb	N/A	pET28a
UAP56 R_Xho I	TCGAGTCTCGAGTTAATTTGTAGTAACTTGTGGAAATATCTTCAATGAGC	N/A		N/A	N/A
Br2p F_EcoRI	CGGAATTCATCCCAAGACAACCGAAAAGAC	N/A		N/A	N/A
Br2p R_Xho I	TCCAGTCTCGAGTTAGCAAAATGTAAATTCGAAAGATCATATTTGTGATC	N/A		N/A	N/A
p68 F_EcoRI	CGGAATTCATGAGTGGAGAGAGTACAAATTCACATAG	N/A		N/A	N/A
p68 R_Xho I	TCCAGTCTCGAGTTAATACCTCAATATGGAAAGTTCAGACGG	N/A		N/A	N/A

Ensayos realizados con la sonda del BP de *E. histolytica*.

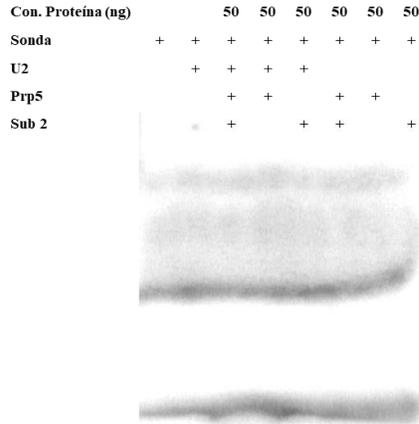


Figura 22. Interacción de las proteínas recombinantes EhPrp5 y EhSub 2 con la sonda de *E. histolytica*.

Conc. Proteína (ng)	50	150	300	300	300	300	300	300	300	50	150	300	300	300	300	300
Sonda	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
U2	+	+	+	+	+					+	+	+	+	+		
Sub 2		+	+		+	+		+		+	+			+	+	+
Prp5	+	+	+	+		+	+			+	+	+	+		+	+
KCl										+	+	+	+	+	+	+

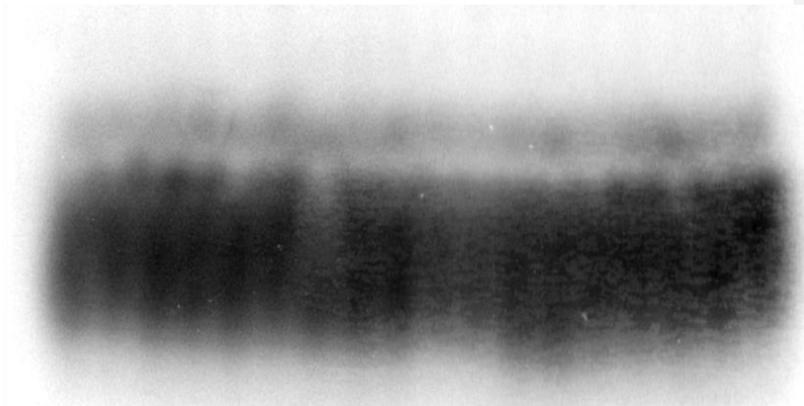


Figura 23. Interacción de EhSub 2 y EhPrp5 con la sonda del BP de *E. histolytica* sin y con KCl (carril 1-10 y 11-20 respectivamente).

Bibliografía

- 1- World Health Organization. Amoebiasis. Weekly Epidemiologic Record. 1997;72:97-100
- 2- Martínez-Palomo A. Amibiasis. México: Editorial Médica Panamericana; 1989. 204 pp.
- 3- Brandt H, Pérez-Tamayo R. Pathology of human amebiasis. HumPathol. 1970;1:351-85.
- 4- Wahl, M. C., Will, C. L., and Lührmann, R. (2009). The spliceosome: design principles of a dynamic RNP machine. Cell 136, 701–718. doi:10.1016/j.cell.2009.02.009
- 5- Nilsen TW. In: Grunberg-Manago RWSaM, editor. RNA structure and function. Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1998. p. 279–307.
- 6- Staley JP, Guthrie C. Mechanical devices of the spliceosome: motors, clocks, springs, and things. Cell 1998;92:315–26.
- 7- Valadkhan S. snRNAs as the catalysts of pre-mRNA splicing. Curr Opin Chem Biol 2005;9:603–8.
- 8- Loftus B, Anderson I, Davies R, Alsmark UC, Samuelson J, Amedeo P, et al. The genome of the protist parasite *Entamoeba histolytica*. Nature 2005;433:865–8.
- 9- Hernan A, Lorenzi, Daniela Puiu, Jason R. Miller, Lauren M. Brinkac, Paolo Amedeo, Neil Hall, Elisabet V. Caler. New Assembly, Reannotation and Analysis of the *Entamoeba histolytica* Genome Reveal New Genomic Features and Protein Content Information. PLoS Neglected Tropical Diseases. June 2010 | Volume 4 | Issue 6 | e716
- 10- Davis CA, Brown MP, Singh U. Functional characterization of spliceosomal introns and identification of U2, U4, and U5 snRNAs in the deep-branching eukaryote *Entamoeba histolytica*. Eukaryot Cell 2007;6:940–8.
- 11- Lohia A, Samuelson J. Cloning of the Eh cdc2 gene from *Entamoeba histolytica* encoding a protein kinase p34cdc2 homologue. Gene 1993;127:203–7.
- 12- Marchat LA, Orozco E, Guillen N, Weber C, Lopez-Camarillo C. Putative DEAD and DExH-box RNA helicases families in *Entamoeba histolytica*. Gene 2008;424:1–10.
- 13- Plaimauer B, Ortner S, Wiedermann G, Scheiner O, Duchene M. An intron-containing gene coding for a novel 39- kilodalton antigen of *Entamoeba histolytica*. Mol Biochem Parasitol 1994;66:181–5.
- 14- Sanchez-Lopez R, Gama-Castro S, Ramos MA, Merino E, Lizardi PM, Alagon A. Cloning and expression of the *Entamoeba histolytica* ERD2 gene. Mol Biochem Parasitol 1998;92:355–9.
- 15- Urban B, Blasig C, Forster B, Hamelmann C, Horstmann RD. Putative serine/threonine protein kinase expressed in complement-resistant forms of *Entamoeba histolytica*. Mol Biochem Parasitol 1996;80:171–8.

- 16- Wilihoeft U, Campos-Gongora E, Touzni S, Bruchhaus I, Tannich E. Introns of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar*. *Protist* 2001;152:149–56.
- 17- Willhoeft U, Hamann L, Tannich E. A DNA sequence corresponding to the gene encoding cysteine proteinase 5 in *Entamoeba histolytica* is present and positionally conserved but highly degenerated in *Entamoeba dispar*. *Infect Immun* 1999;67:5925–9.
- 18- Schmid, S. R. and Linder, P (1992) *mol. Microbio.*, 6, 283-292.
- 19- Gorbalenya, A. E. and Koonin E. V. (1993) *curr. Opin. Struct. Biol.*, 3, 419-429.
- 20- Gorbalenya, A. E. and Koonin E. V. Donchenko, A. P., and Blinov, V. M (1989) *Nucleic Acids Res.*, 17, 4713-4730.
- 21- Linder, P., Lasko, P. F., Ashburner, M., Leroy, P., Nielsen, P. J., Nishi, K., Schnier, J. and Slonimski P.P (1989) *Nature*, 337, 121-122.
- 22- Warkocki Z, Odenwalder P, Schmitzova J, Platzmann F, Stark H, Urlaub H, et al. Reconstitution of both steps of *Saccharomyces cerevisiae* splicing with purified spliceosomal components. *Nat Struct Mol Biol* 2009; 16:1237-43; PMID:19935684;
- 23- Fairman-Williams ME, Guenther UP, Jankowsky E. SF1 and SF2 helicases: family matters. *Curr Opin Struct Biol* 2010; 20:313-24; PMID:20456941.
- 24- Jankowsky E. RNA helicases at work: binding and rearranging. *Trends Biochem Sci* 2011; 36:19-29
- 25- Cordin O, Banroques J, Tanner NK, Linder P. The DEAD-box protein family of RNA helicases. *Gene* 2006; 367:17-37.
- 26- Yang Q, Jankowsky E. ATP- and ADP-dependent modulation of RNA unwinding and strand annealing activities by the DEAD-box protein DED1. *Biochemistry* 2005; 44:13591-601.
- 27- Shepard PJ, Hertel KJ. The SR protein family. *Genome Biol* 2009; 10:242.
- 28- Bjork P, Jin S, Zhao J, Singh OP, Persson JO, Hellman U, et al. Specific combinations of SR proteins associate with single pre-messenger RNAs in vivo and contribute different functions. *J Cell Biol* 2009; 184:555-68
- 29- Long JC, Caceres JF. The SR protein family of splicing factors: master regulators of gene expression. *Biochem J* 2009; 417:15-27
- 30- Murzin AG. OB (oligonucleotide/oligosaccharide binding)-fold: common structural and functional solution for non-homologous sequences. *EMBO J* 1993; 12:861-7
- 31- Walbott H, Mouffok S, Capeyrou R, Lebaron S, Humbert O, van Tilbeurgh H, et al. Prp43p contains a processive helicase structural architecture with a specific regulatory domain. *EMBO J* 2010; 29:2194-204
- 32- Lebaron S, Papin C, Capeyrou R, Chen YL, Froment C, Monsarrat B, et al. The ATPase and helicase activities of Prp43p are stimulated by the G-patch protein Pfa1p during yeast ribosome biogenesis. *EMBO J* 2009; 28:3808-19.
- 33- He Y, Andersen GR, Nielsen KH. Structural basis for the function of DEAH helicases. *EMBO Rep* 2010; 11:180-6

- 34- Silverman EJ, Maeda A, Wei J, Smith P, Beggs JD, Lin RJ. Interaction between a G-patch protein and a spliceosomal DEXD/H-box ATPase that is critical for splicing. *Mol Cell Biol* 2004; 24:10101-10
- 35- Roy J, Kim K, Maddock JR, Anthony JG, Woolford JL Jr. The final stages of spliceosome maturation require Spp2p that can interact with the DEAH box protein Prp2p and promote step 1 of splicing. *RNA* 1995; 1:375-90.
- 36- Santosa KS, Mozaffari-Jovin S, Webera G, Pena V, Lührmann R, Wahl MC. Structural basis for functional cooperation between tandem helicase cassettes in Brr2-mediated remodeling of the spliceosome. *Proc Natl Acad Sci USA* 2012.
- 37- Cordin, O. and Beggs, J. D. RNA helicases in splicing. *RNA Biology* 2013. 10:1, 83–95.
- 38- Fuller-Pace, F.V. (2006) DEXD/H-box RNA helicases: multifunctional proteins with important roles in transcriptional regulation. *Nucleic Acids Res.*, doi:10.1093.
- 39- Iost, I. and Dreyfus, M. (2006) DEAD-box RNA helicases in *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res.*, doi:10.1093.
- 40- Tanner, N.K. and Linder, P. (2001) DEXD/H box RNA helicases: from generic motors to specific dissociation functions. *Mol. Cell*, 8, 251–262.
- 41- de la Cruz, J., Kressler, D. and Linder, P. (1999) Unwinding RNA in *Saccharomyces cerevisiae*: DEAD-box proteins and related families. *Trends Biochem. Sci.*, 24, 192–198.
- 42- Valgardsdottir, R., Brede, G., Eide, L.G., Frengen, E. and Prydz, H. (2001) Cloning and characterization of MDDX28, a putative dead-box helicase with mitochondrial and nuclear localization. *J. Biol. Chem.*, 276, 32056–32063.
- 43- Tseng, S.S.-I., Weaver, P.L., Liu, Y., Hitomi, M., Tartakoff, A.M. and Chang, T.-H. (1998) Dbp5p, a cytosolic RNA helicase, is required for poly(A)⁺ RNA export. *EMBO J.*, 17, 2651–2662.
- 44- Schmitt, C., von Kobbe, C., Bach, I.A., Pante, N., Rodrigues, J.P., Boscheron, C., Rigaut, G., Wilm, M., Seraphin, B., Carmo-Fonseca, M. et al. (1999) Dbp5, a DEAD-box protein required for mRNA export, is recruited to the cytoplasmic fibrils of nuclear pore complex via a conserved interaction with CAN/Nup159p. *EMBO J.*, 18, 4332–4347.
- 45- Jurica, M.S. and Moore, M.J. (2003) Pre-mRNA splicing: awash in a sea of proteins. *Mol. Cell*, 12, 5–14.
- 46- Staley, J.P. and Guthrie, C. (1998) Mechanical devices of the spliceosome: motors, clocks, springs, and things. *Cell*, 92, 315–326.
- 47- Liu, Z.R. (2002) p68 RNA helicase is an essential human splicing factor that acts at the U1 snRNA-50 splice site duplex. *Mol. Cell. Biol.*, 22, 5443–5450.
- 48- Guil, S., Gattoni, R., Carrascal, M., Abian, J., Stevenin, J. and Bach-Elias, M. (2003) Roles of hnRNP A1, SR proteins, and p68 helicase in c-H-ras alternative splicing regulation. *Mol. Cell. Biol.*, 23, 2927–2941.
- 49- Arenas, J.E. and Abelson, J.N. (1997) Prp43: an RNA helicase-like factor involved in spliceosome disassembly. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 94, 11798–11802.

- 50- Chen,J.-H. and Lin,R.-J. (1990) The yeast PRP2 protein, a putative RNA-dependent ATPase, shares extensive sequence homology with two other pre-mRNA splicing factors. *Nucleic Acids Res.*, 18, 6447.
- 51- Company,M., Arenas,J. and Abelson,J. (1991) Requirement of the RNA helicase-like protein PRP22 for release of messenger RNA from spliceosomes. *Nature*, 349, 487–493.
- 52- King,D.S. and Beggs,J.D. (1990) Interactions of PRP2 protein with pre-mRNA splicing complexes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res.*, 18, 6559–6564.
- 53- Martin,A., Schneider,S. and Schwer,B. (2002) Prp43 is an essential RNA-dependent ATPase required for release of lariat-intron from the spliceosome. *J. Biol. Chem.*, 277, 17743–17750.
- 54- Schwer,B. and Guthrie,C. (1991) PRP16 is an RNA-dependent ATPase that interacts transiently with the spliceosome. *Nature*, 349, 494–499.
- 55- Silverman,E., Edwalds-Gilbert,G. and Lin,R.J. (2003) DEXD/H-box proteins and their partners: helping RNA helicases unwind. *Gene*, 312, 1–16.
- 56- Kressler,D., Linder,P. and de La Cruz,J. (1999) Protein trans-acting factors involved in ribosome biogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.*, 19, 7897–7912.
- 57- Venema,J. and Tollervey,D. (1999) Ribosome biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Ann. Rev. Gen.*, 33, 261–331.
- 58- Bernstein,K.A., Granneman,S., Lee,A.V., Manickam,S. and Baserga,S.J. (2006) Comprehensive mutational analysis of yeast DEXD/H box RNA helicases involved in large ribosomal subunit biogenesis. *Mol. Cell. Biol.*, 26, 1195–1208.
- 59- Granneman,S., Bernstein,K.A., Bleichert,F. and Baserga,S.J. (2006) Comprehensive mutational analysis of yeast DEXD/H box RNA helicases required for small ribosomal subunit synthesis. *Mol. Cell. Biol.*, 26, 1183–1194.
- 60- Kos,M. and Tollervey,D. (2005) The putative RNA helicase Dbp4p is required for release of the U14 snoRNA from preribosomes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell*, 20, 53–64.
- 61- Snay-Hodge,C.A., Colot,H.V., Goldstein,A.L. and Cole,C.N. (1998) Dbp5p/Rat8p is a yeast nuclear pore-associated DEAD-box protein essential for RNA export. *EMBO J.*, 17, 2663–2676.
- 62- Estruch,F. and Cole,C.N. (2003) An early function during transcription for the yeast mRNA export factor Dbp5p/Rat8p suggested by its genetic and physical interactions with transcription factor IIH components. *Mol. Biol. Cell*, 14, 1664–1676.
- 63- Gatfield,D., Le Hir,H., Schmitt,C., Braun,I.C., Köcher,T., Wilm,M. and Izaurralde,E. (2001) The DEXH/D protein HEL/UAP56 is essential for mRNA nuclear export in *Drosophila*. *Curr. Biol.*, 11, 1716–1721.
- 64- Jensen,T.H., Boulay,J., Rosbash,M. and Libri,D. (2001) The DECD-box putative ATPase Sub2p is an early mRNA export factor. *Curr. Biol.*, 11, 1711–1715.

- 65- Luo,M.-J., Zhou,Z., Magni,K., Christoforides,C., Rappslibere,J., Mann,M. and Reed,R. (2001) Pre-mRNA splicing and mRNA export linked by direct interactions between UAP56 and Aly. *Nature*, 413, 644–647.
- 66- Strasser,K. and Hurt,E. (2001) Splicing factor Sub2p is required for nuclear mRNA export through its interaction with Yra1p. *Nature*, 413, 648–652.
- 67- Khemici,V., Poljak,L., Toesca,I. and Carpousis,A.J. (2005) Evidence in vivo that the DEAD-box RNA helicase RhlB facilitates the degradation of ribosome-free mRNA by RNase E. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 102, 6913–6918.
- 68- Py,B., Higgins,C.F., Krisch,H.M. and Carpousis,A.J. (1996) A DEAD-box RNA helicase in the Escherichia coli RNA degradosome. *Nature*, 381, 169–172.
- 69- Anderson,J.S.J. and Parker,R.P. (1998) The 30 to 50 degradation of yeast mRNAs is a general mechanism for mRNA turnover that requires the SKI2 DEVH box protein and 30 to 50 exonucleases of the exosome complex. *EMBO J.*, 17, 1497–1506.
- 70- LaCava,J., Houseley,J., Saveanu,C., Petfalski,E., Thompson,E., Jacquier,A. and Tollervey,D. (2005) RNA degradation by the exosome is promoted by a nuclear polyadenylation complex. *Cell*, 121, 713–724.
- 71- Margossian,S.P. and Butow,R.A. (1996) RNA turnover and the control of mitochondrial gene expression. *Trends Biochem. Sci.*, 21, 392–396.
- 72- Raijmakers,R., Schilders,G. and Pruijn,G.J. (2004) The exosome, a molecular machine for controlled RNA degradation in both nucleus and cytoplasm. *Eur. J. Cell Biol.*, 83, 175–183.
- 73- Collier,J.M., Tucker,M., Sheth,U., Valencia-Sanchez,M.A. and Parker,R. (2001) The DEAD box helicase, Dhh1p, functions in mRNA decapping and interacts with both the decapping and deadenylase complexes. *RNA*, 7, 1717–1727.
- 74- Collier,J. and Parker,R. (2005) General translational repression by activators of mRNA decapping. *Cell*, 122, 875–886.
- 75- Minshall,N., Thom,G. and Standart,N. (2001) A conserved role of a DEAD box helicase in mRNA masking. *RNA*, 7, 1728–1742.
- 76- Smillie,D.A. and Sommerville,J. (2002) RNA helicase p54 (DDX6) is a shuttling protein involved in nuclear assembly of stored mRNP particles. *J. Cell Sci.*, 115, 395–407.
- 77- Huang,H.R., Rowe,C.E., Mohr,S., Jiang,Y., Lambowitz,A.M. and Perlman,P.S. (2005) The splicing of yeast mitochondrial group I and group II introns requires a DEAD-box protein with RNA chaperone function. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 102, 163–168.
- 78- Linder, P. Dead-box proteins: a family affair-active and passive player in RNP-remodeling. *Nucleic Acids Research*, 2006, 34,15, 4168–4180.
- 79- Kuroda,M.I., Kernan,M.J., Kreber,R., Ganetzky,B. and Baker,B.S. (1991) The maleless protein associates with the X chromosome to regulate dosage compensation in Drosophila. *Cell*, 66, 935–947.
- 80- Grundhoff,A.T., Kremmer,E., Tureci,O., Glieden,A., Gindorf,C., Atz,J., Mueller-Lantzsch,N., Schubach,W.H. and Grasser,F.A. (1999) Characterization of DP103,

- a novel DEAD box protein that binds to the Epstein–Barr virus nuclear proteins EBNA2 and EBNA3C. *J. Biol. Chem.*, 274, 19136–19144.
- 81- Stevenson,R.J., Hamilton,S.J., MacCallum,D.E., Hall,P.A. and Fuller-Pace,F.V. (1998) Expression of the ‘DEAD box’ RNA helicase p68 is developmentally and growth regulated and correlates with organ differentiation/maturation in the fetus. *J. Pathol.*, 184, 351–359.
- 82- Ip,F.C., Chung,S.S., Fu,W.Y. and Ip,N.Y. (2000) Developmental and tissue-specific expression of DEAD box protein p72. *Neuroreport*, 11, 457–462.
- 83- Henning,D., So,R.B., Jin,R., Lau,L.F. and Valdez,B.C. (2003) Silencing of RNA helicase II/Gua inhibits mammalian ribosomal RNA production. *J. Biol. Chem.*, 278, 52307–52314.
- 84- Yang,H., Zhou,J., Ochs,R.L., Henning,D., Jin,R. and Valdez,B.C. (2003) Down-regulation of RNA helicase II/Gua results in the depletion of 18 and 28S rRNAs in *Xenopus* oocyte. *J. Biol. Chem.*, 278, 38847–38859.
- 85- Yang,H., Henning,D. and Valdez,B.C. (2005) Functional interaction between RNA helicase II/Gua(alpha) and ribosomal protein L4. *FEBS J.*, 272, 3788–3802.
- 86- Rajendran,R. R., Nye,A.C., Frasor,J., Balsara,R.D., Martini,P.G. and Katzenellenbogen,B.S. (2003) Regulation of nuclear receptor transcriptional activity by a novel DEAD box RNA helicase (DP97). *J. Biol. Chem.*, 278, 4628–4638.
- 87- Miranda, R., Salgado, L. M., Sánchez-López, R., Alagón, A., and Lizardi, P. M. (1996). Identification and analysis of the u6 small nuclear RNA gene from *Entamoeba histolytica*. *Gene* 180, 37–42.
- 88- Davis, C. A., Brown, M. P., and Singh, U. (2007). Functional characterization of spliceosomal introns and identification of U2, U4, and U5 snRNAs in the deep-branching eukaryote *Entamoeba histolytica*. *Eukaryotic Cell* 6, 940–948.
- 89- Dávila López, M., Rosenblad, M. A., and Samuelsson, T. (2008). Computational screen for spliceosomal RNA genes aids in defining the phylogenetic distribution of major and minor spliceosomal components. *Nucleic Acids Res.* 36, 3001–3010.
- 90- Huang, S. C., Ou, A. C., Park, J., Yu, F., Yu, B., Lee, A., et al. (2012). RBFOX2 promotes protein 4.1R exon 16 selection via U1 snRNP recruitment. *Mol. Cell Biol.* 32, 513–526.
- 91- Kandels-Lewis, S., and Séraphin, B. (1993). Involvement of U6 snRNA in 5’ splice site selection. *Science* 262, 2035–2039.
- 92- Förch, P., Puig, O., Martínez, C., Séraphin, B., and Valcárcel, J. (2002). The splicing regulator TIA-1 interacts with U1-C to promote U1 snRNP recruitment to 5’ splice sites. *EMBO J.* 21, 6882–6892.
- 93- Marchat, L. A., Orozco, E., Guillen, N., Weber, C., and López-Camarillo, C. (2008). Putative DEAD and DExH-box RNA helicases families in *Entamoeba histolytica*. *Gene* 424, 1–10.
- 94- Valdés, J., Nozaki, T., Sato, E., Chiba, Y., Nakada-Tsukui, K., Villegas-Sepúlveda, N., et al. (2014). Proteomic analysis of *Entamoeba histolytica* in vivo assembled pre-mRNA splicing complexes. *J. Proteomics* 111, 30–45.

- 95- Valdés-Flores J, López-Rosas I, López-Camarillo C, Ramírez-Moreno E, Ospina-Villa JD and Marchat LA (2018) Life and Death of mRNA Molecules in *Entamoeba histolytica*. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 8:199.
- 96- Ruby, S.W., T.H. Chang, and J. Abelson. 1993. Four yeast spliceosomal proteins (PRP5, PRP9, PRP11, and PRP21) interact to promote U2 snRNP binding to pre-mRNA. *Genes & Dev.* 7: 1909-1925.
- 97- O'Day CL, Dalbadie-McFarland G, Abelson J (1996) The *Saccharomyces cerevisiae* Prp5 protein has RNA-dependent ATPase activity with specificity for U2 small nuclear RNA. *J Biol Chem* 271: 33261–33267.
- 98- Yong-Zhen, Xu, Catherine, M. Newnham, Sei Kameoka, Tao Huang, Maria, M. Konarska and Charles, C.Q. Prp5 bridges U1 and U2 snRNPs and enables stable U2 snRNP association with intron RNA. *The EMBO Journal* (2004) 23, 376–385.
- 99- Fleckner, J. Zhang, M. Valcárcel, J. and Green, M. R. U2AF65 recruits a novel human DEAD box protein required for the U2 snRNP-branchpoint interaction. *Genes & development* (1997) 11:1864-1872.
- 100- C. Vernet, K. Artzt, *Trends Genet.* (1997),13, 479.
- 101- Supplementary materials showing a multiple sequence alignment of STAR family proteins and NMR titration experiments are available at Science Online at www.sciencemag.org/cgi/content/full/294/5544/1098/DC1.
- 102- J. A. Berglund, N. Abovich, M. Rosbash, *Genes Dev.* 12, 858 (1998).
- 103- J. C. Rain, Z. Rafi, Z. Rhani, P. Legrain, A. Kra'mer, *RNA* 4, 551 (1998).
- 104- J. A. Berglund, M. L. Fleming, M. Rosbash, *RNA* 4, 998 (1998).
- 105- José Rino, Joana M. P. Desterro, Teresa R. Pacheco, Theodor W. J. Gadella, Jr. and Maria Carmo-Fonseca. Splicing Factors SF1 and U2AF Associate in Extrasliceosomal Complexes, (2008), *Molecular and cellular biology*, 28, 9, 3045–3057.
- 106- Xin Wang, Shirin Bruderer, Zahra Rafi, Jing Xue, Peter J. Milburn, Angela Kra'mer and Phillip J. Robinson. Phosphorylation of splicing factor SF1 on Ser20 by cGMP-dependent protein kinase regulates spliceosome assembly. (1999), *The EMBO Journal*, 18, 16.4549–4559.
- 107- Wen-Wei Liang and Soo-Chen Cheng, A novel mechanism for Prp5 function in prespliceosome formation and proofreading the branch site sequence. (2015), *GENES & DEVELOPMENT* 29:81–93.