



CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE
ESTUDIOS AVANZADOS DEL
INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA

Identificación de algunos componentes de la biogénesis de
flicRNAs en *Entamoeba histolytica*.

TESIS

Que presenta:

IBQ. Sandra Lorena Palacio Molina

Para obtener el grado de
Maestra en Ciencias

En la especialidad de
Bioquímica

Director de tesis:
Dr. Jesús Valdés Flores

ÍNDICE

ÍNDICE	1
LISTA DE FIGURAS Y GRÁFICAS	3
1. RESUMEN	4
2. ABSTRACT.....	5
3. INTRODUCCIÓN	6
3.1 Procesamiento del RNA.....	6
3.2 Splicing	6
3.3 Elementos reguladores en <i>cis</i> del evento de splicing	7
3.4 Ensamble del spliceosoma	8
3.5 Metabolismo del intrón lariat.....	9
3.6 RNAs no codificantes	10
3.7 RNAs circulares	10
3.8 RNAs circulares de intrones auto-escindibles	12
3.9 RNAs circulares de eucariotas	13
3.9.1 Biogénesis de los circRNAs eucarióticos	13
3.9.2. Posibles funciones de los circRNAs en la regulación génica.....	16
3.9.3. <i>Entamoeba histolytica</i> : organismo de estudio.....	19
3.9.4 Splicing en <i>Entamoeba histolytica</i>	20
4. ANTECEDENTES	21
5. JUSTIFICACIÓN	24
6. HIPÓTESIS.....	24
7. OBJETIVOS	25
7.1. Objetivo General.....	25
7.2. Objetivos Específicos.....	25
8. MATERIALES Y MÉTODOS	27
8.1 Cultivo de trofozoitos de <i>Entamoeba histolytica</i> para la cinética de crecimiento	27
8.2 Extracción de RNA.....	27
8.3 RT-PCR.....	28
8.4 Construcción de los plásmidos de sobreexpresión.....	30
8.5 Transfección de los plásmidos de sobreexpresión en trofozoitos de <i>E. histolytica</i>	31
8.6 Extracción de proteínas.....	32
8.7 Western Blot	33

8.8 Mutagénesis sitio dirigida por PCR	33
9. RESULTADOS.....	35
9.1 Biogénesis de flicRX13 durante una cinética de crecimiento de <i>E. histolytica</i>	35
9.2 Efecto de la sobreexpresión de U2AF84 y U2AF84ΔC sobre la biogénesis de flicRX13	37
9.3 Efecto de la sobreexpresión de Dbr y DbrΔC en trofozoitos de <i>E. Histolytica</i> en la formación de flicRX13	39
9.4 Obtención de las construcciones de sobreexpresión pEhExHA-Dbr1C14A y pEhExHA-Dbr1ΔC-C14A	43
10. DISCUSIÓN	45
11. CONCLUSIONES	49
12. PERSPECTIVAS	49
13. BIBLIOGRAFÍA	50
14. APÉNDICE.....	57
Apéndice A	57
Apéndice B.....	58

LISTA DE FIGURAS Y GRÁFICAS

Figura	Página
1. Ilustración esquemática de las dos reacciones de transesterificación durante el splicing del pre-mRNA	7
2. Elementos reguladores en <i>cis</i> en el pre-mRNA	7
3. Ensamble del spliceosoma y las etapas catalíticas del splicing.	8
4. Propiedades de los RNAs circulares	11
5. Vías de auto-splicing	12
6. Modelos de la biogénesis de circRNAs	15
7. Posibles funciones de los circRNAs	18
8. Modelo del ciclo de vida y patogénesis de <i>E. histolytica</i>	19
9. La biogénesis de flicRX13 ocurre durante el procesamiento del RNA	36
10. Análisis de la sobreexpresión de U2AF84 y U2AF84ΔC	38
11. U2AF84 está involucrado en la retención intrónica	38
12. Análisis de restricción de candidatos de proteínas de fusión HA-Dbr1 y HA-Dbr1ΔC	40
13. Análisis de la sobreexpresión de HA-Dbr1 y HA-Dbr1ΔC	41
14. Dbr1 está implicada en la biogénesis de flicRX13	42
15. Alineamiento de las secuencias de aminoácidos de Dbr1 y Dbr1ΔC con la mutación C14A y Dbr1 <i>wild type</i> .	44
16. Modelo de la biogénesis de flicRX13	48
17. Reconocimiento del sitio de splicing 5' por U6 de <i>E. histolytica</i>	48

Gráfica	Página
1. Abundancia relativa (en porcentaje) de flicRX13 respecto a las variantes de splicing de <i>RabX13</i>	36
2. Eficiencia de la sobreexpresión de HA-Dbr1 y HA-Dbr1ΔC	41
3. Expresión de flicRX13 en trofozoitos transfectados con las construcciones pEhExHA-Dbr1 y pEhExHA-Dbr1ΔC	43

Tabla	Página
1. Oligonucleótidos y condiciones de amplificación	29

1. RESUMEN

Una nueva clase de RNAs no codificantes son los RNAs circulares (circRNAs) los cuáles se expresan en todos los tejidos y organismos eucariotas investigados hasta la fecha. Los circRNAs pueden formarse a partir de regiones codificantes, regiones intergénicas, intrones y UTRs por mecanismos poco conocidos. La mayoría de estos RNAs circulares se han descrito en eucariotas superiores, hongos, y protistas como *Plasmodium falciparum* y *Dictyostelium discoideum*, no así en *Entamoeba histolytica*, protista de relevancia clínica ya que es causante de disentería y en casos extremos abscesos hepáticos.

Recientemente se identificaron RNAs circulares en *E. histolytica*, los cuales difieren de otros circRNAs en que están formados por el intrón completo por lo que se les dio el nombre de flicRNAs (del inglés full-length intronic circularized RNAs).

En este trabajo se caracterizó el RNA circular intrónico de *RabX13* (flicRX13) y encontramos que éste es producto de un evento cotranscripcional y su abundancia correlaciona inversamente con la abundancia de su pre-mRNA parental.

Para identificar algunos componentes en la biogénesis de flicRX13 se sobreexpresó la versión mutante de la proteína U2AF84 (factor de splicing involucrado en el ensamble temprano del spliceosoma involucrado en la retención intrónica) y observamos un incremento en la abundancia del mRNA y del flicRX13, lo cual confirmó que los flicRNAs son productos de splicing. Para explorar la posibilidad de que su biogénesis ocurría en un evento post-splicing, se sobreexpresó una mutante de la enzima desramificadora Dbr1, la cual está implicada en la biogénesis de otros RNAs circulares. Interesantemente la sobreexpresión de esta mutante causó un incremento en la abundancia de flicRX13, esto posiblemente debido a que los intrones amebianos cuenta con la secuencia rica en GU en el 5' ss misma que en otras especies de RNAs circulares permite puedan escapar al debranching permaneciendo como círculos sin el extremo 3' del intrón.

Nuestros resultados sugieren que la biogénesis de los flicRNAs de *E. histolytica* involucra la actividad de la enzima Dbr1 en un evento post-splicing.

2. ABSTRACT

Circular RNA molecules (circRNAs) are a new class of non-coding RNAs, which are expressed in different cell-types and organisms. circRNAs may arise from intergenic or coding regions, introns, and UTRs through mechanisms poorly understood. Most circRNAs have been described in multicellular eukaryotes, yeasts, and the protists *Plasmodium falciparum* and *Dictyostelium discoideum*, but not in clinically relevant protists such as *Entamoeba histolytica*, the etiological agent of amoebiasis.

We identified circular RNAs of *E. histolytica* which differ from previously reported circRNAs in that they are conformed by full-length intronic circularized RNAs (flicRNAs).

The intron circle of *RabX13* (flicRX13) was characterized at large. We found that flicRX13 is generated cotranscriptionally and its abundance inversely correlates with that of its parental pre-mRNA and that of the accompanying spliced variant.

To understand flicRX13 biogenesis, we overexpressed a mutant version of U2AF84 (a constitutive splicing factor involved in early spliceosome assembly, as well as in intron retention) and observed that both spliced and flicRX13 abundance increased, confirming that flicRNAs are splicing byproducts, and suggesting their possible post-splicing origin. To explore this possibility, we overexpressed a debranching-deficient Dbr1, otherwise implicated in the biogenesis of other circRNA species. Unexpectedly, debranching-deficient Dbr1 caused an increase in flicRX13 levels, probably due to the intronic GU-rich 5' splice sites which allows debranching escape in other circRNA species.

Our results suggest that *E. histolytica* flicRNAs biogenesis involves the activity of the Dbr1 enzyme in a post-splicing event.

3. INTRODUCCIÓN

3.1 Procesamiento del RNA

El comienzo en la síntesis de una molécula de RNA, es sólo el primer paso de la vía de expresión del genoma. Posteriormente se llevan a cabo modificaciones para que el transcrito primario pueda utilizarse para la síntesis de proteínas. Estas modificaciones son el capping, splicing y poliadenilación. Durante el capping al transcrito nascente se le adiciona un nucleósido de guanina metilado en la posición N-7 en el extremo 5' y sirve para el reconocimiento de RNAs mensajeros que son transcritos por la RNA polimerasa II y la posterior síntesis de proteínas (Furuichi, 2015). Posteriormente ocurre el evento de splicing, del cual se hablará a detalle más adelante y finalmente para una maduración completa del transcrito ocurre la adición de una cola poli(A) al mRNA la cual consiste de múltiples adenosin monofosfatos y propicia estabilidad además de ser importante para la exportación de este mensajero maduro (Lodish *et al.*, 2000).

3.2 Splicing

El splicing del pre-mRNA es esencial para la expresión génica en eucariotas y es uno de los mecanismos más versátiles para incrementar la diversidad proteómica (Crisci *et al.*, 2015). Este proceso ocurre debido a que la mayoría de los genes que codifican proteínas se expresan como RNAs pre-mensajeros (pre-mRNAs), las secuencias no codificantes (intrones) son escindidas y las secuencias codificantes (exones) se unen para producir RNAs maduros funcionales (mRNAs) (Patel y Steitz, 2003; Chen y Cheng, 2012), este proceso es orquestado por el spliceosoma, en el cual ocurren dos reacciones de transesterificación (Fig. 1). El spliceosoma consiste de 5 ribonucleoproteínas nucleares (snRNPs U1, U2, U4, U5 y U6) y más de 100 proteínas auxiliares (Matera y Wang, 2014; Crisci *et al.*, 2015), las cuales se ensamblan por interacciones coordinadas de RNA-RNA, RNA-proteína y proteína-proteína que conducen a la ligación de los exones y la liberación del intrón en forma de lariat

(Patel y Steitz, 2003), sin embargo, los mecanismos por los que se lleva a cabo no se conocen completamente (Jenkins *et al.*, 2013).

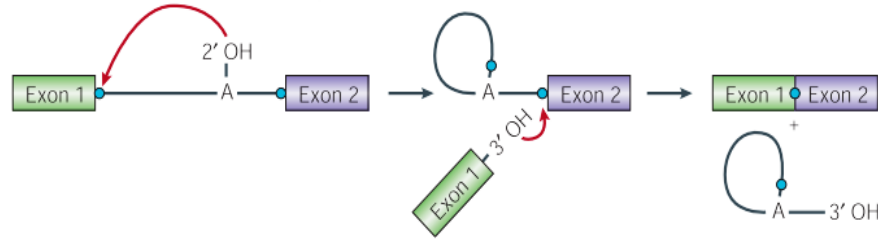


Figura 1. Ilustración esquemática de las dos reacciones de transesterificación durante el splicing del pre-mRNA. La línea negra representa al intrón flanqueado por dos exones. Ambos ataques nucleofílicos ocurren en las uniones fosfodiéster de cada extremo del intrón (círculos azules), el primero es realizado por el 2' OH de la adenosina (A) del sitio de ramificación y posteriormente ocurre un segundo ataque nucleofílico por el 3' OH libre del exón 1. Los exones ligados y el intrón lariat se muestran a la derecha. Figura tomada de Patel y Steitz, 2003.

3.3 Elementos reguladores en *cis* del evento de splicing

El ensamble del spliceosoma es un evento de unión de estos factores ordenadamente debido a que la mayoría de los intrones cuentan con secuencias consenso sus extremos 3' y 5' además de un sitio de ramificación que generalmente se encuentra localizado de 18-40 nucleótidos río arriba del sitio de splicing 3' en humanos (Fig. 2). Sin embargo, se han encontrado algunos genes que contienen intrones raros sin secuencias consenso (Chen y Cheng, 2012). En metazoos, pero no en levaduras, existe un tracto de polipirimidinas (Y(n)) que se encuentra río abajo del sitio de ramificación, sin embargo, esta secuencia es poco conservada, especialmente en metazoos complejos, por lo tanto, no es suficiente para el ensamble del spliceosoma (Will y Lührmann, 2011).

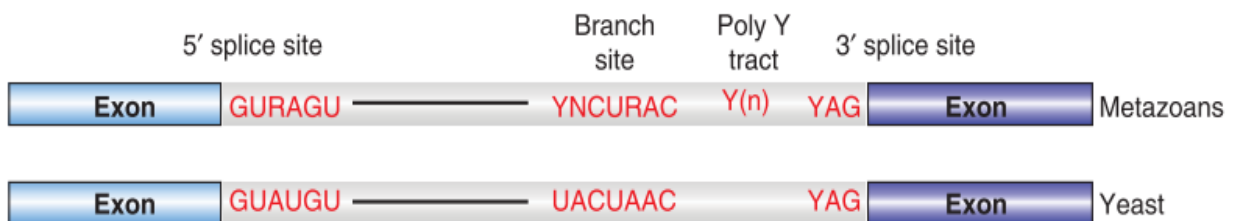


Figura 2. Elementos reguladores en *cis* en el pre-mRNA. Secuencias consenso conservadas en el sitio de splicing 5' y 3', sitio de ramificación en metazoos y *S. cerevisiae*. El tracto de polipirimidinas se indica con Y(n). Figura tomada de Will y Lührmann, 2011.

3.4 Ensamble del spliceosoma

El primer evento en el ensamblaje del spliceosoma incluye la unión de U1 al sitio de splicing 5' mientras que U2 reconoce al sitio de splicing 3', sin embargo, debido a que el sitio de ramificación es degenerado en muchos eucariotas, la unión de U2 requiere de múltiples factores auxiliares siendo el más importante U2AF, un heterodímero que consiste de dos subunidades de 35kD y 65kD (Jenkins *et al.*, 2013). La subunidad de 65kD (U2AF65) la cual contacta directamente el tracto de polipirimidinas contiene un dominio rico en arginina/serina en el N-terminal, un dominio de interacción con la subunidad de 35kD (U2AF35) y tres dominios de unión a RNA. U2AF35 el cual contiene una región con homología a un dominio de unión a RNA se ha demostrado que interacciona con el dinucleótido AG del sitio de splicing 3' (Cho *et al.*, 2015).

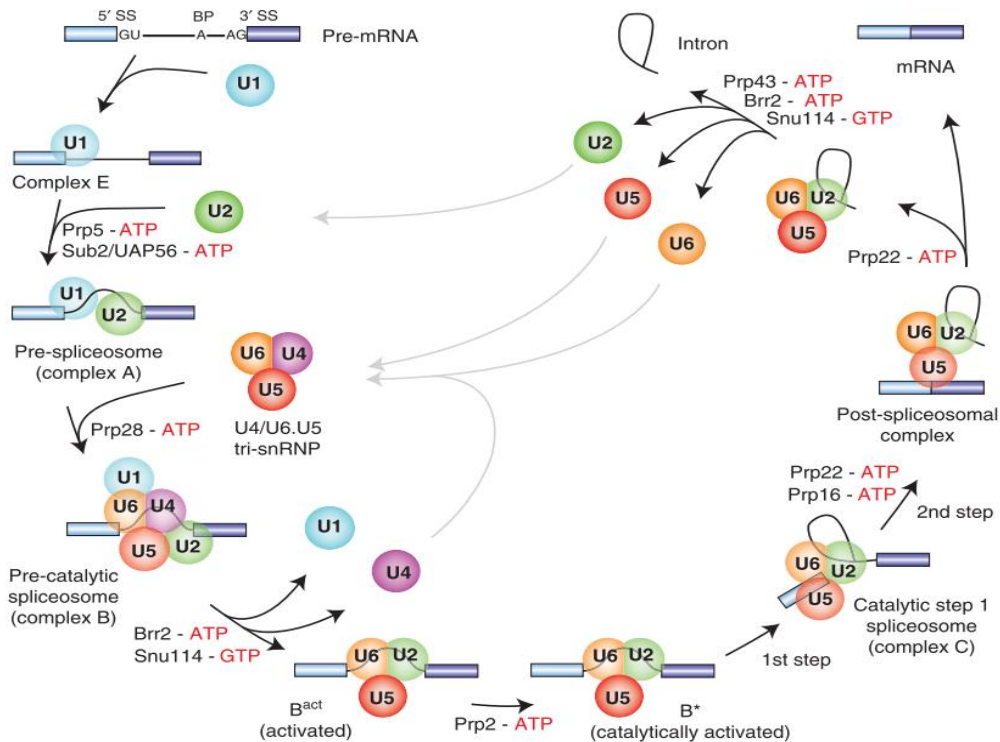


Figura 3. Ensamblaje del spliceosoma y las etapas catalíticas del splicing. Ilustración esquemática de las reacciones por las cuales se lleva a cabo el procesamiento del pre-mRNA. Por simplicidad solo se muestran las interacciones de los snRNPs (círculos). Los complejos del spliceosoma son nombrados de acuerdo a la nomenclatura de metazoos. Los exones e intrones son representados por rectángulos y líneas, respectivamente. Se indican los nombres de helicasas (y sus sustratos con letras rojas) que participan facilitando los cambios conformacionales del spliceosoma. Figura tomada de Will y Lührmann, 2011.

Otra proteína la cual interacciona con el sitio de ramificación es el factor de splicing 1 (SF1), este se une cooperativamente con U2AF65 y dicho complejo formando el complejo E (Will y Lührmann, 2011), el cual posteriormente se convierte en el complejo A al unirse el snRNP U2 al sitio de ramificación (Crisci *et al.*, 2015). Este proceso es dependiente de las helicasas Prp5 y Sub2. En una reacción subsecuente catalizada por Prp28 el tri-snRNP U4-U6•U5 es reclutado para formar el complejo B el cual requiere de las helicasas Brr2, Snu114 y Prp2 para la liberación de los snRNPs U1 y U4 y formar el complejo B catalítico. Luego ocurre el primer paso catalítico del splicing generando el complejo C el cual contiene un exón libre y el intermediario lariat. Durante el complejo C el spliceosoma sufre una serie de re-arreglos para que ocurra el segundo paso catalítico lo cual resulta en un complejo post-spliceosoma que contiene los exones ligados y el intrón lariat. Finalmente, los snRNPs U2, U5 y U6 son liberados por la acción catalítica de otras helicasas y son reciclados (Fig. 3) (Graveley *et al.*, 2001; Will y Lührmann, 2011; Matera y Wang, 2014; Wu *et al.*, 2015).

3.5 Metabolismo del intrón lariat

Como se mencionó anteriormente, después de los dos pasos catalíticos durante el splicing se libera un intrón lariat el cual posee una unión fosfodiéster inusual 2'-5' (Arenas y Hurwitz 1987; Kataoka *et al.*, 2013) que solo puede ser hidrolizada por la enzima Dbr1 (Khalid *et al.*, 2005; Montemayor *et al.*, 2014) la cual fue descubierta en extractos de células HeLa por Ruskin y Green (1985). Dbr1 es conservada en muchos organismos (Masaki *et al.*, 2015) y específicamente hidroliza la unión 2'-5' del lariat para dar lugar a moléculas intrónicas lineales que finalmente sirven para producir microRNAs y RNAs nucleolares pequeños (snoRNAs), o bien son degradadas por exonucleasas 5'-3' como Xrn1 (Kataoka *et al.*, 2013; Montemayor *et al.*, 2014). La delección del gen *DBR1* en *Schizosaccharomyces pombe* causa defectos morfológicos y un crecimiento lento (Nam *et al.*, 1997), mientras que su delección en eucariotas superiores como *Arabidopsis thaliana* es letal (Wang *et al.*, 2004), lo cual puede deberse a la necesidad de snoRNAs y microRNAs que son esenciales en la regulación de otros procesos.

3.6 RNAs no codificantes

Una gran parte de los RNAs que son transcritos en metazoos no contienen secuencias que codifiquen para proteínas (Yoon *et al.*, 2013), muchos de ellos son procesados eventualmente para cumplir diversas funciones biológicas, y se dividen en dos grandes grupos basados en su tamaño, los RNAs no codificantes pequeños (sncRNAs) menores a 200 nt, que incluyen microRNAs, snoRNAs, RNAs nucleares pequeños (snRNAs), RNAs ribosomales (rRNAs), RNAs de transferencia (tRNAs), RNAs heterogéneos nucleares (hnRNAs), entre otros, los cuales cumplen diversas funciones durante la expresión génica (Cech y Steitz, 2014), y los RNAs grandes no codificantes (lncRNAs) los cuales tienen distintos tamaños que varían de 200 nt hasta 100 kb y se han implicado en la regulación de la transcripción en *cis* y *trans*, estabilizando o promoviendo la traducción de mRNAs blanco, y participando en la diferenciación, proliferación y control del ciclo celular (Yoon *et al.*, 2013; Cech y Steitz, 2014; Blythe *et al.*, 2015).

Una clase recientemente identificada de lncRNAs son los RNAs circulares que han llamado la atención debido a que participan en la regulación de procesos biológicos por diversos mecanismos (Lasda y Parker, 2014; Ebbesen *et al.*, 2015).

3.7 RNAs circulares

Existe una gran diversidad de RNAs circulares en diferentes sistemas biológicos, los cuales pueden producirse a partir de distintas reacciones, esta nueva clase de RNA tiene propiedades únicas como servir de molde para amplificación rodante, la habilidad de re-arreglar el orden de la información genética, son resistentes a exonucleasas, característica que los hace más estables y además su estructura circular les permite restringir la formación de estructuras secundarias del RNA (Fig. 4).

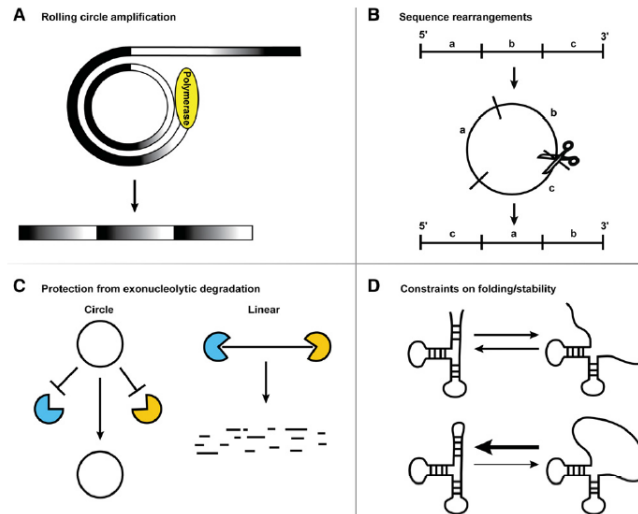


Figura 4. Propiedades de los RNAs circulares. Los RNAs circulares sirven como templado para la amplificación rodante (A), por su estructura permiten el re-arreglo de secuencias (B), evaden la degradación exonucleolítica (C) e impiden la formación de estructuras secundarias del RNA (D). Figura tomada de Lasda y Parker, 2014.

Se han descrito cinco tipos de RNAs circulares: 1) los genomas circulares de RNA en viroides encontrados en parásitos, los cuales se forman por la ligación de los extremos 3' y 5' y que posiblemente funcionan propiciando la transcripción y dando estabilidad; 2) los RNAs de secuencias intrónicas encontrados en algunas bacterias, arqueas y virus los cuales son un producto secundario del procesamiento del RNA y pertenecen a los intrones grupo I e intrones del grupo II y que posiblemente propician la movilidad de elementos genéticos. En esta misma categoría se encuentran los intrones lariat encontrados en eucariotes los cuales se forman por el ataque nucleofílico 2'-5' de la adenosina del sitio de ramificación, y se les ha asociado con la regulación de la transcripción; 3) los RNAs circulares intermediarios encontrados en arqueas, los cuales se forman a partir de precursores de rRNAs y tRNAs permutados a partir del procesamiento del rRNA y tRNA, respectivamente, estas moléculas circulares también son originadas a partir de la unión de los extremos 3' y 5'; 4) los RNAs circulares no codificantes encontrados en arqueas, como los snoRNAs y la RNasa P los cuales se originan a partir de la unión de los extremos 3' y 5' y proporcionan estabilidad; y 5) los RNAs circulares constituidos por secuencias exónicas encontrados en eucariotas, los cuales son productos secundarios que se

originan por backsplicing y que funcionan como reguladores de la traducción (Lasda y Parker, 2014).

3.8 RNAs circulares de intrones auto-escindibles

Los intrones del grupo I y II tienen la notable habilidad de auto-escindirse por un proceso llamado auto-splicing, estos se encuentran en orgánulos y bacterias. Los intrones del grupo I son más comunes que los intrones del grupo II y en ocasiones también se encuentran en el núcleo de algunos eucariotas (Lewin, 2004). No existe mucha relación entre estos dos grupos, sin embargo, ambos pueden llevar a cabo la reacción de splicing *in vitro* por ellos mismos. Durante la primera reacción, la unión 5' exón-intrón es atacada por un grupo hidroxilo libre en la posición 2' de la adenosina en el caso de los intrones del grupo II, o por una guanosina o una de sus formas 5'-fosforiladas para el caso de los intrones del grupo I, ambos atacan al átomo de fósforo en el sitio de splicing 5' formando un enlace fosfodiéster 3'-5' con el primer nucleótido del intrón. El exón 5', que termina ahora con un grupo -OH 3' libre, ataca al átomo de fósforo en el sitio de splicing 3' dando como resultado la ligación de los exones y la escisión del intrón (Fig. 5) (Cech, 1990).

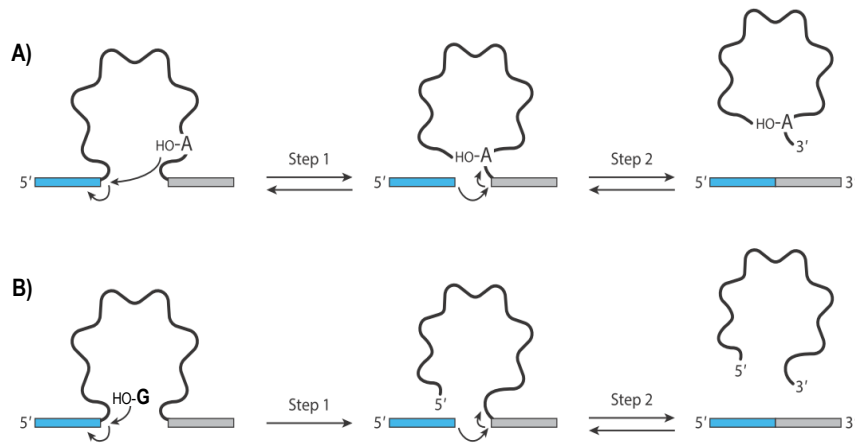


Figura 5. Vías de auto-splicing. Proceso de auto-splicing de los intrones grupo II (A) y grupo I (B).

El splicing de los intrones grupo II ocurre a partir de dos reacciones de transesterificación muy parecidas a las que ocurren en el splicing mediado por spliceosoma con la consecuente liberación del intrón en forma de lariato (Fig. 5A) pero

este también puede ser liberado en forma circular debido a que por una reacción específica de re-apertura se originan exones 5' y 3' libres, entonces el exón 5' ataca al sitio de splicing 3' liberando al exón 3' entonces la uridina en el extremo del intrón ataca al sitio de splicing 5' lo cual permite que el intrón se circularice (Murray *et al.*, 2001).

3.9 RNAs circulares de eucariotas

Los RNAs circulares (circRNAs) difieren estructuralmente de otros lncRNAs encontrados en eucariotas debido a que sus extremos 3' y 5' están unidos covalentemente además son expresados en todos los tejidos y organismos eucariotas investigados hasta la fecha (Ebbesen *et al.*, 2015). Los circRNAs recibieron poca atención después de su descubrimiento pues se creía que provenían de errores durante el splicing, sin embargo, recientemente se encontró que están involucrados en la regulación de algunos procesos biológicos a través de una gran variedad de mecanismos (Qu *et al.*, 2015). Diferentes tipos de circRNAs generados por distintos mecanismos han sido descritos en organismos superiores. Estos pueden ser originados a partir de secuencias exónicas o intrónicas, regiones intergénicas, UTR's y secuencias antisentido de transcritos conocidos (Ebbesen *et al.*, 2015; Qu *et al.*, 2015).

Wang *et al.*, (2014) encontraron isoformas de circRNAs en otras especies como hongos (*S. pombe* y *S. cerevisiae*), plantas (*A. thaliana*) y protistas (*P. falciparum* y *D. discoideum*), pero a diferencia de los organismos superiores estos tienen intrones pequeños (~100 nucleótidos o menos) y debido a que su ancestro común más reciente existió hace más de un billón de años se ha propuesto que los RNAs circulares pueden ser una característica funcional antigua y conservada en los sistemas de expresión génica.

3.9.1 Biogénesis de los circRNAs eucarióticos

Los circRNAs se forman a partir de pre-mRNAs que son transcritos por la RNA polimerasa II. La regulación de la biogénesis depende, en principio, de elementos *cis* y *trans* que regulan el proceso de splicing (Chen, 2016).

Biogénesis dependiente del spliceosoma o backsplicing

Un tipo de RNAs circulares en eucariotas provienen del splicing del pre-mRNA mediado por el spliceosoma (Fig. 6A) donde el 5' spliceo (donador) se une a un 3' spliceo (aceptor) generando así una molécula circular (Lasda y Parker, 2014) que consiste principalmente de exones. Sin embargo, aún se desconoce cómo es que el spliceosoma está involucrado en el backsplicing (Chen, 2016). Experimentos de mutagénesis en minigenes que expresan circRNAs mostraron que la eficiencia de la circularización exónica depende de la presencia de los sitios de splicing canónicos (Ashwal-Fluss *et al.*, 2014). Debido a que los niveles de circRNAs son más bajos que sus contrapartes lineales, se cree que la eficiencia del backsplicing es menor a la del splicing canónico, lo cual pudiese explicarse por el hecho de que posiblemente el spliceosoma es ensamblado incorrectamente durante este proceso.

Biogénesis por apareamiento entre intrones

La mayoría de los circRNAs en mamíferos, en *C. elegans* y algunos en *D. melanogaster* son procesados a partir de exones internos los cuales se encuentran flanqueados por intrones grandes que usualmente contienen secuencias complementarias, las cuales son capaces de aparearse para formar dúplex de RNA que incrementan el proceso de backsplicing (Fig. 6B) (Qu *et al.*, 2015; Chen, 2016). Estos elementos en *cis* facilitan la formación de circRNAs. Secuencias pequeñas de 30 a 40 son suficientes para propiciar la biogénesis de algunas moléculas circulares, sin embargo, secuencias de mayor tamaño propician a un apareamiento más fuerte que a su vez incrementa la producción de circRNAs (Liang y Wilusz, 2014; Zhang *et al.*, 2013).

Biogénesis regulada por proteínas de unión a RNA

Se han reportado hasta el día de hoy 2 modelos en los que proteínas de unión a RNA participan regulando la expresión de circRNAs. El factor de splicing Mbl en *D. melanogaster* regula la producción de circRNAs de su propio pre-mRNA debido a que los intrones que se encuentran flanqueando al exón que es circularizado tienen múltiples sitios de unión para Mbl (Fig. 6C), además una sobreexpresión de esta

proteína o la adición de sitios de unión extra para la proteína estimularon la circularización del exón, sugiriendo que Mbl estimula la producción de circRNAs (Ashwal-Fluss *et al.*, 2014). Estos resultados sugieren que factores de splicing pudiesen modular el balance entre la biogénesis de los circRNAs y el splicing canónico.

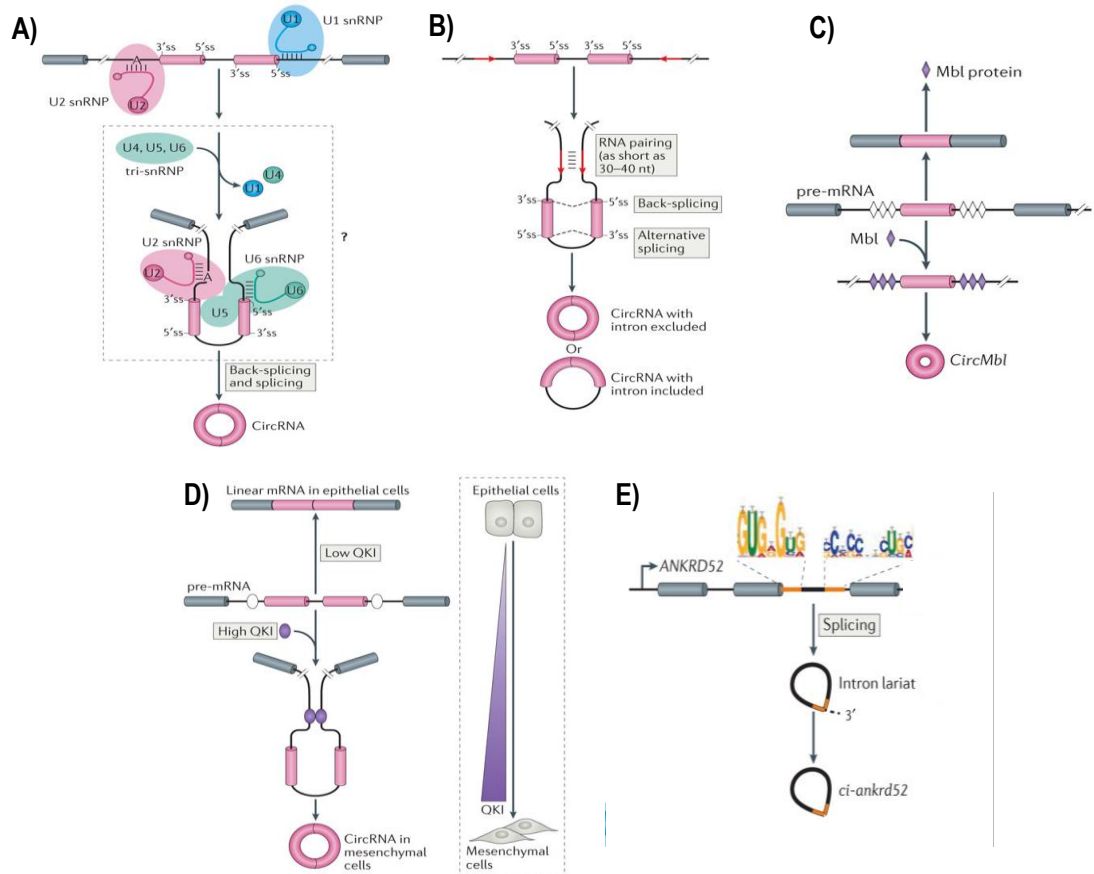


Figura 6. Modelos de la biogénesis de circRNAs. A) Backsplicing; ligación del sitio donador 5' que se encuentra río abajo con el sitio aceptor 3' que se encuentra río arriba mediado por la maquinaria canónica del splicing. B) Apareamiento entre intrones; secuencias complementarias flanqueando a los exones circularizados propician el acercamiento de estos y su unión por backsplicing o splicing alternativo. C) Proteínas de unión a RNA; la proteína Mbl incrementa la producción de RNAs circulares de su propio gen uniéndose a los intrones que flanquean al exón circularizado. Los diamantes blancos representan los sitios de unión de Mbl, D) QK1 es sobreexpresada en células mesenquimales lo cual facilita una yuxtaposición de los exones circularizados. Los óvalos blancos representan los sitios de unión de QK1. E) El intrón lariat es generado durante el splicing. Secuencias ricas en GU cerca del sitio de splicing 5' y ricas en C cerca del sitio de ramificación permiten que el lariat escape del debranching. Figura tomada de Chen, 2016.

Otra proteína de unión a RNA que incrementa la formación de circRNAs es quaking (QK1) la cual tiene sitios de unión río arriba y río abajo a los exones que son circularizados, esta proteína forma dímeros y facilita el acercamiento entre los extremos 3' y 5' de los exones circularizados (Fig. 5D). Durante la transición epitelio-mesenquima (EMT) existe una sobreexpresión de QK1 y un incremento en los niveles de RNAs circulares, lo cual sugiere que la formación de circRNAs es específica del tipo celular (Conn *et al.*, 2015).

Biogénesis dependiente de splicing

Como se mencionó anteriormente, un producto de splicing es el intrón lariar, el cual es procesado para ser degradado o generar microRNAs y snoRNAs, sin embargo, Zhang *et al.*, (2013) encontraron un nuevo tipo de RNA circular en células humanas el cual proviene de este RNA intrónico y se nombró ciRNA (circular intronic RNA).

Su biogénesis depende de dos motivos consenso, un elemento de 7 nt rico en GU cerca del sitio de splicing 5' y otro elemento de 11 nt rico en C cerca del sitio de ramificación, los cuales son suficientes para que el intrón escape a la reacción desramificadora de la enzima Dbr por lo que el debranching no puede realizarse, finalmente, el extremo 3' que se encuentra río abajo del sitio de ramificación es degradado por exonucleasas para generar un RNA circular estable (Fig. 6E).

3.9.2. Posibles funciones de los circRNAs en la regulación génica.

Los circRNAs pueden actuar como esponjas de miRNAs

La gran mayoría de los RNAs circulares formados por backsplicing se localizan en el citoplasma, sin embargo, aún no se ha reportado que estos se asocien con ribosomas y puedan ser traducidos, por el contrario, se sugiere de acuerdo a los estudios que se han realizado, que los circRNAs son más estables que el mRNA y compiten en el citoplasma por los sitios de unión propios del mRNA para regular la expresión génica (Jeck *et al.*, 2013; Guo *et al.*, 2014). Uno de los circRNAs que apoyan este modelo es *ciRS-7* el cual actúa como esponja de miR-7 (Fig. 7A). Este RNA circular se

produce por el transcrito antisentido del gen *CDRI* y se expresa en el cerebro de humanos y ratones. Además, contiene más de 60 sitios blanco conservados para miR-7 y ha sido localizado en el citoplasma. Los sitios blanco para miR-7 le confieren la capacidad de unirse hasta a 20,000 moléculas (miR-7) por célula, lo cual tiene un efecto en la traducción ya que no permite que miR-7 se una a sus sitios blanco en el mRNA (Memczak *et al.*, 2013; Guo *et al.*, 2014).

Los RNAs circulares regulan la transcripción en cis

A pesar de que, como se mencionó anteriormente, la mayoría de los RNAs circulares se localizan en el citoplasma, los RNAs circulares que contienen intrones se localizan en el núcleo. Se cree que la retención de estos circRNAs en el núcleo es un mecanismo similar al que ocurre con los RNAs lineales que contienen intrones (Chen, 2016). Los ciRNAs de los que se había hablado anteriormente, tienen pocos sitios de unión a miRNAs y se acumulan en el núcleo, esto sugería que tenían una función distinta a otros RNAs circulares. Algunos ciRNAs que se expresan abundantemente como *ci-ankrd52* y *ci-sirt7* interactúan con el complejo de elongación de la RNA polimerasa II (Fig. 7B). Interesantemente la depleción de estos ciRNAs causa una disminución en los niveles de transcripción de sus genes correspondientes (*ANKRD52* y *SIRT7*), lo cual sugiere que estos RNAs circulares promueven la transcripción de la polimerasa II de sus genes parentales (Zhang *et al.*, 2013).

Este tipo de regulación de la transcripción fue apoyado por otro estudio en donde por medio de ensayos de inmunoprecipitación se estudiaron a los RNAs no codificantes asociados a la RNA polimerasa II (Li *et al.*, 2015). Interesantemente, se encontraron RNAs circulares que además de contar con secuencias exónicas también contienen intrones. Esta nueva clase de circRNAs se nombraron EIciRNAs. El knockdown de EIciRNAs como *EIciEIF3J* y *EIciPAIP2* redujeron la transcripción de sus genes parentales. Ambos RNAs circulares interaccionan con los promotores de sus genes codificantes además de que interactúan con el snRNP U1 ya que las porciones intrónicas que los conforman cuentan con secuencias de unión al snRNA U1 (Fig.

7C). Cuando se bloquean las interacciones RNA-RNA, la interacción de los EICI RNAs con la polimerasa II disminuye. Esto subsecuentemente reduce la transcripción del gen *PAIP2* que codifica para la proteína 2 que interactúa con una proteína de unión a poli(A) y *EIF3J* que codifica para el factor de iniciación de la traducción *3J* en eucariotas. En conjunto, estos resultados sugieren que algunos RNAs circulares nucleares participan en la regulación de la transcripción. Sin embargo, los mecanismos mediante los que esta regulación se lleva a cabo aún se desconocen.

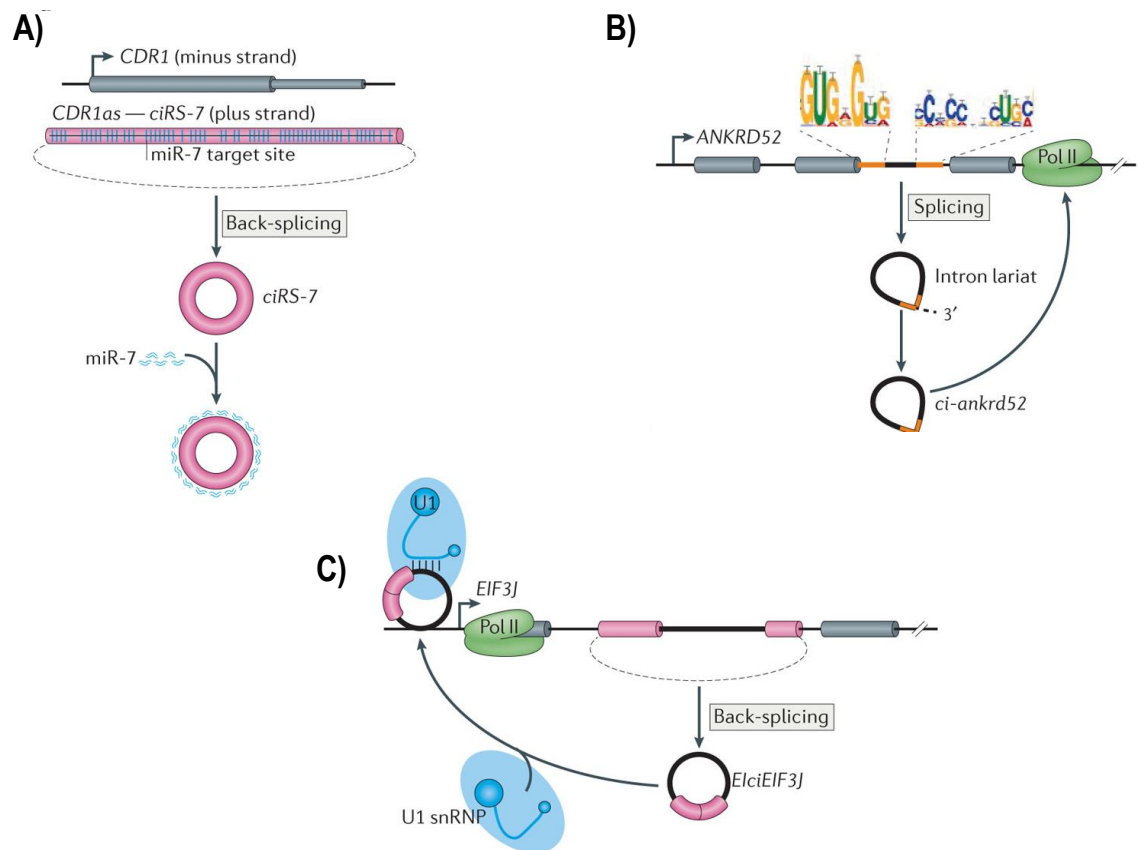


Figura 7. Posibles funciones de los circRNAs. A) El circRNA *ciRS-7* se produce por backsplicing del transcrito antisentido del gen *CDR1*. *CiRS-7* actúa como esponja de miR-7 y se localiza en el citoplasma. B) El RNA circular intrónico *ci-ankrd52* proviene del segundo intrón del gen *ANKRD52* y para escapar al debranching necesita de secuencias consenso cerca del sitio de splicing 5' y del sitio de ramificación. *Ci-ankrd52* se acumula en el núcleo y promueve la transcripción de la RNA polimerasa II de su gen parental. C) El RNA circular *EICI EIF3J* formado por backsplicing interactúa con el snRNP U1 y el promotor de su gen parental para promover la transcripción. Figura tomada de Chen, 2016.

3.9.3. *Entamoeba histolytica*: organismo de estudio

El patógeno gastrointestinal *Entamoeba histolytica* es el agente causante de la amebiasis, enfermedad que es una amenaza para la salud global ya que se traduce en aproximadamente 100,000 muertes cada año (World Health Organization, 1997). La virulencia de *E. histolytica* se atribuye generalmente a su capacidad para destruir los tejidos a través de la adherencia, matando a la célula huésped y la proteólisis de la matriz extracelular (ECM), aunado a la expresión de un gran conjunto de factores de virulencia (Faust y Guillen, 2012). Las infecciones asintomáticas por *E. histolytica* son comunes, solo aproximadamente entre el 10 y 20% de los individuos infectados presentan síntomas de amebiasis invasiva (Pearson y Singh, 2010). Este organismo tiene un ciclo de vida relativamente simple (Fig. 8), el cual consiste de dos estadios, el trofozoito que es la forma patogénica móvil que pueden invadir múltiples órganos y el quiste que es la forma infectiva y que cuando es ingerido a través de agua o comida contaminada enquistado en el lumen del intestino y produce trofozoitos que terminan de colonizar el intestino mediante la adhesión a las mucinas en donde se alimentan de bacterias de la flora intestinal y se dividen (Faust y Guillen, 2012).

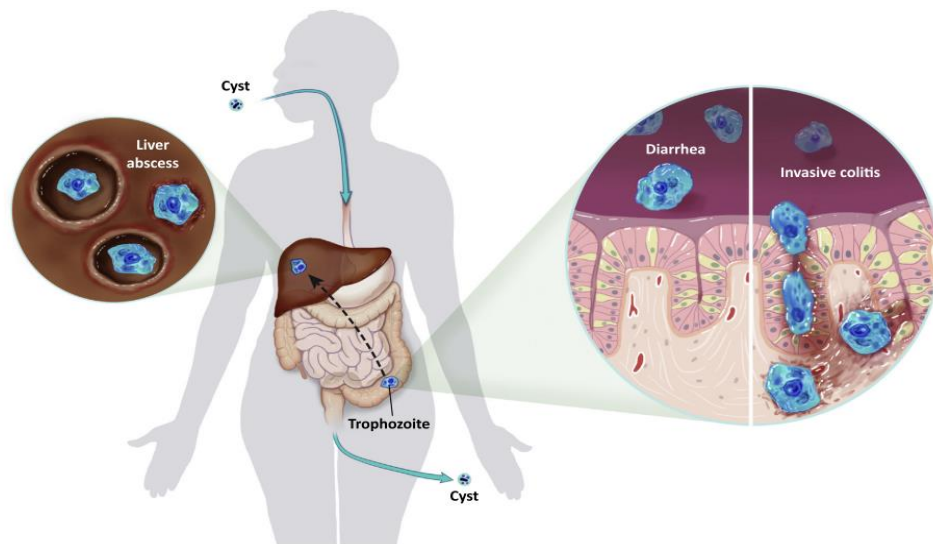


Figura 8. Modelo del ciclo de vida y patogénesis de *E. histolytica*. La infección ocurre después de la ingestión de quistes de *E. histolytica*, seguido del desenquistamiento, los trofozoitos colonizan el intestino grueso. Tanto los quistes como los trofozoitos se encuentran en las heces de individuos infectados. La colonización de *E. histolytica* puede ser asintomática o producir diarrea. Los trofozoitos pueden invadir y dañar al intestino grueso lo cual puede resultar en úlceras y síntomas de disentería. Los trofozoitos que se propagan fuera del intestino producen abscesos que resultan fatales. Figura tomada de Ralston, 2015.

3.9.4 Splicing en *Entamoeba histolytica*

El estudio de *E. histolytica* entró a una nueva etapa después de la secuenciación del genoma de la cepa virulenta HM1:IMSS, este genoma se caracteriza por su alto contenido de adeninas y timinas (75.9%) y por la abundancia de secuencias repetitivas de DNA (Faust y Guillen, 2012). El genoma de 20.8 Mb contiene 8201 genes (tamaño promedio de 1260 pb), de los cuales ~24% contienen intrones. Se han predicho entre 2089 -4328 intrones con un promedio de 74.1 bp (Willhoeft et al., 2001; Loftus et al., 2005; Lorenzi et al., 2010; Hon et al., 2012), que presentan la secuencia conservada GUUUGUU en el sitio de splicing 5' y la secuencia AUG en el sitio de splicing 3' (Willhoeft et al., 2001; Davis et al., 2007; Hon et al., 2012). Por medio de secuenciación masiva del transcriptoma poliadenilado de *E. histolytica*, se definieron 7312 genes modelo bona fide (Hon et al., 2012), 48% de estos genes originan transcritos con uniones exónicas alternativas, sugiriendo el uso de sitios de splicing 5' y 3' alternativos. Además, el 17% de los genes modelo presentaron retención intrónica, los cuales correlacionaron con la abundancia del mRNA, sugiriendo que este evento probablemente ocurre en los transcritos más abundantes (Hon et al., 2012). El sitio de ramificación solo ha podido identificarse *in silico* y la secuencia consenso es YNYYRAY (Willhoeft et al., 2001) que a diferencia de otros protozoarios no es una secuencia conservada (Davis et al., 2007).

4. ANTECEDENTES

Los análisis de transcriptoma de RNAs no poliadenilados en conjunto con técnicas bioquímicas y bioinformáticas específicas, permitieron el descubrimiento de un extenso número de RNAs circulares en mamíferos lo cual incrementó el número de familias de RNAs no codificantes (Chen y Yang, 2015). Sin embargo, se creía que estos circRNAs provenían de errores durante el splicing, siendo hasta hace poco que se encontró que los circRNAs son moléculas abundantes, conservadas y diversas (Lasda y Parker, 2014). A pesar de ello, aún es un misterio como es que se lleva a cabo la biogénesis, regulación y las posibles funciones de estos RNAs circulares (Barret *et al.*, 2015). El estudio de los circRNAs gradualmente se ha convertido en uno de las áreas más sobresaliente dentro del campo de la biología molecular (Qu *et al.*, 2015). La expresión de estas moléculas es ubicua en eucariontas particularmente en metazoos (Salzman, 2016), sin embargo, se han identificado RNAs circulares en otros organismos que divergieron hace más de un billón de años (Wang *et al.*, 2014).

Recientemente, se encontró la presencia de RNAs no codificantes pequeños en *E. histolytica*, como microRNAs (Mar-Aguilar *et al.*, 2013) y una población de RNAs con una longitud de 27 nt que cuentan con un extremo 5'-polifosfatado y un extremo 3'-OH que se han encontrado asociados a una proteína AGO (ArGOnauta) de *E. histolytica* lo que sugiere que participan en la regulación génica de este organismo (Zhang *et al.*, 2011). También se encontraron RNAs circulares del espaciador transcrito externo 5' (5'ETS) de los genes de rRNA y que contiene sitios importantes para el procesamiento del pre-rRNA. Se observó, por ejemplo, que su acumulación provoca la acumulación de moléculas no procesadas de pre-rRNA, por lo que se cree que los etsRNAs participan en la inhibición del procesamiento del pre-rRNA y no son un producto destinado a degradación (Gupta *et al.*, 2012). Interesantemente, Mendoza-Figueroa (2016) encontró otra especie de RNAs circulares, parecidas a las encontradas en eucariotas superiores, sin embargo, estos RNAs circulares están constituidos por la secuencia intrónica completa, por lo que se les dio el nombre de flicRNAs (RNAs circulares intrónicos de secuencia completa). Este hallazgo es novedoso debido a esta característica, ya que Zhang *et al.*, (2013) reportaron otras moléculas circulares de secuencia intrónica los cuales no contienen el extremo río

abajo del sitio de ramificación y cuentan con la unión 2'-5' que se forma durante el procesamiento del RNA. Por su parte los flicRNAs presentan la característica de estar unidas por los sitios de splicing 3' y 5' y se originan en un evento co-transcripcional, ya que al inhibir la transcripción con Actinomicina D las variantes de splicing de su gen parental dejaron de detectarse, no así el RNA circular, el cual permaneció por tiempos más largos, aunque finalmente este también dejó de detectarse. Aunado a esto se realizaron experimentos para determinar que este RNA no es autoescindible, pero poco se sabe acerca de los factores están involucrados en su biogénesis y la regulación de la síntesis de una molécula con tales características.

Estudios sobre los complejos tempranos de splicing en *E. histolytica* permitieron identificar diversas proteínas que participan en este paso del procesamiento del RNA, una de ellas el factor auxiliar de U2, U2AF84 (MW 84 kD) (Valdés *et al.*, 2014), el cual se creía era ortólogo de U2AF65 de humano. Sin embargo, Morales-Tovar (2015), a través del silenciamiento de dicha proteína, encuentra que existe menor retención intrónica, concluyendo que este factor participa durante la formación de los complejos tempranos de splicing propiciando la retención intrónica. Posteriormente se realizaron análisis bioinformáticos y se encontró que a pesar de que U2AF84 tenía dominios y motivos conservados en otros factores auxiliares de U2, contiene además un dominio KH-QUA2 similar al encontrado en proteínas de unión a RNA de la familia STAR como SF1 y Quaking, dominio que participa directamente en la inhibición del evento de splicing en *E. histolytica* (Martínez-Baltazar, 2016). Debido a que los flicRNAs parecieran ser producto del procesamiento del RNA, el estudio del efecto de U2AF84 y una mutante sin el dominio KH-QUA2 sobre la biogénesis de este RNA circular intrónico ayudaría a elucidar más aspectos sobre la biogénesis de estos RNAs circulares.

Según el modelo propuesto por Zhang *et al.* (2013) la enzima Dbr1 no puede realizar la hidrólisis del enlace 2'-5' por las secuencias consenso cerca del sitio de splicing 5' y el sitio de ramificación del mRNA de *ci-ankrd52*. De forma similar, el intrón de *Rabx13*, modelo de este trabajo (que codifica para una GTPasa pequeña), también tiene una secuencia rica en GU cerca del sitio de splicing 5'. El estudio del efecto de

esta enzima y una mutante sin el carboxilo terminal, la cual ya ha sido reportada que la incapacita para realizar la reacción de desramificación (Montemayor *et al.*, 2014), sobre la biogénesis de flicRX13 (flicRNA del gen *RabX13*) permitirá ampliar el conocimiento acerca de este mecanismo y posteriormente el de la regulación de la expresión génica en *E. histolytica*, parásito de importancia clínica.

5. JUSTIFICACIÓN

Recientemente se describieron RNAs intrónicos circulares de longitud completa. También se demostró que éstos son productos del procesamiento de pre-mRNA, que son más estables que las variantes de splicing relacionadas y aparentemente ocurren en alguna reacción post-splicing a partir del lariat. El hecho de que las únicas especies de RNA circulares con una estructura similar a los flicRNAs amebianos se originan por 1) circularización de intrones de longitud completa, o 2) ligación de intrones lineales producidos por reapertura de exones procesados, mecanismos sólo descritos en intrones autocatalíticos del Grupo I (ribozimas autocatalíticas que interrumpen transcritos de mRNA, tRNA y rRNA en bacterias, eucariontes inferiores y plantas superiores) y Grupo II (presentes en rRNA, tRNA y mRNA de organelos de hongos, plantas y protistas, y de mRNAs bacterianos), sugiere que la biogénesis de los flicRNAs amebianos es distinta a la de los circRNAs de mamíferos. Para atender esta interrogante nos planteamos la siguiente hipótesis.

6. HIPÓTESIS

Si flicRX13 proviene del procesamiento del RNA, la sobreexpresión de las proteínas U2AF84 y Dbr1 pudiese elucidar si su biogénesis es un evento co-splicing o post-splicing, respectivamente.

7. OBJETIVOS

7.1. Objetivo General

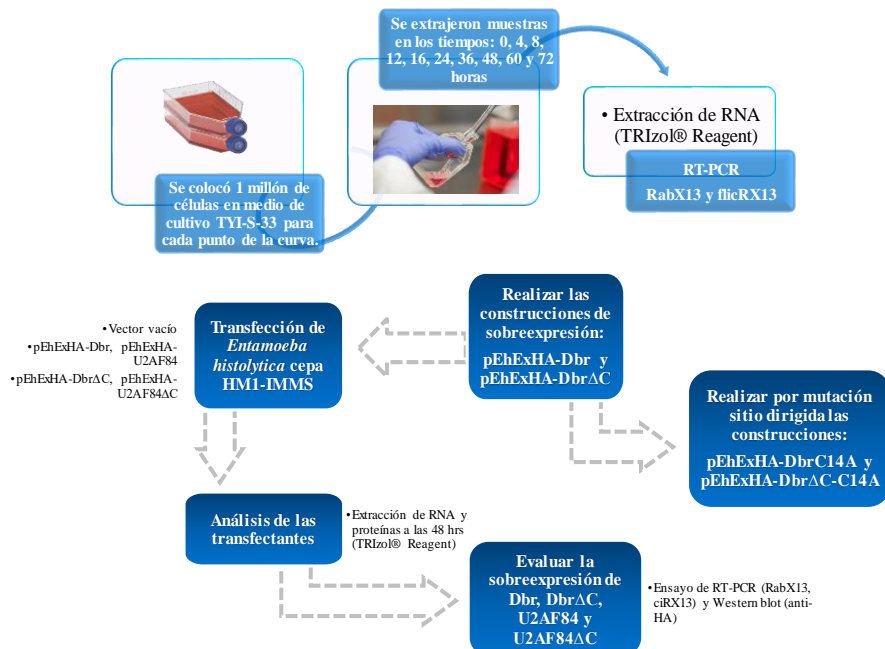
Identificar si la biogénesis de flicRX13 ocurre durante el procesamiento del pre-mRNA analizando la cinética de su expresión respecto a los productos de su gen parental, así como cuando se sobreexpresan las enzimas Dbr1 y U2AF84 y sus dominantes negativas.

7.2. Objetivos Específicos

- Determinar la expresión de flicRX13 respecto a las otras variantes de splicing de *RabX13* mediante una cinética de crecimiento de *E. histolytica*.
- Realizar las construcciones de sobreexpresión de Dbr1 silvestre y una mutante sin el carboxilo terminal (pEhExHA-Dbr1 y pEhExHA-Dbr1 Δ C) que se usarán en ensayos de splicing in vivo para investigar el siguiente objetivo particular.
- Realizar la mutación de la cisteína posición 14 por una alanina en las construcciones de sobreexpresión de Dbr1 y Dbr1 Δ C (pEhExHA-Dbr1C14A y pEhExHA-Dbr1 Δ C-C14) que se usarán posteriormente en ensayos de splicing in vivo.

8. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

Para cumplir el objetivo general se realizó una cinética de crecimiento de trofozoitos de la cepa HM1:IMSS y durante los distintos tiempos se analizaron las variantes de splicing del gen *RabX13* y el RNA circular intrónico del mismo, por RT-PCR. Para determinar algunos factores involucrados en la biogénesis de flicRX13 se sobreexpresaron las versiones silvestre y deficiente de la enzima desramificadora Dbr1 en trofozoitos de la cepa HM1:IMSS. Para verificar que flicRX13 ocurre durante un evento post-splicing se sobreexpresaron las versiones; silvestre y deletada del carboxilo terminal de U2AF84: este factor de splicing se recluta durante la formación del complejo E y funciona inhibiendo parcialmente el splicing produciendo variantes de retención intrónica; la versión deletada del carboxilo terminal de U2AF84 funciona como activador de splicing. Esto con la finalidad de elucidar la participación de ambas proteínas y sus mutantes en la formación de este RNA circular intrónico y finalmente para realizar un estudio más completo sobre la función de Dbr1 en la circularización del intrón de *RabX13*, se realizó una mutación en la cisteína posición 14 por una alanina en ambas construcciones de sobreexpresión. Ya ha sido reportado que C14 es importante para la función adecuada de esta enzima, por lo que la mutación nos permitirá elucidar como es que Dbr está involucrada en la biogénesis de flicRX13. Lo anterior se esquematiza en la siguiente Figura.



8. MATERIALES Y MÉTODOS

8.1 Cultivo de trofozoitos de *Entamoeba histolytica* para la cinética de crecimiento

Trofozoitos de la cepa HM1:IMSS de *E. histolytica* se crecieron de forma axénica en medio TYI-S-33 (*Trypticase-yeast extract-iron serum*; Diamond et al., 1995) suplementado con Suero Bovino Adulto Inactivado (Microlab Laboratorios, No. de catálogo SU140) al 10% y Penicilina-Estreptomicina (Gibco, No. de catálogo 15140-148) al 1X en cajas de cultivo (Corning, No. de catálogo 430720). Los cultivos se incubaron a 37°C hasta que alcanzaran la fase exponencial de crecimiento (~80% de confluencia) se contó el número de células usando la cámara de Neubauer y se colocó 1 millón para cada punto de la cinética, posteriormente las células se colectaron al incubar las cajas en un baño de hielo-agua alrededor de 15-20 min, en los tiempos 0, 4, 8, 12, 16, 24, 36, 48, 60 y 72 horas. La suspensión celular se centrifugó a 1000 rpm durante 5 min a 4°C, se eliminó el medio de cultivo y los trofozoitos fueron utilizados inmediatamente para extraer RNA.

8.2 Extracción de RNA

Se extrajo RNA total utilizando el reactivo TRIzol (Invitrogen, No. de catálogo 15596-018), las muestras se agitaron y se centrifugaron a 12000 xg durante 10 minutos a 4°C, la fase más clara se transfirió a un tubo nuevo y se agregaron 200 µL de cloroformo, se agitó nuevamente durante 15 segundos y se incubó a temperatura ambiente durante 3 minutos para posteriormente centrifugarse a 12000 xg durante 15 minutos a 4°C, se eliminó el sobrenadante y el precipitado se re suspendió en 225 µL de buffer de extracción SDS 1X [SDS 0.5%, EDTA 1 mM (pH 8), Tris-HCl 20 mM (pH 7.5)], luego se agregó acetato de sodio pH 5.3 a una concentración final de 0.3 M, dos volúmenes de fenol-cloroformo-isoamílico (25:24:1) y se mezcló en vortex durante un minuto, posteriormente se centrifugó a 12000 xg durante 3 minutos a 4°C y se recuperó la fase acuosa, a esta se le agregó nuevamente acetato de sodio a una concentración final de 0.3 M, 2.5 volúmenes de etanol absoluto, se mezcló y el RNA se dejó precipitando a -70°C durante 16 horas. Posteriormente se centrifugó a 12000

xg durante 15 minutos a 4°C, se eliminó el sobrenadante y el precipitado se lavó con 300 µL de etanol 70% y nuevamente se centrifugó a 7500 xg durante 15 minutos a 4°C. El precipitado se dejó secar a temperatura ambiente y se re suspendió en 75 µL de agua miliQ estéril. Para una disolución completa del RNA, las muestras se incubaron a 55°C durante 5 minutos. La integridad del RNA se verificó en un gel de agarosa 2% y se cuantificó espectrofotométricamente. Posteriormente las muestras de RNA se trataron con DNasa I (Sigma-Aldrich No. De catálogo 4716728001), incubando durante 20 minutos a 25 °C, luego las muestras se llevaron a un volumen final de 200 µL con agua miliQ estéril y se agregó un volumen de fenol-cloroformo-isoamílico (25:24:1), se agitaron en vortex durante 30 segundos y se centrifugaron a 13000 rpm durante 3 minutos, posteriormente se recuperó la fase acuosa y a esta se le agregó un volumen de cloroformo-isoamílico (25:1), se repitió la agitación en vortex y la centrifugación. Se recuperó la fase acuosa y se agregó a cada muestra 1 µL de glicógeno (5 mg/mL) y un volumen de isopropanol frío. El RNA se precipitó a -70°C durante 16 horas. Posteriormente las muestras se centrifugaron a 13000 rpm durante 15 minutos a 4°C se eliminó el sobrenadante y el precipitado se lavó con 300 µL de Etanol 70 %, se centrifugó nuevamente bajo las mismas condiciones, se eliminó el sobrenadante y el precipitado se dejó secar a temperatura ambiente hasta que se evaporó el etanol después las muestras se re suspendieron en agua miliQ y se cuantificaron espectrofotométricamente.

8.3 RT-PCR

Las reacciones de retro transcripción se llevaron a cabo utilizando la enzima M-MLV (Invitrogen, No. de catálogo 28025-021) y siguiendo el protocolo descrito por el proveedor. Como molde se utilizaron 9 y 1.5 µg de RNA total para *flicRX13* y *RabX13*, respectivamente. El RNA se mezcló con 1 µL del respectivo oligonucleótido reverso 10 µM (*Rab2BSas* y *Rab2R* respectivamente, Tabla 1), 1µL dNTP's 10 mM y H₂O_{mQ} estéril llegando a un volumen final de 13 µL. Las reacciones se incubaron a 65°C (para *flicRX13* esta incubación se realiza a 75°C), durante 5 min y se colocaron en hielo por 2 min más. En seguida, se agregaron 4µL del 5X First Strand Buffer (Invitrogen, No. de catálogo 28025-021) y 2µL de DTT 0.1 M, la mezcla se agitó

suavemente y se incubó a 37°C por 2 min. Posteriormente, se agregaron 200 unidades (1µL) de la enzima M-MLV, la mezcla se agitó suavemente, y se incubó una vez más a 37°C durante 1 hora.

Tabla 1. Oligonucleótidos y condiciones de amplificación. Se indica el nombre y número de acceso (entre paréntesis) de los genes analizados, el nombre de los oligonucleótidos sentido (indicado como s) y antisentido (as), así como su secuencia. También se muestran las condiciones de amplificación para cada gen utilizando el par de oligonucleótidos respectivos, así como las concentraciones de MgCl₂ utilizadas. Se indica el tamaño de los respectivos amplicones. US: *unspliced*, S: *spliced*, flicRX13: Circulo de *RabX13*.

Gen	Oligonucleótido	Secuencia 5' – 3'	MgCl ₂ (mM)	Condiciones de amplificación	Tamaño del amplicón
EhRabX13 (EHI_065790)	Rab2F	cgttggtggagactcttcagttgg	3	35 ciclos de 94°C/45'', 60°C/45'', 72°C/1'	US = 510pb S = 374 pb
	Rab2R	gaccatttcagttgaaacagttc			
	Rab2BSas	gatgagatgagataagatttatc	3	35 ciclos de 94°,45''; 53°,45''; 72°,30''	flicRX13 = 116 pb
	Rab2BSs	ccgaattactgtcttgaaaatc			
	NBRX13 (se utilizó con el oligo Rab2BSs)	ctttaaagtatttaaaacaacactaa ataaaagttagtttatattatt	3	35 ciclos de 94°,45''; 53°,45''; 72°,30''	flicRX13 = 79 pb
EhDbr1 (EHI_062730)	EhDbrs	atggcaactgaacaatacaac	2	35 ciclos de 95°C/45'', 58°C/45'', 72°C/1'	Dbr1ΔC = 882 pb
	EhDbras	gtcaggggaattgtgctttatttg			
	XhoI-asDbrF (se utilizó con el oligo EhDBRs)	gtaactcgagtcaatggttgcaaaa caaatgtaa	2		Dbr1 =1108 pb
	DbrC14A-s	cgttggtgctgttcacgtgtaatacagag	2	18 ciclos de 95 °C/ 30'', 55 °C/ 1', 68 °C/ 8'	Dbr1 = 6900 pb Dbr1ΔC = 7116 pb
	DbrC14-as	ctctgtatttaccatgaacagcacca acg			
EhRNA Polimerasa II (EHI7A_158420)	RNAPII-s	gatccaacatatcctaaaacaaca	1	35 ciclos 94 °C/ 45'', 60 °C/ 45'', 72 °C/ 45''	210 pb
	RNAPII-as	tcaattatttctgacccgtcttc			

Finalmente, las muestras se incubaron durante 10 min a 70°C, y el cDNA obtenido se usó inmediatamente o fue almacenado a -20°C hasta su uso. Las reacciones de RT de flicRX13 se hicieron en presencia de 5 µM de Actinomicina D, ésta se agregó inmediatamente después de la incubación inicial a 75 °C. Las reacciones de PCR se llevaron a cabo de la siguiente manera: Se utilizó como molde el 10% de la reacción respectiva de RT, 3 mM de MgCl₂ (Tabla 1), 1X del buffer de PCR 10X (Invitrogen, No. de catálogo 11615-010), 0.2 µM de los oligonucleótidos sentido y antisentido (Rab2BSs y NBRX13 para flicRX13 / Rab2F y Rab2R para *RabX13*), 1.25 unidades de la Taq DNA Polimerasa (Invitrogen, No. de catálogo 11615-010) y H₂O_{mQ} estéril a un volumen final de 25 µL. Como control de carga se realizó bajo las mismas condiciones la RT-PCR para la RNA Polimerasa II. Como control negativo, en cada uno de los experimentos se realizaron reacciones de PCR utilizando como molde al RNA sin reacción previa de RT. Los productos de PCR obtenidos se analizaron en geles de agarosa o urea-acrilamida 10% para flicRX13, los cuales fueron teñidos con bromuro de etidio para la visualización de los amplicones. Los oligonucleótidos, así como las condiciones de PCR se indican en la Tabla 1.

8.4 Construcción de los plásmidos de sobreexpresión

Se realizó la amplificación del gen que codifica a la proteína Dbr de 354 aa (Dbr *wild-type*) y los primeros 295 aa de esta misma (DbrΔC) a partir de DNA genómico para su clonación en el plásmido de sobreexpresión pEhExHA de *E. histolytica* (el cual confiere resistencia al antibiótico G418) con los oligonucleótidos y las condiciones que se muestran en la Tabla 1.

El vector de expresión y los amplicones se cortaron usando las enzimas de restricción SmaI y XhoI (NEB No. de catálogo #R0141L y #R0146L), luego se realizó la ligación usando una relación vector: inserto 1:3 en 4 µL de Buffer de Ligación 5x con una unidad de Ligasa T4 (Invitrogen No. de catálogo 15224-017) en un volumen final de 20 µL, la reacción se dejó incubando toda la noche a 16 °C. La ligación se empleó para transformar bacterias competentes *E. coli* cepa TOP10, se mezclaron suavemente 200 µL de la cepa y 10 µL de la ligación y se incubaron en hielo por 20

min, luego se dio un choque térmico a 42 °C por 45 segundos y nuevamente se incubó en hielo por 2 minutos.

Finalmente, se adicionaron a la mezcla 800 µL de medio súper óptimo (SOB) y se dio un tiempo de recuperación a 37 °C durante 1 hora con 20 minutos en agitación. Se tomó una alícuota de 200 µL para espatular en cajas con medio solido Luria-Bertani con ampicilina (100 µg/mL), estas fueron incubadas toda la noche a 37 °C. Pasando este lapso las clonas seleccionadas se sembraron en tubos con 3 mL de medio Luria-Bertani con ampicilina (100 µg/mL) y se incubaron en agitación toda la noche a 37 °C. Las bacterias se colectaron por centrifugación (12,000 rpm / 1 minuto) y se extrajo el DNA plasmídico por miniprep acorde a la técnica descrita por Del Sal *et al* (1998), se seleccionaron las posibles clonas positivas en base al retraso en la migración respecto al control negativo en un gel de agarosa 1% y se realizó la digestión de estos con las enzimas de restricción BglII y XhoI (NEB No. de catálogo #R0144S y #R0146L) para la liberación de los fragmentos. Se seleccionó una clona positiva de cada construcción llamadas pEhExHA-Dbr y pEhExHA-DbrΔC para extraer DNA plasmídico usando el Plasmid Midi Kit (QIAGEN No. de catálogo 12143) y posteriormente fueron secuenciadas.

8.5 Transfección de los plásmidos de sobreexpresión en trofozoitos de *E. histolytica*

La transfección de la cepa HM1:IMSS de *E. histolytica* se realizó en una placa de 12 pozos, en donde se sembraron ~750,000 amebas por pozo en los cuáles se adicionó medio TYI-S-33 tibio y se incubaron a 37 °C en presencia de CO₂ durante 30 minutos para que se adhirieran a la superficie, durante este lapso se realizaron en esterilidad las mezclas de transfección, en la primera se agregaron 5 µg de los plásmidos control (pEhExHA vacío) y de sobreexpresión (pEhExHA-Dbr1, pEhExHA-Dbr1ΔC, pEhExHA-U2AF84 y pEhExHA-U2AF84ΔC) , 10 µL de PLUS reagent (Invitrogen No. de catálogo 11668027) y se llevó a un volumen de 50 µL añadiendo el medio de transfección (Opti-MEM suplementado con 1 mg/mL ácido ascórbico y 5 mg/mL L-cisteína pH 6.8), en la segunda mezcla se agregaron 20 µL de Lipofectamina 2000

(Invitrogen No. de catálogo 11668027) y 30 μ L de medio de transfección, ambas mezclas se incubaron por separado 15 minutos a temperatura ambiente, posteriormente se colocaron en un solo tubo de reacción y se incubaron nuevamente bajo las mismas condiciones mencionadas anteriormente, luego se agregaron 400 μ L más de medio de transfección para tener un volumen final de 500 μ L. Transcurridos los tiempos de incubación se retiró el medio TYI-S-33 y se colocó la mezcla final de transfección adicionando lentamente gota a gota sobre la monocapa de amebas de cada pozo, la placa se incubó nuevamente ahora durante 5 horas. Finalmente, la placa se colocó en un baño de hielo-agua durante 15 minutos y se colectó el medio con las amebas, las cuales se sembraron en tubos de 7 mL con medio TYI-S-33 y se incubaron nuevamente en las mismas condiciones ahora durante 24 horas.

Posteriormente se inició la selección con el antibiótico G418 (Life technologies No. de catálogo 11811098) a una concentración de 1 μ g/mL, la concentración fue aumentando conforme los tubos alcanzaron una confluencia de 80%, hasta llegar a una concentración de 10 μ g/mL de antibiótico en las transfecciones estables, mientras que en las transfecciones transitorias de la construcción pEhExHA-Dbr Δ C solo se colocó 1.5 μ g/mL de antibiótico y se incubaron durante 48 horas. Una vez que se establecieron los cultivos a las concentraciones de antibiótico deseadas, se expandieron en cajas de 25 cm² y se recolectaron las muestras después de 48 horas de incubación para la posterior extracción de RNA y proteínas.

8.6 Extracción de proteínas

Los extractos de proteína total se obtuvieron por dos métodos; el primero con buffer de lisis (Tris HCl 50 mM pH 7.5, NaCl 150 mM, Triton X-100 1% e inhibidor de proteasas E-64 10 μ M) y el segundo acorde al protocolo de extracción de proteínas con TRIzol (Invitrogen No. de catálogo 15596-026).

8.7 Western Blot

Se emplearon 20 µg proteínas y fueron separadas en un gel de poliacrilamida SDS-PAGE al 8 % y 10% para la identificación de HA-U2AF84, HA-U2AF84ΔC y HA-Dbr, HA-DbrΔC respectivamente, se realizó la transferencia a una membrana de nitrocelulosa de 0.45 µm de diámetro (Trans-Blot Transfer Medium, de BIORAD) bajo las siguientes condiciones: 400 V, 350 mA, 1 hora en buffer de transferencia (Tris-glicina). Posteriormente se verificó la transferencia de la membrana con rojo de Ponceau. En seguida se procedió a la realización del bloqueo de la membrana con PBS 1x-leche al 5%, durante 1 hora en agitación suave a 25 °C. Se retiró el exceso de leche con PBS 1x. Inmediatamente después, la membrana fue incubada con la preparación del anticuerpo primario (anti-HA Covance No. de catálogo MMS-101R dilución 1:25000, en PBS 1x) durante 3 horas. La membrana se lavó 3 veces durante 10 min con PBS 1x-Tween20 0.05% y se realizó la incubación con el anticuerpo secundario (goat anti-mouse IgG-HRP SC2768 de Santa Cruz Biotechnology Inc. dilución 1:10000 en PBS 1x-Tween20 0.05%) durante 1 hora a temperatura ambiente en agitación suave. Una vez que el proceso anterior fue realizado se realizaron tres lavados con PBS 1x-Tween20 0.05%. La membrana se lavó con PBS 1x 3 veces durante 1 min y se procedió al revelado. El proceso de revelado fue realizado por quimioluminiscencia usando el kit “Western lightning Plus-ECL” (PerkinElmer, Inc. No. de catálogo NEL103001EA). Como control de carga se empleó el anticuerpo primario anti-Histona H3 de conejo (Meckmillipore No. de catálogo #97275), a una dilución 1:1000 y el anticuerpo secundario Ig de cabra anti-conejo (Zymax No. de catálogo AQ132P) a una dilución 1:5000, bajo los mismos tiempos de bloqueo incubación y lavado.

8.8 Mutagénesis sitio dirigida por PCR

A partir de las construcciones que se habían obtenido anteriormente; pEhExHA-Dbr y pEhExHA-DbrΔC se realizó una re-transformación con 50 ng de cada una en la cepa *dam*⁺ DH5α de *E. coli*, posteriormente se extrajo DNA plasmídico por miniprep (Del Sal *et al.*, 1998) y este se empleó para realizar una PCR con los oligonucleótidos

DbrC14A-s y DbrC14A-as que contenían la mutación deseada bajo las condiciones de amplificación mostradas en la tabla 1, usando 125 ng de cada oligonucleótido y 50 ng del DNA metilado en una mezcla que contenía; 5 μ L del Buffer de reacción de *Pfu* con $MgSO_4$, 1 μ L de dNTPs 10 mM y 2.5 unidades de la Polimerasa *Pfu* (Invitrogen, No. de catálogo #EP0501). Se realizó la digestión de los productos de PCR con la enzima de restricción DpnI (NEB, No. de catálogo #R0176S) durante 2 horas a 37 °C. Posteriormente 25 μ L del producto de PCR digerido se transformó en la cepa TOP 10 de *E. coli* siguiendo el mismo protocolo de transformación mencionado anteriormente. Se extrajo DNA plasmídico de clonas seleccionadas para finalmente por medio de secuenciación confirmar la mutación.

9. RESULTADOS

9.1 Biogénesis de flicRX13 durante una cinética de crecimiento de *E. histolytica*

Se sabe que flicRX13 es una molécula de RNA circular constituida solamente por el intrón del gen *RabX13* que además posee la unión 5'ss-3'ss. En células tratadas con Actinomicina D flicRX13 sobrevive a sus variantes de splicing relacionadas, pero eventualmente desaparece, lo que sugiere que proviene de splicing. Para corroborar esta hipótesis y determinar la biogénesis de flicRX13 respecto a las variantes de splicing de su gen parental sin alterar ningún parámetro durante el cultivo, se realizó un experimento de splicing in vivo a partir de una cinética de crecimiento de la cepa HM1:IMSS desde 0 hasta 72 h que representa una curva de crecimiento desde fase de eclipse hasta la senescencia. En la Figura 9 podemos observar datos representativos de cuatro experimentos en donde se observa que mientras las variantes de splicing de *RabX13* cambian respecto al tiempo, flicRX13 estuvo presente durante toda la cinética y parece ser más estable. En los primeros tiempos de la cinética se observó un incremento en los niveles del pre-mRNA y las variantes con retención intrónica (pre-mRNA/IR), sin embargo, entre las 8 a las 16 h de crecimiento flicRX13 se mantuvo constante debido a que los niveles de mRNA fueron similares durante este lapso. A las 24 h aun cuando el mRNA aumentó hubo también mayor retención intrónica por lo que los niveles del RNA circular también disminuyeron. En el lapso de las 36 a las 60 h incrementaron los niveles de flicRX13 debido a que los niveles de mRNA también incrementaron y se observó menor pre-mRNA/IR indicando que hay un mayor procesamiento del pre-mRNA. Además, cómo puede observarse, a las 48 h hubo mayor abundancia de mRNA y aunque disminuyó a las 60 h, el RNA circular se acumuló y solo disminuyó cuando a las 72 h nuevamente se incrementaron los niveles del RNA no procesado.

Para mayor claridad, el promedio obtenido para cada variante de splicing de 4 cinéticas de crecimiento se graficaron como fracción porcentual (Gráfica 1). Los resultados son muy similares a los descritos previamente y en resumen se puede

observar que la abundancia del RNA circular incrementó conforme a mayor procesamiento del pre-mRNA/IR y viceversa.

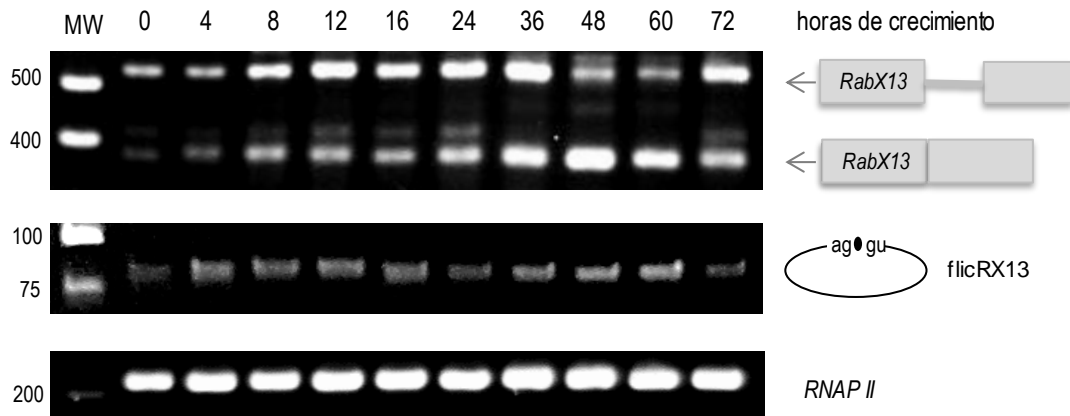
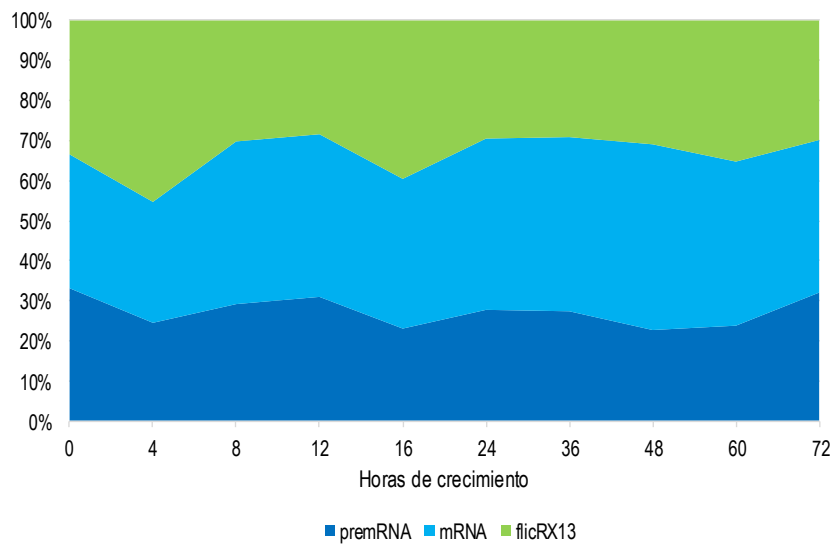


Figura 9. La biogénesis de flicRX13 ocurre durante el procesamiento del RNA. Se analizó la expresión de las variantes de splicing de *RabX13* (pre-mRNA/IR y mRNA), flicRX13 y la RNA polimerasa II durante una cinética de crecimiento de 72 horas de trofozoitos de *E. histolytica*. MW Marcador de peso (pb). A la derecha de la imagen se representan las variantes de splicing del gen *RabX13* y el RNA circular intrónico. La imagen es representativa de 4 experimentos independientes.



Gráfica 1. Abundancia relativa (en porcentaje) de flicRX13 respecto a las variantes de splicing de *RabX13*. La suma del promedio de la proporción molar (IntDen de los productos amplificados obtenidos con el software ImageJ divididos entre su peso molecular) de flicRX13, del pre-mRNA/IR y el mRNA representa el 100% en cada tiempo de la curva de crecimiento. Los valores de flicRX13 se obtuvieron multiplicando la proporción molar por 6 que refleja el input real en las reacciones de retrotranscripción. pre-mRNA/IR, azul oscuro; mRNA, azul claro; flicRX13, verde. Promedio de 4 experimentos.

Estos resultados sugieren que la biogénesis de flicRX13 ocurre durante el proceso de splicing y su abundancia correlaciona inversamente con la abundancia del pre-mRNA/IR y directamente con la abundancia del mRNA. Además, su estabilidad y acumulación sugieren que tiene alguna función durante la vida del parásito.

9.2 Efecto de la sobreexpresión de U2AF84 y U2AF84ΔC sobre la biogénesis de flicRX13

Está claro hasta ahora que la biogénesis de flicRX13 depende del splicing y de la concomitante producción del intrón lariat, sin embargo, no es claro aún si esta ocurre durante el splicing o en eventos post-splicing. Para explorar si es un evento co-splicing realizamos experimentos de splicing in vivo en transfectantes amebianas que sobreexpresan el factor de splicing U2AF84 y una versión sin su dominio KH-QUA2 dentro de su carboxilo terminal, U2AF84ΔC. Se sabe que U2AF84 forma parte del complejo E de splicing pero que a diferencia de su ortólogo humano (U2AF65), ésta inhibe parcialmente el splicing generando variantes IR (con retención intrónica), en tanto que U2AF84ΔC es una activadora del splicing incrementando los niveles de mRNA. Nos preguntamos si la sobreexpresión de estas proteínas tendría algún efecto directo o indirecto en la biogénesis de flicRX13, esperando que cualquier disminución o aumento en el splicing estuviera relacionado directamente con la cantidad de flicRX13. Para este fin, primero confirmamos la sobreexpresión de ambas construcciones por medio de un ensayo de western blot con extractos protéicos totales de las transfectantes seleccionadas a 10 μg/mL de G418. Como se logra apreciar en la Figura 10 se detectaron las bandas correspondientes a las proteínas U2AF84 y U2AF84ΔC etiquetadas con hemaglutinina (HA). Los ensayos de splicing in vivo utilizando el RNA obtenido de estas transfectantes (Fig. 11) mostraron claramente que la sobreexpresión de U2AF84 hizo que la cantidad de pre-mRNA/IR incrementase respecto al vector vacío, siendo este incremento más notorio en las transfectantes seleccionadas a mayor concentración de G418. Sin embargo, los cambios en la expresión de las variantes de splicing provocados por la sobreexpresión de U2AF84 no se vieron reflejados en cambios importantes en la cantidad de flicRX13.

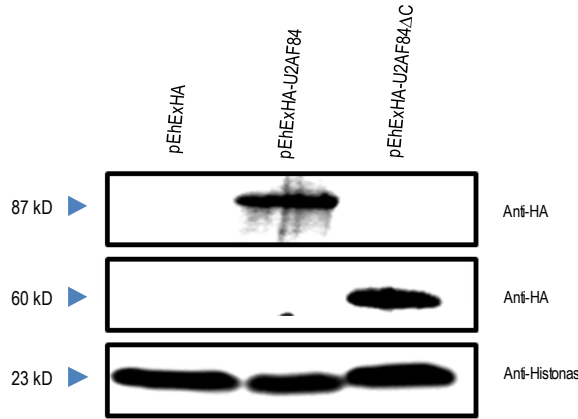


Figura 10. Análisis de la sobreexpresión de U2AF84 y U2AF84ΔC. Western blot de extractos totales de proteínas de los trofozoitos transfectados con pEhExHA vacío, pEhExHA-U2AF84 y pEhExHA-U2AF84ΔC. Las proteínas de fusión se revelaron con un anticuerpo anti-HA. Como control de carga se utilizó un anticuerpo anti-histonas H3.

Cuando se sobreexpresó U2AF84ΔC se observó mayor abundancia en los niveles del mRNA (incluso a mayores concentraciones del agente selectivo no se logró detectar pre-mRNA) los cuales mostraron estar en relación directa con la abundancia del flicRX13.

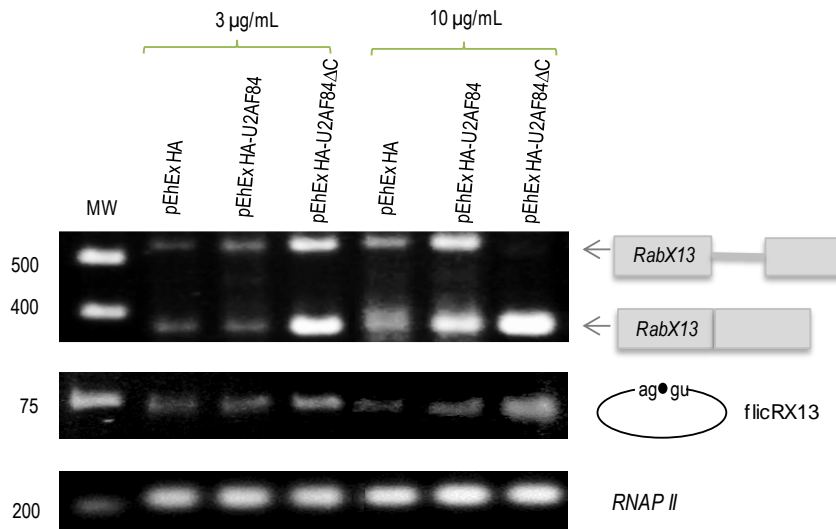


Figura 11. U2AF84 está involucrado en la retención intrónica. Se analizó por medio de RT-PCR la expresión de las variantes de splicing de *RabX13*, flicRX13 y la RNA polimerasa II de los trofozoitos transfectados con vector vacío y con el cDNA de U2AF84 y de U2AF84ΔC. Los transfectantes fueron seleccionados a 3 y 10 μg/mL de G418. Los carriles MW contienen el marcador de peso (pb) y a la derecha se representan las variantes de splicing y el RNA circular intrónico. La imagen es representativa de 2 experimentos independientes.

Estos datos sugieren que la biogénesis del flicRX13, aunque proviene de mayor procesamiento del RNA que resulta en más productos de splicing (mRNA y lariats), no es un producto formado durante el splicing, a diferencia de su molécula precursora, el lariat.

9.3 Efecto de la sobreexpresión de Dbr y Dbr Δ C en trofozoitos de *E. Histolytica* en la formación de flicRX13

La Dbr1 humana ha sido implicada en la biogénesis de *ci-ankrd52* y otros RNAs circulares quienes escapan a la reacción desramificante. Salvo algunas diferencias en su estructura tales RNA circulares son muy semejantes a los flicRNAs amebianos y considerando que flicRX13 seguramente se origina a partir de lariats en eventos post-splicing, nos preguntamos si un mecanismo similar implicaría la participación de Dbr1 amebiana en la biogénesis de flicRX13.

Con la finalidad de elucidar esta interrogante se realizó la sobreexpresión de Dbr y una mutante sin el carboxilo terminal para posteriormente realizar ensayos de RT-PCR monitorizando el RNA circular y las variantes de splicing de *RabX13*. Primero construimos los plásmidos portadores del cDNA de Dbr1 y la Dbr1 deficiente en catálisis (Dbr Δ C).

Confirmamos que los plásmidos extraídos por mini prep de las clonas candidatas contenían el inserto de Dbr por medio de digestión con las enzimas de restricción BglII y XhoI para la liberación de los fragmentos clonados.

En la Figura 12 podemos observar la liberación de ambos insertos del vector de clonación pEhExHA con los pesos moleculares esperados: 996 pb para Dbr Δ C y 1204 pb para Dbr1; estas candidatas positivas se secuenciaron y se analizaron bioinformáticamente verificando que correspondieran a los fragmentos correspondientes (Apéndice A).

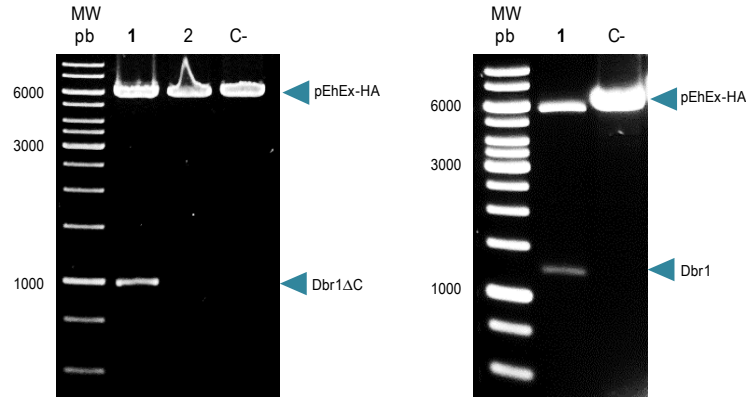


Figura 12. Análisis de restricción de candidatos de proteínas de fusión HA-Dbr1 y HA-Dbr1ΔC. Carril 1, el marcador de peso de 1 kb (MW). Carriles 1, 2 y C-, clonas candidatas 1 y 2, y pEhExHA vacío digeridos con BglII y XhoI.

Antes de realizar los ensayos de splicing in vivo para analizar la participación de Dbr1 en la formación de flicRNAs, nos aseguramos que ambas proteínas HA-Dbr1 y HA-DbrΔC eran sobreexpresadas en trofozoitos transformados y seleccionados a 3 y 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de G418. El vector vacío se usó como control. Por razones desconocidas las transformantes HA- DbrΔC son letales y mueren al seleccionarles con 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de G318. De este modo, para tal construcción se realizaron transfecciones transitorias y los ensayos de splicing in vivo se hicieron con tales transfectantes seleccionadas con 1.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de antibiótico.

Las muestras para obtener los extractos de proteínas y el RNA se obtuvieron a las 48 h de cultivo, ya que de acuerdo con la cinética de crecimiento (Fig. 9) es el tiempo de mejor expresión de todas las formas de splicing. Para evaluar que efectivamente se estaban sobreexpresando ambas proteínas, se realizó un ensayo de western blot con extractos totales de proteína de las transfectantes. Como se logra apreciar en la Figura 13, se detectó que la expresión de las proteínas de fusión HA-Dbr (44 kDa) de amibas seleccionadas a 3 y 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de G418 es proporcional a la concentración del antibiótico. La expresión de la proteína HA-DbrΔC de transfectantes transitorias seleccionadas a 1.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ se comparó con la expresión de unas transfectantes mock, en cuyo caso se apreció una reacción cruzada con el antígeno HA ligeramente superior a los 37 kDa esperados.

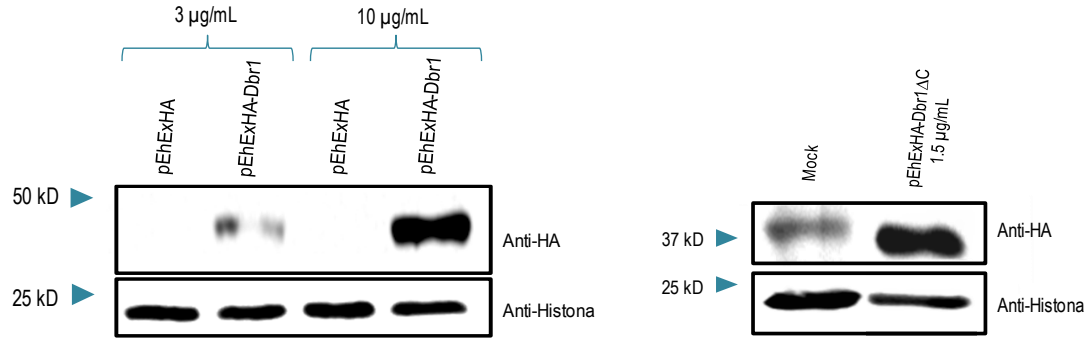
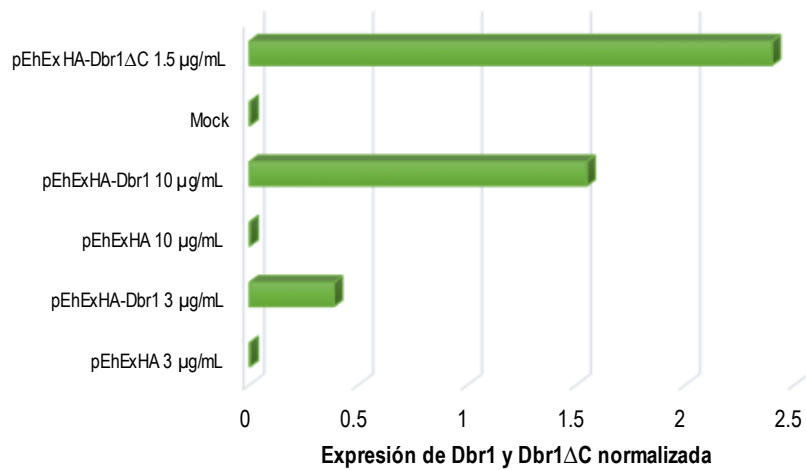


Figura 13. Análisis de la sobreexpresión de HA-Dbr1 y HA-Dbr1ΔC. Western blot de extractos totales de proteínas de los trofozoitos transfectados con pEhExHA vacío, pEhExHA-Dbr1 (panel izquierdo) y mock y pEhExHA-Dbr1ΔC (panel derecho). Las proteínas se revelaron con un anticuerpo anti-HA y para el control de carga se utilizó un anticuerpo anti-histonas H3.

Una vez normalizados los datos respecto al vector vacío (basal) la expresión de HA-Dbr aumentó casi el 50% y más del 100% a 3 y 10 μg/mL de antibiótico de selección respectivamente, sin embargo, un aumento más notorio se apreció en la sobreexpresión de HA-Dbr1ΔC durante las transfecciones transitorias como se puede observar en la Gráfica 2.



Gráfica 2. Eficiencia de la sobreexpresión de HA-Dbr1 y HA-Dbr1ΔC. Utilizando el software ImageJ se obtuvieron las densidades de intensidad de las áreas bajo las curvas de pEhExHA-Dbr1, pEhExHA-Dbr1ΔC e histonas. Para las cuantificaciones relativas se dividió el valor del vector vacío, el vector de sobreexpresión de Dbr a las dos concentraciones de antibiótico para la selección, del mock y del vector de sobreexpresión de DbrΔC entre su respectivo valor de intensidad de histonas, estos valores se normalizaron respecto al vector vacío o el mock. Se graficó el promedio de 2 experimentos independientes.

Una vez corroborados los niveles de expresión de las proteínas de fusión, procedimos a realizar los ensayos de splicing in vivo para monitorizar la expresión del RNA circular y las variantes de splicing del gen *RabX13* en los fondos HA-Dbr1 y HA-Dbr1ΔC para explorar la participación de la enzima desramificadora en la biogénesis de flicRNAs. Las relaciones molares de los productos amplificados se cuantificaron en relación al transcrito de la RNA polimerasa II.

Como se puede observar en la Figura 14 la sobreexpresión de Dbr1 y Dbr1ΔC no modificó la abundancia del pre-mRNA y el mRNA de *RabX13*, sin embargo, la abundancia del RNA circular incrementó en función de la expresión de la Dbr1 (mayor presión de selección). Sorprendentemente, la abundancia de flicRX13 también incrementó respecto al mock en función de la sobreexpresión de Dbr1ΔC (Fig. 14).

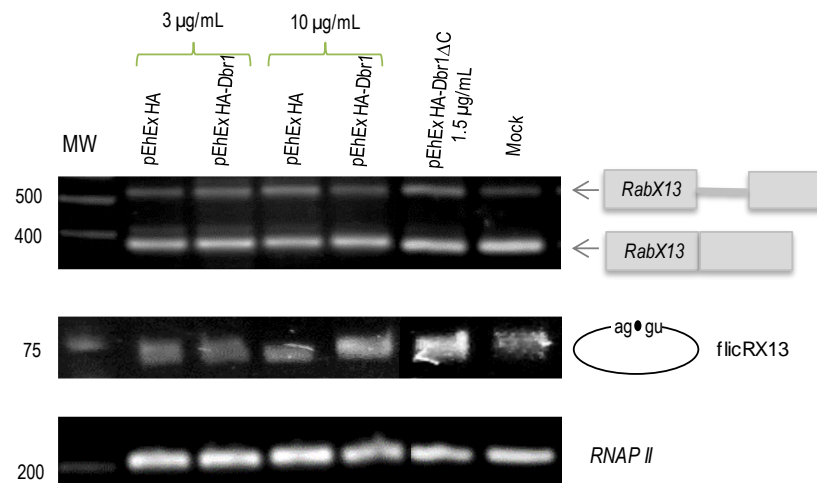
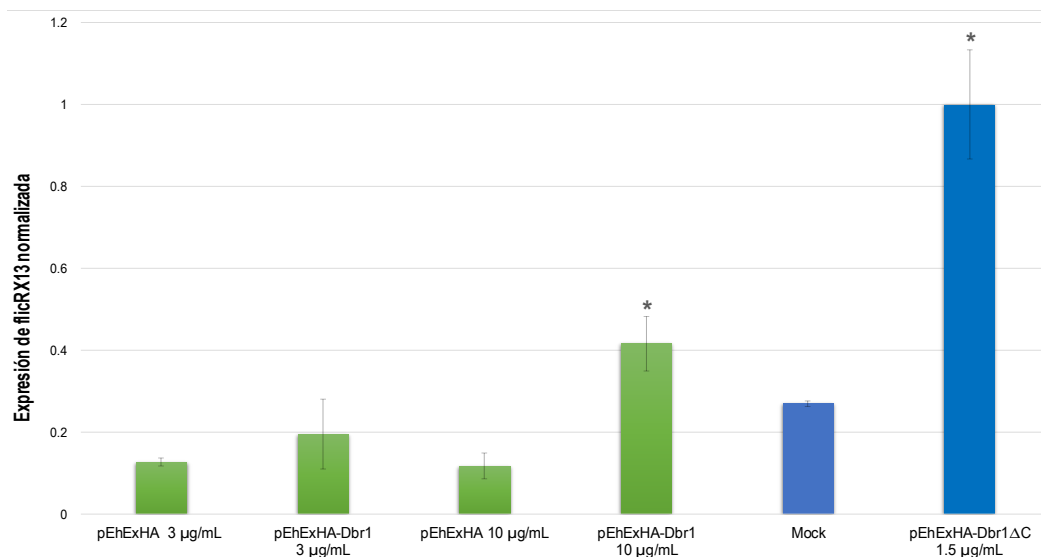


Figura 14. Dbr1 está implicada en la biogénesis de flicRX13. Se analizó la expresión de las variantes de splicing de *RabX13*, flicRX13 y la RNA polimerasa II de los trofozoitos transfectados con los cDNA para las proteínas de fusión HA-Dbr a las concentraciones 3 y 10 μg/mL de G418. El mismo análisis se llevó a cabo comparando transfectantes transitorias mock y HA-DbrΔC. MW, marcador de peso (pb). A la derecha de la imagen se representan las variantes de splicing del gen *RabX13* y el RNA circular intrónico. La imagen es representativa de 3 experimentos independientes.

El incremento solo en los niveles de flicRX13 confirmó que Dbr1 actúa después de que se lleva a cabo la catálisis y formación de los productos de splicing y no sobre

algún evento precedente, ya que el RNA procesado y sin procesar no cambiaron con la sobreexpresión de la enzima.

El ensayo se hizo por triplicado y acorde al análisis densitométrico el resultado fue estadísticamente significativo cuando se sobreexpresó Dbr1 a una concentración de antibiótico de 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ con una $p = .017$ y cuando se sobreexpresó Dbr1 ΔC con una $p = 0.004$ (valores obtenidos al realizar un análisis de T-student para muestras pareadas) como se puede observar en la Gráfica 3.



Gráfica 3. Expresión de flicRX13 en trofozoitos transfectados con las construcciones pEhExHA-Dbr1 y pEhExHA-Dbr1 ΔC . La expresión de flicRX13 se normalizó contra su peso molecular y el transcrito de la RNA polimerasa II. Los valores de intensidad se obtuvieron usando el software ImageJ. Las barras de error muestran la desviación estándar. Los asteriscos indican las diferencias significativas con respecto a las muestras control ($P < 0.05$). Se graficó el promedio de 3 experimentos independientes.

9.4 Obtención de las construcciones de sobreexpresión pEhExHA-Dbr1C14A y pEhExHA-Dbr1 ΔC -C14A

Debido a que observamos que la enzima Dbr1 y aún más la mutante Dbr1 ΔC participan en la biogénesis de flicRX13 y que ya se han reportado anteriormente los dominios y aminoácidos importantes de dicha enzima (Montemayor *et al.*, 2014), decidimos hacer mutantes cambiando la cisteína 14 por una alanina en las dos

construcciones de sobreexpresión que ya se tenían, con la finalidad de realizar experimentos futuros que nos permitan entender más a fondo aspectos de la biogénesis de los flicRNAs de *E. histolytica*.

Se realizó la mutagénesis sitio dirigida tal como se describe en la parte de materiales y métodos. Para confirmar la mutación las muestras se secuenciaron. Como se puede observar en la Figura 15 tanto de la secuencia de aminoácidos de Dbr1 como de la proteína deletada del carboxilo con la proteína *wild type*, efectivamente se logró mutar la cisteína en la posición 14 por una alanina en ambos casos.

```

Ehi_Dbr1          MATEQIQHIAIVGCVHVGKYREMYRQLSEYEKSTGKEISFVICTGDMQTLR
HA-Dbr1-C14A     MATEQIQHIAIVGAVHVGKYREMYRQLSEYEKSTGKEISFVICTGDMQTLR
HA-Dbr1ΔC-C14A  MATEQIQHIAIVGAVHVGKYREMYRQLSEYEKSTGKEISFVICTGDMQTLR
*****.*****

Ehi_Dbr1          YEADLVYLKVPVKYQMGDFHLYYEGKEKAPYLTFLFIGGNHSSNVLLHL
HA-Dbr1-C14A     YEADLVYLKVPVKYQMGDFHLYYEGKEKAPYLTFLFIGGNHSSNVLLHL
HA-Dbr1ΔC-C14A  YEADLVYLKVPVKYQMGDFHLYYEGKEKAPYLTFLFIGGNHSSNVLLHL
*****

Ehi_Dbr1          YNGGFVCFNMYLGVCSININGLRIVGVSGIYKSFDEKKPYTYPPSPND
HA-Dbr1-C14A     YNGGFVCFNMYLGVCSININGLRIVGVSGIYKSFDEKKPNTYPPSPND
HA-Dbr1ΔC-C14A  YNGGFVCFNMYLGVCSININGLRIVGVSGIYKSFDEKKPNTYPPSPND
*****

Ehi_Dbr1          VVSLFHTRNYVIQMLSNLSQSSQIDISLSDWPPQGIVMKGNYKQLYRFQP
HA-Dbr1-C14A     VVSLFHTRNYVIQMLSNLSQSSQIDISLSDWPPQGIVMKGNYKQLYRFQP
HA-Dbr1ΔC-C14A  VVSLFHTRNYVIQMLSNLSQSSQIDISLSDWPPQGIVMKGNYKQLYRFQP
*****

Ehi_Dbr1          GFKKDGASLGSPINKVILNLTLPKYWISGHMHCEYHAEEGPTHFIALGKI
HA-Dbr1-C14A     GFKKDGASLGSPINKVILNLTLPKYWISGHMHCEYHAEEGPTHFIALGKI
HA-Dbr1ΔC-C14A  GFKKDGASLGSPINKVILNLTLPKYWISGHMHCEYHAEEGPTHFICISKI
*****.:**

Ehi_Dbr1          GYKNAISYLDLPLKQKTDLEYDKDWVCNLIMTWPAFSNKAQFPDLSYSIS
HA-Dbr1-C14A     GYKNAISYLDLPLKQKTDLEYDKDWVCNLIMTWPAFSNKAQFPDLSYSIS
HA-Dbr1ΔC-C14A  GYKNAISYLDPSF-----
***** .:

Ehi_Dbr1          ELLSKRTKELDKKIIELWEKYIGLKIIYSDTFDIQFTSRRFYIEKIYNE
HA-Dbr1-C14A     EFII-----
HA-Dbr1ΔC-C14A  -----

Ehi_Dbr1          LNINX
HA-Dbr1-C14A     -----
HA-Dbr1ΔC-C14A  -----

```

Figura 15. Alineamiento de las secuencias de aminoácidos de Dbr1 y Dbr1ΔC con la mutación C14A y Dbr1 *wild type*.

10. DISCUSIÓN

Los antecedentes sobre las características únicas de flicRX13 y que éste depende el proceso de transcripción (Mendoza-Figueroa, 2016), sugerían que el procesamiento del RNA estaba involucrado en su biogénesis de una manera similar a aquéllos RNAs circulares eucarióticos reportados previamente (ver Fig. 6).

De acuerdo a los análisis de splicing in vivo logramos determinar que efectivamente la biogénesis de flicRX13 proviene del proceso de splicing, ya que la variante procesada del gen *RabX13* tiene una relación directa con la abundancia del RNA circular, en tanto que las formas pre-mRNA/IR tienen una relación inversa. Además, pareciera ser que el intrón circularizado es más estable que las variantes de splicing de su gen parental, lo cual concuerda con resultados anteriores donde se ha observado que por la estructura circular este RNA es más estable que su contraparte lineal (Jeck *et al.*, 2013; Memczak *et al.*, 2013). Todo esto sugiere que durante el evento de splicing canónico se generan tanto el RNA mensajero como el RNA circular. Sin embargo, durante el proceso de splicing lo primero que ocurre es un ataque nucleofílico al sitio de splicing 5' por parte del 2'-OH de la adenosina del sitio de ramificación y por tanto se forma un intermediario con un enlace 2'-5' que posteriormente es liberado como ya se explicó anteriormente (ver Fig. 3), entonces, si el intrón de *RabX13* en algún momento durante este proceso tiene la estructura lariat ¿cómo es que se lleva a cabo la circularización del intrón completo unido por los sitios de splicing 5' y 3'? y ¿es la biogénesis de flicRX13 un evento co-splicing o post-splicing?. Debido a estas y más interrogantes, se decidió analizar el efecto de la sobreexpresión de dos proteínas y sus mutantes, que están involucradas con el procesamiento del RNA en dos etapas distintas sobre la biogénesis de este RNA circular intrónico. Es de esperarse que dicha biogénesis sea distinta a la de otros circRNAs que se han reportado, puesto que todos ellos se forman por diversos mecanismos moleculares e incluso en ocasiones existe una competencia entre la biogénesis de RNAs circulares con el proceso de splicing (Ashwal-Fluss *et al.*, 2014), a diferencia de los resultados obtenidos en este trabajo, donde un mayor evento de splicing propicia a un incremento concomitante del mRNA, y por tanto lariats, así como el flicRNA del gen *RabX13*.

El silenciamiento de U2AF84 permitió inferir que éste propiciaba a la retención intrónica (Morales-Tovar *et al.*, 2015). Por medio de análisis bioinformáticos (Apéndice B) se determinó que cuenta con un dominio KH-QUA2 y, en ensayos in vitro, este dominio interacciona con la proteína SF1 antes o después de su interacción con el sitio de ramificación inhibiendo el splicing. Por lo anterior, se decidió estudiar el efecto de la sobreexpresión de esta proteína y una mutante sin el dominio KH-QUA2 en la biogénesis del flicRX13 y sobre las variantes de splicing del gen *RabX13*.

Los efectos de la sobreexpresión de U2AF84 solamente pudieron observarse en las variantes de splicing, ya que los niveles de RNA no procesado incrementaron considerablemente, lo cual corrobora que U2AF84 participa en la retención intrónica. Sin embargo, existe algún sistema de regulación más coordinado en *E. histolytica*, pues pesar de la inhibición del splicing, en los ensayos de splicing in vivo se detectan niveles de mRNA y flicRNAs similares a los del vector vacío. Interesantemente, la sobreexpresión de la proteína sin el carboxilo terminal incrementó el procesamiento del RNA por consecuente los niveles de mRNA y de flicRX13. Esto indica que el dominio KH-QUA2 es el responsable de inhibir el splicing, lo cual concuerda con los ensayos in vitro. Además, este resultado corrobora que flicRX13 proviene de splicing, pero no es un evento co-splicing. Zhang *et al.*, (2013) encontraron RNAs circulares intrónicos unidos por el enlace 2'-5', los cuales escapaban a la enzima Dbr1 por secuencias consenso conservadas en los sitios de splicing 5' y el sitio de ramificación. El intrón de *RabX13* presenta una de estas características, por ello, decidimos estudiar los efectos de la sobreexpresión de Dbr1 de *E. histolytica* en la biogénesis de flicRX13, además de una mutante deletada del carboxilo terminal que Montemayor *et al.*, (2014) por ensayos de trans-expresión de la enzima Dbr1 de *E. histolytica* en una cepa *S. cerevisiae* $\Delta dbr1$ identificaron como un dominio esencial para que esta enzima pueda realizar la hidrólisis del enlace 2'-5'; además el extremo carboxilo terminal de Dbr1 es distintivo de cada ortólogo de Dbr1 en eucariotas. Como era de esperarse, ambos ensayos de sobreexpresión no tuvieron efecto sobre los

niveles de las variantes de splicing de *RabX13* debido a que Dbr1 actúa en eventos post-splicing, sin embargo, la sobreexpresión de Dbr1 y Dbr1 Δ C tuvieron efecto notorio en la abundancia del RNA circular. Ambos resultados fueron intrigantes, ya que la sobreexpresión de Dbr1 a concentraciones altas de selección propició un incremento significativo de los niveles del RNA circular respecto al control, así mismo, cuando se realizó la sobreexpresión transitoria de la enzima mutante, se detectó un incremento en la abundancia de flicRX13 aún más notorio. Estos resultados sugieren que efectivamente la enzima Dbr1 está implicada en la biogénesis de flicRX13, pero interesantemente, sugieren también que este es un mecanismo regulado por el carboxilo terminal de esta enzima, ya sea directa o indirectamente. La enzima Dbr1 lleva a cabo la hidrólisis del enlace 2'-5', sin embargo, la secuencia rica en GU en el sitio de splicing 5' pudiese relentecer el proceso, y cuando se lleva a cabo la catálisis, por acción de la misma Dbr1 u otros factores de splicing, ocurre la ligación de los extremos 3'-5' de este intrón. Cuando se sobreexpresa la mutante Dbr1 Δ C, la ausencia de este dominio importante para la función de dicha enzima propicia que la desramificación sea aún más lenta y además estructuralmente pudiese propiciar que otros factores que posiblemente estén involucrados en la biogénesis del RNA circular puedan estar en cercanía por más tiempo con la secuencia intrónica, y, por tanto, propiciar un incremento en la biogénesis de flicX13 durante un evento post-splicing (Fig. 16). Este RNA circular es muy estable y a pesar de la inhibición del splicing sigue detectándose, esto sugiere que flicRX13 pudiese tener alguna función. Tal vez una posible función de flicRX13 sea similar a la de otros RNAs circulares (Zhang *et al.*, 2013; Li *et al.*, 2015), que por contener secuencias intrónicas permanecen retenidos en el núcleo. En el caso especial de los EIciRNAs, estos interactúan con el snRNA U1 y participan en la regulación de la transcripción de su gen parental. Sin embargo, *Entamoeba histolytica* carece del snRNA U1 (Dávila *et al.*, 2008), pero ya se ha reportado y caracterizado el snRNA U6 de este organismo (Miranda *et al.*, 1996). En levadura U6 reconoce el sitio de splicing 5' desplazando a U1 y activando el splicing (Roca *et al.*, 2013). Estos datos respaldan un posible mecanismo de regulación de flicRX13 durante el procesamiento del RNA por la unión por complementariedad con el snRNA U6 (Fig. 17).

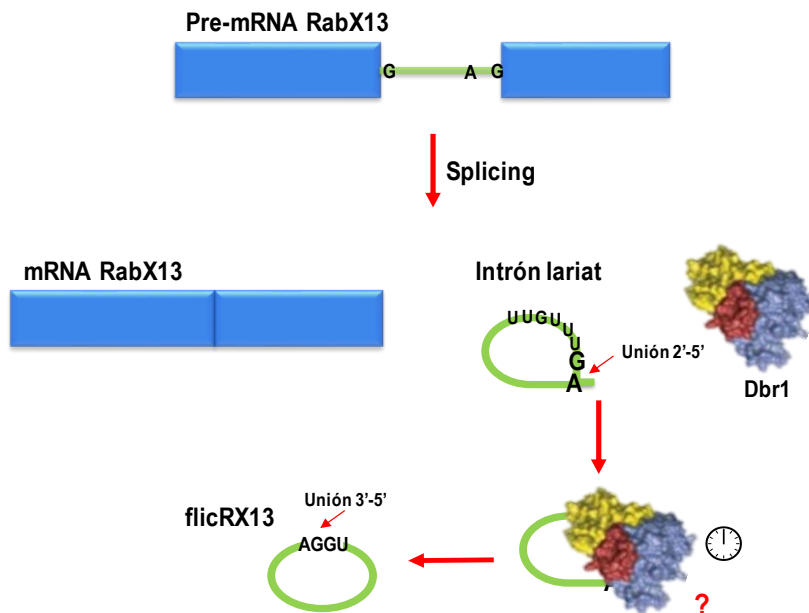


Figura 16. Modelo de la biogénesis de flicRX13. Posible biogénesis de flicRX13. En azul se representan los exones y en verde el intrón del gen *RabX13*. Se muestra la secuencia GUUUGUU en el intrón lariat el cual propiciaría un enlentecimiento en la hidrólisis del enlace 2'-5'. La enzima Dbr1 participa en la biogénesis de flicRX13, sin embargo, aún se desconoce el mecanismo exacto que lleva a la formación del RNA circular.

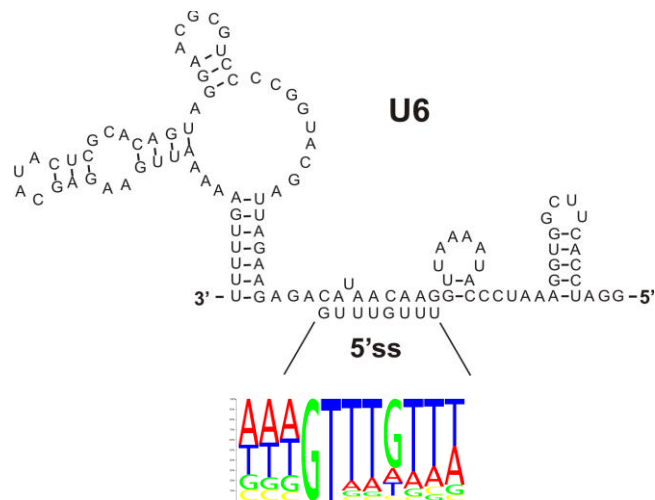


Figura 17. Reconocimiento del sitio de splicing 5' por U6 de *E. histolytica*. Apareamiento entre la secuencia consenso del sitio de splicing 5' de *E. histolytica* y U6. Cortesía Jesús Valdés.

11. CONCLUSIONES

En el presente trabajo se comprobó, a través de varias estrategias, que la biogénesis de flicRX13 es dependiente del proceso de splicing. El estudio del efecto de la sobreexpresión del factor auxiliar U2AF84 nos permitió dilucidar que éste participa en la retención intrónica, no así en la biogénesis de flicRX13. Además, encontramos que la enzima Dbr1 está involucrada en la biogénesis de flicRX13, ya que su sobreexpresión tuvo un efecto directo en la síntesis del intrón circularizado, lo cual aunado a los resultados de la sobreexpresión de U2AF84 confirmó que es un evento post-splicing y que aparentemente está regulado por el carboxilo terminal de Dbr1.

12. PERSPECTIVAS

Hasta la fecha poco se conoce acerca de la expresión y función de la mayoría de los circRNAs. Un mejor entendimiento e interpretación a nivel molecular de la biogénesis de flicRX13 será crucial para determinar la función de éste. Una función putativa para este RNA circular (por su estructura intrónica) es la regulación de la transcripción de su gen parental, sin embargo, son necesarios más estudios.

Por ello, se han planteado los siguientes experimentos:

- Realizar ensayos de splicing in vivo con las mutantes en la cisteína 14 de Dbr1 que nos permitirán establecer un mecanismo más completo sobre el efecto de esta enzima la biogénesis de flicRX13.
- Realizar ensayos de inmunoprecipitación de la RNA polimerasa II e identificar si flicRX13 está interactuando con el complejo de transcripción.
- Realizar ensayos de inmunoprecipitación del carboxilo terminal de Dbr1 y determinar por espectrometría de masas que factores están interactuando con este dominio importante para la biogénesis del RNA circular intrónico.
- Realizar ensayos de silenciamiento de los flicRNAs y determinar su efecto sobre el splicing de su gen parental.

13. BIBLIOGRAFÍA

- Arenas, J. y Hurwitz J. 1987. Purification of a RNA debranching activity from HeLa cells. *The Journal of Biological Chemistry*. 262: 4274-4279.
- Ashwal-Fluss R., Meyer M., Pamudurti NR., Ivanov A., Bartok O., Hanan M., Evantal N., Memczak S., Rajewsky N., y Kadener S. 2014. circRNA biogenesis competes with pre-mRNA splicing. *Molecular Cell*. 56: 55-66.
- Barrett SP., Wang PL., y Salzman J. 2015. Circular RNA biogenesis can proceed through an exon-containing lariat precursor. *eLife*. doi: 10.7554/elife.07540.
- Blythe, A., Fox, A. y Bond, C. 2015. The ins and outs of lncRNA structure: How, why and what comes next? *Biochimica et Biophysica Acta*. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbagr.2015.08.009>
- Cech, T. 1990. Self-splicing of group I introns. *Annual Review of Biochemistry*. 59: 543-68.
- Cech, T. and Steitz, J. 2014. The noncoding RNA revolution – trashing old rules to forge new ones. *Cell*. 157; 77-94.
- Chen, Ling-Ling. 2016. The biogenesis and emerging roles of circular RNAs. *Molecular Cell Biology*. 17.
- Chen, H. y Cheng, S. 2012. Functional roles of protein splicing factors. *Bioscience Reports*. 32: 345-359.
- Chen, L. y Yang, L. 2015. Gear Up in Circles. *Molecular Cell*. 58 <http://dx.doi.org/10.1016/j.molcel.2015.05.027>
- Cho, S., Moon, H. Loh, T., Jang, H. Liu, Y., Zhou, J., Ohn, T., Zheng, X. y Sheen, H. 2015. Splicing inhibition of U2AF65 leads to alternative exon skipping. *PNAS*. 112 (32): 9926- 9931.

- Conn, S., Pillman, K., Gregory, P. y Goodall, G. 2015. The RNA binding protein quaking regulates formation of circRNAs. *Cell*. 160; 1125–1134.
- Crisci, A., Raleff, F., Bagdiul, I., Raabe, M., Urlaub, H., Rain, J. y Krämer, A. 2015. Mammalian splicing factor SF1 interacts with SURP domains of U2 snRNP-associated proteins. *Nucleic Acids Research*. doi:10.1093/nar/1gky952
- Dávila, M., Rosenblad, M. y Samuelsson, T. 2008. Computational screen for spliceosomal RNA genes aids in defining the phylogenetic distribution of major and minor spliceosomal components. *Nucleic Acids Research*. 36: 3001–3010.
- Davis, C., Brown, M. y 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.
- Del Sal G., Manfioletti G., y Schneider C. 1988. A one-tube plasmid DNA mini-preparation suitable for sequencing. *Nucleic Acids Research*. 16: 9878.
- Ebbesen, K., Kjems J. y Hansen, T. 2015. Circular RNAs: Identification, biogenesis and function. *Biochimica et Biophysica Acta*. doi: 10.1016/j.bbagr.2015.07.007.
- Faust, D. y Guillen, N. 2012. Virulence and virulence factors in *Entamoeba histolytica*, the agent of human amoebiasis. *Microbes and Infection*. 14; 1428-1441.
- Furuichi, Y. Discovery of m(7)G-cap in eukaryotic mRNAs. 2015. *Proceedings of the Japan Academy. Series B, Physical and Biological Sciences*. 91: 394-409.
- Graveley, B., Hertel, K. y Maniatis, T. 2001. The role of U2AF35 and U2AF65 in enhancer-dependent splicing. *RNA*. 7: 806–818.

- Guo, J., Agarwal, V., Guo, H. y Bartel, D. 2014. Expanded identification and characterization of mammalian circular RNAs. *Genome Biology*. 15; 409.
- Gupta, A., Panigrahi, S., Bhattacharya, A. y Bhattacharya, S. 2012. Self-circularizing 5'-ETS RNAs accumulate along with unprocessed pre ribosomal RNAs in growth-stressed *Entamoeba histolytica*. *Scientific Reports*. 2; 303.
- Harvey Lodish, Arnold Berk, Lawrence Zipursky, Paul Matsudaira, David Baltimore, J.E.D., 2000. *Molecular Cell Biology Fourth Edi.* S. Tenney, ed., New York: W. H. Freeman and Company.
- Hon, C., Weber, C., Sismeiro, O., Proux, C., Koutero, M., Deloger, M., Das. S., Agrahari, M., Dillies, M., Jagla, B., Coppee, J., Bhattacharya, A. y Gullen, N. 2012. Quantification of stochastic noise of splicing and polyadenylation in *Entamoeba histolytica*. *Nucleic Acids Research*. 41: 1936-52.
- Jeck, W., Sorrentino, J., Wang, K., Slevin, M., Burd, C., Liu, J., Marzluff, W., y Sharpless, N. 2013. Circular RNAs are abundant, conserved, and associated with ALU repeats. *RNA*. 19: 141-57.
- Jenkins, J., Agrawal, A., Gupta, A., Green, M. y Kielkopf, C. 2013. U2AF65 adapts to diverse pre-mRNA splice sites through conformational selection of specific and promiscuous RNA recognition motifs. *Nucleic Acids Research*. 41; 3859–3873.
- Kataoka N., Dobashi I., Hagiwara M., y Ohno M. 2013. hDbr1 is a nucleocytoplasmic shuttling protein with a protein phosphatase-like domain motif essential for debranching activity. *Scientific Reports*. 3: 1090.
- Khalid, M., Damha, M., Shuman, S. y Schwer, B. 2005. Structure-function analysis of yeast RNA debranching enzyme (Dbr1), a manganese-dependent phosphodiesterase. *Nucleic Acids Research*. 33; 6349–6360.

- Lasda E., y Parker R. Circular RNAs: diversity of form and function. *RNA*. 2014; 20: 1829-1842.
- Benjamin Lewin. 2004. *Genes VIII*. Michigan: Pearson Prentice Hall.
- Li Z., Huang C., Bao C., Chen L., Lin M., Wang X., Zhong G., Yu B., Hu W., Dai L., Zhu P., Chang Z., Wu Q., Zhao Y., Jia Y., Xu P., Liu H., y Shan G. 2015. Exon-intron circular RNAs regulate transcription in the nucleus. *Nature Structure and Molecular biology*. 22: 256-264.
- Liang, D. y Wilusz, J. Short intronic repeat sequences facilitate circular RNA production. *Genes & Development*. 2014; 28: 2233-47.
- Loftus, B. et al., 2005. The genome of the protist parasite *Entamoeba histolytica*. *Nature*. 433: 865–868.
- Lorenzi, H., Puiu, D., Miller, J., Brinkac, L., Amedeo, P., Hall, N. y Caler, E. 2010. New assembly, reannotation and analysis of the *Entamoeba histolytica* genome reveal new genomic features and protein content information. *PLoS Neglected Tropical Diseases*. 4: e716.
- Matera, A., y Wang, Z. 2014. A day in the life of the spliceosome. *Nature*. 15.
- Mar-Aguilar, F., Treviño, V., Salinas-Hernández, E., Taméz-Guerrero, M., Barrón-González, M., Morales-Rubio, E., Treviño-Neávez, J., Verduzco-Martínez, J., Morales-Vallarta, M. y Reséndez-Pérez, D. 2013. Identification and characterization of microRNAs from *Entamoeba histolytica* HM1-IMSS. *PLoS One*. 8: e68202.
- Martínez-Baltazar y Valdés J. Tesis de maestría 2016.
- Masaki, S., Yoshimoto, R., Kaida, D., Hata, A., Satoh, T., Ohno, M. y Kataoka, N. 2015. Identification of the specific interactors of the human lariat RNA

- debranching enzyme 1 protein. *International Journal of Molecular Sciences*. 16; 3705-3721.
- Memczak, S., Jens, M., Elefsinioti, A., Torti, E., Krueger, J., Rybak, A., Maier, L., Mackowiak, S., Gregersen, L., Munschauer, M., Lower, A., Ziebold, U., Landthaler, M., Kocks, C., Noble, F. y Rajewsky, N. 2013. Circular RNAs are a large class of animal RNAs with regulatory potency. *Nature* 495; 333–338.
 - Mendoza-Figueroa, S. y Valdés, J. Tesis de doctorado 2016.
 - Miranda, R., Salgado, L., Sanchez-Lopez, R., Alagon, A. y Lizardi, P. 1996. Identification and analysis of the U6 small nuclear RNA gene from *Entamoeba histolytica*. *Gene*, 180: 37–42.
 - Montemayor, E., Katolik, A., Clark, N., Taylor, A., Schuermann, J., Combs, D., Johnsson, R., Holloway, S., Stevens, S., Damha, M. y Hart, P. 2014. Structural basis of lariat RNA recognition by the intron debranching enzyme Dbr1. *Nucleic Acids Research*. 42: 10845–10855.
 - Morales-Tovar, M. y Valdés, J. Tesis de maestría. 2015.
 - Murray, H., Mikheeva, S., Coljee, V., Turczyk, B., Donahue, W., Bar-Shalom, A. y Jarrell, K. 2001. Excision of group II introns as circles. *Molecular Cell*. 8: 201-211.
 - Nam, K., Lee, G., Trambley, J., Devine, S. y Boeke, J. 1997. Severe growth defect in a *Schizosaccharomyces pombe* mutant defective in intron lariat degradation. *Molecular Cell Biology*. 17: 809-18.
 - Patel, A., y Steitz, J. 2003. Splicing double: insights from the second spliceosome. *Nature*. 4.

- Pearson, R. y Singh, U. 2010. Approaches to characterizing *Entamoeba histolytica* transcriptional regulation. *Cellular Microbiology*. 12; 1681–1690.
- Qu S., Yang X., Li X., Wang J., Gao Y., Shang R., Sun W., Dou K., y Li H. 2015. Circular RNA: A new star of noncoding RNAs. *Cancer Letters*. 365: 141-148.
- Ralston, K. 2015. Chew on this: amoebic trophocytosis and host cell killing by *Entamoeba histolytica*. *Trends in Parasitology*. 31; 442-452.
- Roca, X., Krainer, A. y Eperon, I. 2013. Pick one, but be quick: 5' splice sites and the problems of too many choices. *Genes & Development*. 27; 129–144.
- Ruskin B., y Green MR. 1985. A RNA processing activity that debranches RNA lariats. *Science*. 229: 135-40.
- Salzman, J. 2016. Circular RNA Expression: Its Potential Regulation and Function. *Trends in genetics*. doi.org/10.1016/j.tig.2016.03.002
- Valdés J., Nozaki T., Sato E., Chiba Y., Nakada-Tsukui K., Villegas-Sepúlveda N., Winkler R., Azuara-Liceaga E., Mendoza-Figueroa MS., Watanabe N., Santos HJ., Saito-Nakano Y., y Galindo-Rosales JM. 2014. Proteomic analysis of *Entamoeba histolytica* in vivo assembled pre-mRNA splicing complexes. *Journal of Proteomics*. 111: 30-45.
- Wang, P., Bao Y., Yee, M., Barrett, S., Hogan, G., Olsen, M., Dinneny, J., Brown, P. y Salzman J. 2014. Circular RNA is expressed across the eukaryotic tree of life. *PLoS One*. 9: e90859.
- Wang, H., Hill, K. and Perry, S. 2004. An Arabidopsis RNA lariat debranching enzyme is essential for embryogenesis. *Journal of Biological Chemistry*. 279; 1468–1473.

- Wilihoeft U, Campos-Gongora E, Touzni S, Bruchhaus I, Tannich E. 2001. Introns of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar*. *Protist*. 152; 149–56.
- Will, C., y Lührmann, R. 2011. Spliceosome Structure and Function. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 3: a003707.
- World Health Organization. 1997. Amoebiasis. *Weekly Epidemiological Record*. 72: 97–99.
- Wu, T., Fu, X. 2015. Genomic functions of U2AF in constitutive and regulated splicing. *RNA Biol.*, 12: 479-485.
- Yoon, J., Abdelmohsen, K., y Gorospe, M. 2013. Post-transcriptional gene regulation by long noncoding RNA. *J Mol Biol*. 425: 3723–3730.
- Zhang, H., Pompey, JM., y Singh, U. 2011. RNA interference in *Entamoeba histolytica*: implications for parasite biology and gene silencing. *Future Microbiology*. 6: 103-17.
- Zhang, Y., Zhang, X., Chen, T., Xiang, J., Yin, Q., Xing, Y., Zhu S., Yang L., y Chen, L. 2013. Circular intronic long noncoding RNAs. *Molecular Cell*. 51: 792-806.

14. APÉNDICE

Apéndice A

Alineamientos de la secuencia de aminoácidos de los fragmentos clonados con la secuencia de aminoácidos de la enzima Dbr1 *wild type*.

PEhExHA-Dbr1ΔC

Consensus key (see documentation for details)

* - single, fully conserved residue
: - conservation of strong groups
. - conservation of weak groups
- no consensus

CLUSTAL W (1.81) multiple sequence alignment

```
HA-Dbr1ΔC      MATEQIQHIAIVGCVHGKYREMYRQLSEYEKSTGKEISFVICTGDMQTLRYEADLVYLKV
Ehi_Dbr1      MATEQIQHIAIVGCVHGKYREMYRQLSEYEKSTGKEISFVICTGDMQTLRYEADLVYLKV
*****

HA-Dbr1ΔC      PPKYKQMGDFHLYYEGKEKAPYLTLFIGGNHESNVLLHLYNGGFVCFNMYLGVCSIN
Ehi_Dbr1      PPKYKQMGDFHLYYEGKEKAPYLTLFIGGNHESNVLLHLYNGGFVCFNMYLGVCSIN
*****

HA-Dbr1ΔC      INGLRIVGVSGIYKSFDEKKPYTYPPSPNDVVSFLFHTGNYVIQMLSNLSQSSQIDISLSH
Ehi_Dbr1      INGLRIVGVSGIYKSFDEKKPYTYPPSPNDVVSFLFHTRNYVIQMLSNLSQSSQIDISLSH
*****

HA-DbrΔC       DWPQGIVMKGNYKQLYRFQPGFKKDGASLGSPINKVILNLTLPKYWISGHMHCEYHAEEG
Ehi_Dbr1      DWPQGIVMKGNYKQLYRFQPGFKKDGASLGSPINKVILNLTLPKYWISGHMHCEYHAEEG
*****

HA-DbrΔC       PTHLIALGKIGYKNAISYLDLPLKQKTDLKYDKDWVCNLMX-----
Ehi_Dbr1      PTHFIALGKIGYKNAISYLDLPLKQKTDLKYDKDWVCNLMTPAFSNAQFPDLSYSIS
***.:*****
```

PEhExHA-Dbr1

```
HA-Dbr1       MATEQIQHIAIVGCVHGKYREMYRQLSEYEKSTGKEISFVICTGDMQTLRYEADLVYLKV
EHI_Dbr1     MATEQIQHIAIVGCVHGKYREMYRQLSEYEKSTGKEISFVICTGDMQTLRYEADLVYLKV
*****

HA-Dbr1       PPKYKQMGDFHLYYEGKEKAPYLTLFIGGNHESNVLLHLYNGGFVCFNMYLGVCSIN
EHI_Dbr1     PPKYKQMGDFHLYYEGKEKAPYLTLFIGGNHESNVLLHLYNGGFVCFNMYLGVCSIN
*****

HA-Dbr1       INGLRIVGVSGIYKSFDEKKPYTYPPSPNDVVSFLFHTRNYVIQMLSNLSQSSQIDISLSH
EHI_Dbr1     INGLRIVGVSGIYKSFDEKKPYTYPPSPNDVVSFLFHTRNYVIQMLSNLSQSSQIDISLSH
*****

HA-Dbr1       DWPQGIVMKGNYKQLYRFQPGFKKDGASLGSPINKVILNLTLPKYWISGHMHCEYHAEEG
EHI_Dbr1     DWPQGIVMKGNYKQLYRFQPGFKKDGASLGSPINKVILNLTLPKYWISGHMHCEYHAEEG
*****
```

```

HA-Dbr1      PTHFIALGKIGYKNAISYLDLPLKQKTDLEYDKDWVCNLIWPAFSNKAQFPDLSYSIS
EHI_Dbr1    PTHFIALGKIGYKNAISYLDLPLKQKTDLEYDKDWVCNLIWPAFSNKAQFPDLSYSIS
*****

HA-Dbr1      ELLSKRTELDKKIIEWKEYIGLKIIYDSDTFDIQFTSRRFYIEKIYNELNIN
EHI_Dbr1    ELLSKRTELDKKIIEWKEYIGLKIIYDSDTFDIQFTSRRFYIEKIYNELNIN
*****

```

Apéndice B

Análisis bioinformático de U2AF84

Se realizaron alineamientos de la proteína U2AF65 de *Homo sapiens* (Hsa), U2AF45 de *Entamoeba histolytica* (Ehi), su ortólogo en levadura Mud2p (Sce) y U2AF84 de *Entamoeba histolytica* (Ehi) con el fin de determinar las diferencias entre ellas, encontrando que U2AF84 contiene un dominio extra en el carboxilo terminal de una longitud de 226 aa respecto a las otras proteínas analizadas. Se analizó a fondo a que correspondía este dominio extra en la proteína U2AF84 de por lo que se realizaron más alineamientos determinando así que 137 aa alinean con dominios KH-QUA2 de otras proteínas encontradas en distintas especies como *Gallus gallus* (Gga), *Caenorhabditis elegans* (Cel), *Danio rerio* (Dre), *Saccharomyces cerevisiae* (Sce) y además los dominios KH-QUA2 de las proteínas SF1 y QKI de *Homo sapiens* (Hsa) e incluso el dominio KH-QUA2 de la proteína SF1 de la misma *Entamoeba histolytica* (Ehi), debido a esto se realizó un modelo de las proteínas Ehi_U2AF45, Ehi_SF1, Hsa_U2AF65 y Ehi_U2AF84 con sus dominios importantes.

```

Ehi_U2AF84_587-712  TKMEEKETEKNQHEVTNENSLNSLPQNEIMETINQK---DIITQKQTKDCDQNNITYD
Gga_KH              ---KERVLPVKQYPKFNFVGGKILGPQGNTIKRLQEEETGAKISVLGKGSMDKAKEEELR
Hsa_Unnamed        ---KERVLPVKQYPKFNFVGGKILGPQGNTIKRLQEEETGAKISVLGKGSMDKAKEEELR
Dre_KH              ---KERILIPVKQYPKFNFVGGKILGPQGNTIKRLQEEETGAKISVLGKGSMDKKNKEEELR
Cel_GLD-1           ISITEKIYVPKNEYPDYNFVGRILGPRGMTAKQLEQDTGCKIMVRGKGSMDKSKESAHR
Sce_KH-QUA2_ms15   TKFQDKYYIPVDQYPDVNFVGLLLGPRGRTLRLKLEQEDSNCKIAIRGRGSV---KEGKNA
Hsa_KH-QUA2_SF1    -----MIPQDEYPEINFEVGLLIGPRGNTLKNIEKECNAKIMIRGKGSV---KEGKVG
Hsa_QKI             VQLQEKLYVPVKEYPDFNFVGRILGPRGLTAKQLEAETGCKIMVRGKGSMDKKEEQNR
Ehi_KH-QUA2_SF1    GKRTKKIYFPKDR-PDTNFIGLIIGPRGDNQKRLKEDSGAKISIRGKDPK---KLGKLS
      . . . * . * . . : . . * : :

```

```

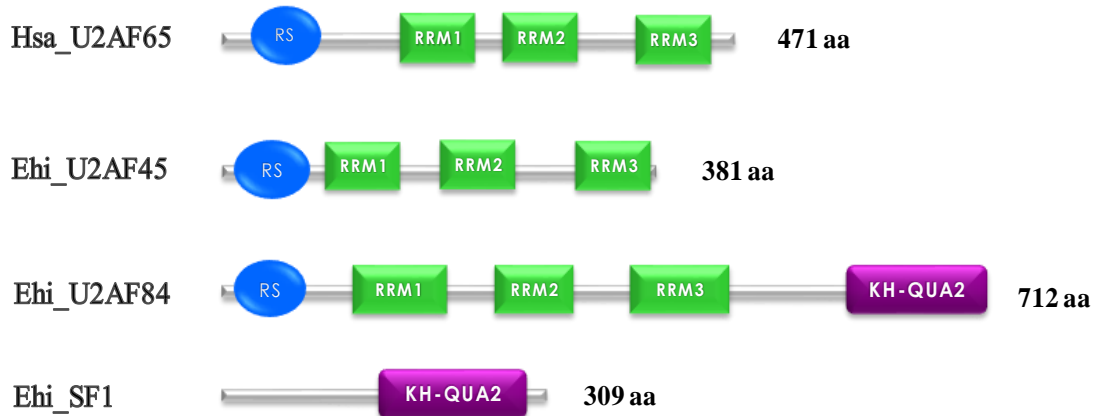
Ehi_U2AF84_587-712  NKIEKEIQNNGTREILNVPQNEIKECNYQSIYLEQSGMEEVFNVPQNKIEGDIQEV
Gga_KH              KGGDPKYAHLNMDLHVFEVFGPPCEAYALMAHAMEEVKKFLVP--DMMDDICQEQFLEL
Hsa_Unnamed        KGGDPKYAHLNMDLHVFEVFGPPCEAYALMAHAMEEVKKFLVP--DMMDDICQEQFLEL
Dre_KH              KNGEPKYAHLNMDLHVFEVFAVVPDAYMRMAHAMEEIKKFLFP--DMMDDICQEQFMEM
Cel_GLD-1           --KGANWEHLEDLHVLFVQCEDTENRVHIKLAALQVKKLLIPEPEGTDELKRKQLMEL
Sce_KH-QUA2_ms15   SDLPPGAMNFEDPLHCLITADS--EDKIQKGIKVCQNIIVIKAVTSPGQNDLKRKQLREL
Hsa_KH-QUA2_SF1    RKDGQMLPGEDEPLHALVTANT--MENVKKAVEQIRNLIKQGIETPEDQNDLKRKQLREL
Hsa_QKI             --GKPNWEHLNEDLHVLFITVEDAQNRAEIKLKRAVEEVKKLLVPAEAGEDSLKMKQLMEL
Ehi_KH-QUA2_SF1    ---GYGDKDNED-SHVFITADT--QEALDLACEEITKIIS---APSEEINVLKHNQLREL
      : . . . : : * :

```

```

Ehi_U2AF84_587-712    KTEEEIKE-----
Gga_KH                SYLNGVPE-----
Hsa_Unnamed           SYLNGVPE-----
Dre_KH                KFLNGGQE-----
CAEEL_GLD-1          AIINGTYRPMKS--
Sce_KH-QUA2_ms15     AELNGTLRED-NR-
Hsa_KH-QUA2_SF1      ARLNGTLREDDNRI
Hsa_QKI               AILNGTYRDANI--
Ehi_KH-QUA2_SF1      ALWNGTFREDRVYE
                      :
                      .

```



Análisis bioinformático. U2AF84 contiene una región rica en serinas y argininas (RS), 3 motivos de reconocimiento a RNA (RRM1, RRM2 y RRM3) de la misma forma que U2AF45 de *E. histolytica* y U2AF65 de *H. sapiens*, además contiene un dominio KH-QUA2 en el carboxilo tal como el encontrado en la proteína SF1 de *E. histolytica*.