



CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE
ESTUDIOS AVANZADOS DEL INSTITUTO
POLITÉCNICO NACIONAL

UNIDAD ZACATENCO
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA

“Caracterización parcial de la proteína Syf1
de *Entamoeba histolytica* en el
procesamiento del pre-mRNA.”

TESIS
Que presenta
L.Q. Torres Cifuentes Diana Milena

Para obtener el grado de
Maestra en ciencias

En la especialidad de
Bioquímica

Director de la tesis
Dr. Jesús Valdés Flores

Ciudad de México

AGOSTO DEL 2016

Durante el desarrollo de este proyecto conté con la beca del CONACyT con el número de registro 141030016 y becario 336792 por lo que estoy enteramente agradecida con la institución, por el apoyo brindado para mi formación académica y profesional.

Agradezco al colegio de profesores del departamento de Bioquímica, por brindarme la oportunidad de ingresar a la maestría, por sus valiosas aportaciones y conocimientos brindados a mi formación académica.

Este trabajo se realizó en el departamento de bioquímica del Centro De Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, bajo la dirección del Dr. Jesús Valdés Flores.

AGRADECIMIENTOS

A:

El Doctor Jesús Valdés Florez especialmente, por aceptarme en su laboratorio, por su tutoría durante todo el proceso de investigación, brindándome toda la ayuda y conocimientos necesarios.

El departamento de Bioquímica del centro de Investigación y Estudios avanzados del Instituto Politécnico Nacional por haberme abierto sus puertas para mi formación académica, resultando no sólo una casa de estudios sino una escuela de vida.

El Dr. Miguel Ángel Vargas y la Dra. Angélica Rueda y Sanchez de la Vega por la asesoría de este trabajo de maestría.

Los miembros del laboratorio 11, especialmente a José Manuel “J” y a José Martín Velazquez por su contribución conceptual y apoyo siempre que se los solicité.

Mi familia por el apoyo moral e incondicional durante estos años de mi ausencia, porque de no ser por los valores inculcados no hubiese podido enfrentar esta gran prueba.

TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN.....	4
ABSTRACT.....	6
INTRODUCCIÓN.....	9
El RNA	9
El procesamiento del pre-RNA	9
Exporte de mRNAs	11
Bioquímica de la reacción de “ <i>splicing</i> ”	12
Spliceosoma y estabilidad	14
Reparación por remoción de nucleótidos (NER).....	16
Motivos Repetidos Tetratrico-Péptido (TPRs).....	18
Splicing en <i>Entamoeba histolytica</i>	19
ANTECEDENTES	21
JUSTIFICACIÓN	25
HIPÓTESIS	26
OBJETIVO GENERAL	27
Objetivos específicos	27
ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	28
MATERIALES Y MÉTODOS.....	30
Construcción de plásmidos.....	30
Transfección de Cepa HM1-IMSS.....	31
Extracción de RNA	34
RT-PCR.....	35
RESULTADOS.....	38
Análisis <i>in silico</i> de Syf1 de <i>Entamoeba histolytica</i>	38
Herramientas moleculares para silenciar y sobreexpresar Syf1 en <i>E. histolytica</i>	40
Análisis de la expresión de Syf1 en trofozoítos de <i>E. histolytica</i> transfectados.....	43
Inmunodetección de HA-Syf1	44
Efecto de la sobreexpresión y el <i>kockdown</i> de Syf1 en el <i>splicing</i> de algunos productos génicos de <i>E. histolytica</i>	46
Transcrito del gen de <i>Actina</i>	47
Transcrito del gen de <i>Cdc2</i>	48

Transcrito del gen de <i>CIC-B1</i>	50
Transcrito del gen de <i>EhMybS6</i>	51
Transcrito del gen de <i>RabX13</i>	52
Transcrito del gen de <i>Sam50</i>	54
DISCUSIÓN	56
Án alisis <i>in silico</i> demuestran que Syf1 de <i>Entamoeba histolytica</i> está constituida por 15 motivos TPRs y no es conservada.	56
El mRNA de Syf1 de <i>Entamoeba histolytica</i> es poco abundante.	56
Transfectantes de <i>Entamoeba histolytica</i> sobreexpresaron y silenciaron la proteína Syf1 que se localizó en el núcleo.....	58
La sobreexpresión de Syf1 de <i>Entamoeba histolytica</i> disminuye el pre-mRNA de los transcritos analizados y el silenciamiento lo aumenta.	59
CONCLUSIONES	64
PERSPECTIVAS	65
BIBLIOGRAFÍA	66
APÉNDICE	72

TABLA DE FIGURAS

Figura 1. Ensamble co-transcripcional del complejo de exporte de mRNA.	12
Figura 2. Secuencia concenso de los dos tipos de intrones.	13
Figura 3. Pasos catalíticos de la reacción de splicing.	14
Figura 4. Ensamble y estabilidad del spliceosoma.	15
Figura 5. Reparación por remoción de nucleótidos (NER) en células animales.	17
Figura 6. Distribución y estructura de los motivos TPRs.	19
Figura 7. Los aminoácidos de la proteína XAB2 están constituidos por 15 motivos TPR.	21
Figura 8. Estrategia experimental de trabajo para el silenciamiento del gen que codifica para la proteína Syf1.	29
Figura 9. Secuencia de aminoácidos de los últimos motivos TPRs de Syf1 de <i>Entamoeba histolytica</i> alineados con cinco especies diferentes.	39
Figura 10. Syf1 de <i>Entamoeba histolytica</i> tiene 15 motivos TPRs de la Clase I.	40
Figura 11. Perfil electroforético de clones candidatas.	41
Figura 12. Evaluación del mensajero de Syf1 de <i>Entamoeba histolytica</i>	43
Figura 13. Evaluación de la expresión de Syf1 en trofozoítos de <i>Entamoeba histolytica</i> Transfectados.	44
Figura 14. Localización nuclear de Syf1 en transfectantes de <i>Entamoeba histolytica</i>	45
Figura 15. Expresión del transcrito de <i>Actina</i> en trofozoítos transfectados.	48
Figura 16. Expresión del transcrito de <i>Cdc2</i> en trofozoítos transfectados.	49
Figura 17. Expresión del transcrito de <i>CIC-B1</i> en trofozoítos transfectados.	50
Figura 18. Expresión del transcrito de <i>MybS6</i> en trofozoítos transfectados.	52
Figura 19. Expresión del transcrito de <i>RabX13</i> en trofozoítos transfectados.	53
Figura 20. Expresión del transcrito de <i>Sam50</i> en trofozoítos transfectados.	54

RESUMEN

Los mecanismos fundamentales de la regulación génica y la diversidad proteómica en eucariotas son debidos a la escisión de intrones y ligadura de exones desde el pre-mRNA. Este mecanismo se conoce como “splicing” cuya maquinaria catalítica macromolecular se llama spliceosoma. El spliceosoma consiste en cinco pequeñas partículas de ribonucleoproteínas nucleares (snRNPs), incluyendo los (U1, U2, U4, U5 y U6) y varios factores no snRNP que producen un RNA maduro. El procesamiento de pre-mRNA se produce co-transcripcionalmente ya que existe una interacción eficaz y coordinada de RNA polimerasa II con factores (Bentley, 2014). Por último, los mRNA se exportan al citoplasma a través del reclutamiento del complejo de transcripción y exporte (TREX) durante el splicing (Masuda et al., 2005).

La mayoría de los transcritos Pol II eucariotas están procesados alternativamente, mientras que eucariotas de ramificación temprana tienen pocos o ningún intrón. Curiosamente, en *Entamoeba histolytica* más de 4328 intrones en 8201 genes reportados han sido identificados (Lorenzi et al., 2010). Valdés *et al.*, en 2014, informaron de 36 factores de splicing, incluyendo Prp19, el núcleo del complejo asociado Prp19 (NTC) se requiere para la asociación estable de U5 y U6 con el spliceosome después U4 disociación (spliceosoma complejo B * activado). En la levadura, NTC comprende ocho proteínas del núcleo incluyendo Syf1 (≈94 kDa en XAB2 humana), y hasta 19 proteínas asociadas (Chan et al., 2003). Syf1 contiene 15 motivos de repetición tetrátrico péptido (TPR) y está involucrado en procesos fundamentales como la transcripción, splicing, reparación acoplada a transcripción acoplada (Kuraoka et al., 2008) y exporte del mRNA mediado por THEX (Chanarat et al., 2011). Debido a que se sabe poco de mecanismo de la eliminación y la retención intrónica en *Entamoeba histolytica*, nos dispusimos a dilucidar las posibles funciones de la proteína Syf1 (≈83 kDa) como parte de la NTC en el procesamiento de pre-mRNAs en este parásito.

Se encontró *in silico* que la proteína Syf1 en *E. histolytica* también se compone de 15 TPRs y se demostró *in vivo* que la sobreexpresión y silenciamiento de Syf1 produce, respectivamente, una disminución o la acumulación de diferentes transcritos pre-mRNA, consistentemente con su localización nuclear. Nuestros resultados sugieren que Syf1

participa en el mecanismo de splicing amibiano, probablemente como un componente de NTC.

ABSTRACT

The fundamental mechanisms of gene regulation and proteomic diversity in eukaryotes are due to introns excision and exons ligation from the pre-mRNA. This mechanism is known as splicing whose macromolecular catalytic machinery is called spliceosome. The spliceosome consists of five small nuclear ribonucleoprotein particles (snRNPs), including the uridine-rich snRNAs (U1, U2, U4, U5 and U6) and several non-snRNP factors that produce a mature mRNA. Pre-mRNA processing occurs co-transcriptionally since there is an efficient and coordinated interaction of RNA with polymerase II factors (Bentley, 2014). Lastly, the mRNAs are exported to the cytoplasm through recruitment of the transcription complex and Export (TREX) during splicing (Masuda et al., 2005).

Most eukaryotic Pol II transcripts are alternatively spliced, while in early branched eukaryotes have few or any intron. Interestingly, in *Entamoeba histolytica* more than 4328 introns within 8201 reported genes have been identified (Lorenzi et al., 2010). Valdes *et al*, in 2014, reported 36 splicing factors, including Prp19, the core of the Prp19 associated complex (NTC) which is required for the stable association of U5 and U6 with the spliceosome after dissociation U4 (spliceosome activated complex B *). In yeast, NTC comprises eight core proteins including Syf1 (\approx 94 kDa in human XAB2), and up to 19 associated proteins (Chan et al., 2003). Syf1 contains 15 reasons of tetratricopeptide repeat motifs (TPRs) and is involved in fundamental processes such as transcription, splicing, transcription coupled repair (Kuraoka et al., 2008) and TREX mediated mRNA export (Chanarat et al., 2011). Because little is known about intron removal mechanism and intron retention in *Entamoeba histolytica*, we aim to elucidate the possible functions of the Syf1 protein (\approx 83 kDa) as part of NTC in the processing of pre-mRNAs in this parasite.

We found *in silico* that Syf1 protein of *E. histolytica* is also composed of 15 TPRs and was demonstrated *in vivo* that Syf1 overexpression and silencing produces, respectively, a decrease or accumulation of different pre-mRNA transcripts, in agreement with its nuclear localization. Our results suggest that Syf1 participates in the amebic splicing mechanism, probably as a component of NTC.

ABREVIATURAS

- ATRA: ácido trans-retinoico, del inglés “*all-trans retinoic acid*”
- DNA: ácido desoxirribonucleico, del inglés “*deoxyribonucleic acid*”
- BSA: suero bovino adulto, del inglés “*bovine serum albumin*”
- BPS: secuencia del punto de ramificación, del inglés “*branch point sequence*”
- bp: pares de bases
- cDNA: DNA complementario, del inglés “*complementary DNA*”
- CCCH (Zn): motivo de unión a zinc
- CFI: factor de corte I
- CFII: factor de corte II
- CPSF: factor específico de corte y poliadenilación
- CStF: factor estimulador de corte.
- CTD: dominio carboxilo-terminal, del inglés “*carboxi Terminal Domain*”
- GGR: reparación global del genoma, del inglés “*global genome repair*”.
- GMP: monofosfato de guanosina, del inglés “*guanosine monophosphate*”
- GTP: trifosfato de guanosina, del inglés “*guanosine triphosphate*”
- iRNA: RNA de interferencia, del inglés “*interference RNA*”
- kDa: kilo Daltones.
- mRNA: RNA mensajero, del inglés “*messenger RNA*”
- nt: nucleótidos.
- NER: Reparación por encisión de nucleótidos, del inglés “*nucleotide excision repair*”
- nt: nucleótidos.
- NTC: complejo diecinueve, del inglés “*NineTeen Complex*”.
- OH: hidroxilo
- PAP: polimerasa poli(A).
- PAPII: Proteína poli(A) con un motivo RNP.
- PCR: Reacción en cadena de la polimerasa, del inglés “*Polymerase Chain Reaction*”
- Pol II: RNA polimerasa II

pre-mRNA: precursor del RNA mensajero, del inglés “*precursor messenger RNA*”

pY: Tracto de polipirimidinas

rRNAs: ácido ribonucleico ribosómicos

RNA: ácido ribonucleico, del inglés “*Ribonucleic acid*”

Rpm: Revoluciones por minuto

RRM: Motivo de reconocimiento al RNA, del inglés “*RNA Recognition Motif*”

RRS: Recuperación de la síntesis de RNA, del inglés “*recovery of RNA synthesis*”

RS: Dominio rico en Serina y argininas

RT: Retro transcripción

siRNA: RNA de interferencia pequeño, del inglés “*small interfering RNA*”

SF1: Factor de splicing 1, del inglés “*Splicing Factor 1*”

snRNP: Ribonucleoproteína pequeña nuclear, del inglés “*small nuclear RiboNucleoProtein*”

snRNA: RNA pequeño nuclear, del inglés “*small nuclear RNA*”

SOB: medio súper óptimo

ss: sitio de *splicing*

TCR: reparación acoplada a transcripción, del inglés “*transcription-coupled repair*”

THEX: complejo de transcripción y exporte del inglés “*transcription and export*”

THO: supresores de los defectos de transcripción genética por la sobreexpresión de hpr1Δ, del inglés “*suppressors of the transcription defects of hpr1 Δ mutants by overexpression*”

TPRs: Motivos de Repetición Tetratríco-Péptido, del inglés “*tetratricopeptide repeat*”

tRNA: ácido ribonucleico de transferencia, del inglés “*tranference RNA*”

U: uridina

UDS: Síntesis de DNA no programada, del inglés “*unscheduled DNA synthesis*”

U2AF: Factor auxiliar de splicing de U2, del inglés “*U2 Auxiliary Factor*”

XAB2: proteína dos de unión a XPA, del inglés “*XPA-binding protein 2*”

INTRODUCCIÓN

El RNA

La expresión génica y la síntesis de proteínas es dependiente del RNA, este último ha sido catalogado como un componente activo responsable de la conservación y la expresión de la información genética. Diferentes tipos de RNA se encuentran en las células, el mRNA conforma un intermediario que aporta la copia de una secuencia de DNA que representa proteínas, los tRNA son pequeñas moléculas de RNA que se usan para proveer los aminoácidos correspondientes a cada codón específico del mRNA y los rRNA necesarios para conformar un complejo ribonucleoproteínico de gran tamaño que contiene bastantes proteínas que median el mecanismo para polimerizar los aminoácidos en una cadena polipeptídica (Lewin, 2008).

En eucariontas, el pre-mRNA está conformado por las secuencias que codifican los aminoácidos (exones) y están interrumpidas por secuencias no codificantes (intrones). El número de éstos en un gen cambia ampliamente de una especie a otra y, junto con otros factores parece reflejar la complejidad de un organismo. Sólo alrededor del 4% de todos los genes en *Saccharomyces cerevisiae* contienen un intrón y seis genes tienen dos intrones (Lopez and Séraphin, 2000). Los genes humanos tienden a tener pequeños exones (que codifica un promedio de sólo 50 codones) y están separados por intrones largos (algunos superior a 10 kb) por lo que los exones tienen en promedio 7.8 intrones (Lander et al., 2001).

El procesamiento del pre-RNA

El procesamiento del pre-mRNA requiere varios pasos: capping, splicing y poliadenilación. Las secuencias de DNA (genes) se transcriben en copias de mRNA por la RNA polimerasa llamado precursor del RNA mensajero (pre-mRNA) el cual contiene intrones de un transcrito primario. Tanto la transcripción como la traducción son dos procesos altamente regulados, sus protagonistas son la RNA polimerasas, los promotores y los elementos reguladores, potenciadores o silenciadores de cada gen. La modificación postranscripcional y el tratamiento del pre-mRNA se procesa en el núcleo a un RNA maduro (Maniatis and Reed,

2002; Guasconi and Yahi 2003). El RNA naciente una vez que alcanza una longitud de 25 a 30 nucleótidos (nt) se le añade un residuo de 7-metilguanosina al extremo 5', la enzima dimérica de capucha (capping) cataliza este proceso en tanto que está asociada con el dominio carboxilo-terminal (CTD) fosforilado de la RNA polimerasa II. La otra subunidad traslada la mitad de GMP proveniente del GTP al grupo 5'-difosfato del transcrito naciente, lo que crea una estructura 5'-5'-trifosfato guanosina que por acción de metiltransferasas transfieren el grupo metilo del S-adenosilmetionina la posición N7 de la guanina y los oxígenos en la posición 2' de la ribosa al final del extremo 5' del RNA naciente, dando lugar al cap-0. Esta es la estructura mínima indispensable que provee resistencia a la degradación (Lodish, et. al. 2000).

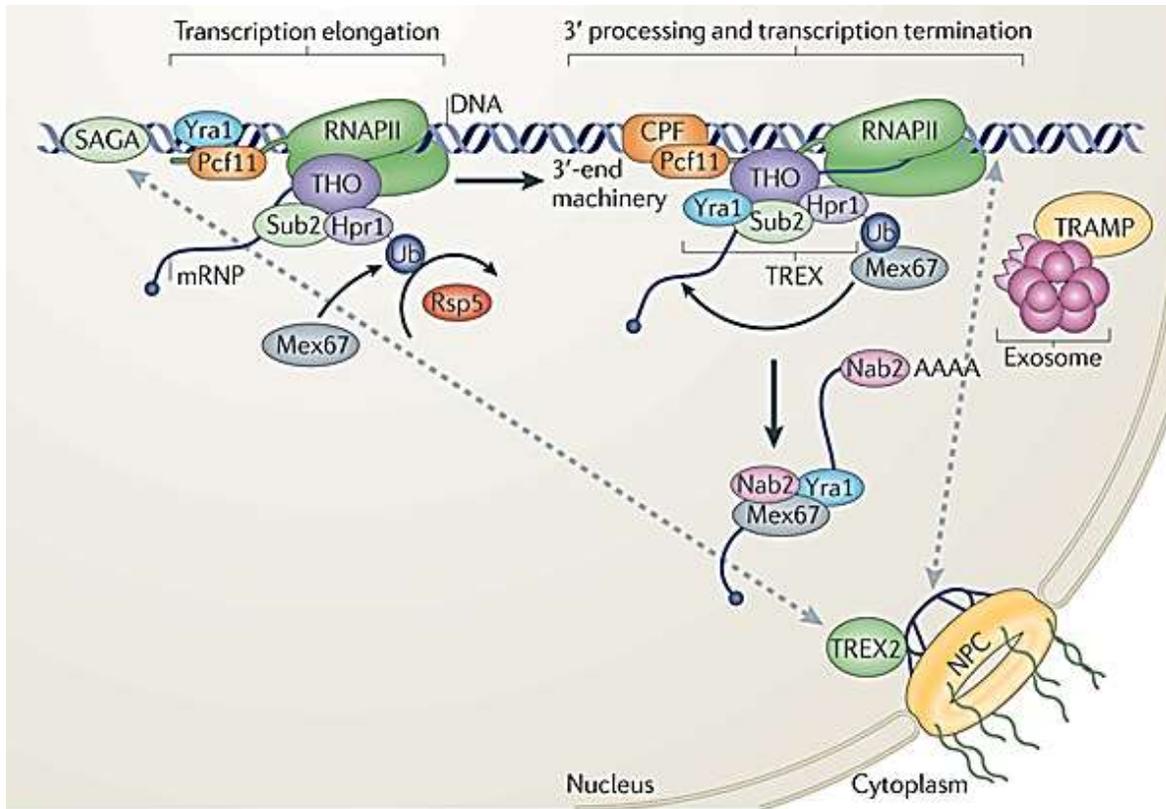
Durante el splicing, debido a que la estructura de la mayoría de los genes eucariontes es discontinua, son eliminadas las secuencias que interrumpen el gen o intrones y la ligadura de los exones abre el marco de lectura para asegurar su correcta expresión. El splicing del pre-mRNA es catalizado por la spliceosoma que se compone principalmente de cinco partículas ribonucleoproteínas nucleares pequeñas ricas en uridina (snRNPs) U1, U2, U4, U5 y U6 (Jurica and Moore, 2003). Cada snRNP contiene un único snRNA y un conjunto de proteínas snRNP. La activación del spliceosoma requiere que snRNPs junto con numerosos factores no snRNP se ensamblen sobre el sustrato de pre-mRNA de una manera ordenada por cada vez que se requiera el procesamiento. La escisión precisa de un intrón y la ligadura de los exones se lleva a cabo por dos reacciones de transesterificación que involucran el sitio de splicing 5' (5'ss), al punto de ramificación (BPS) y el sitio de splicing 3' (3'ss) (Brow, 2002; Wahl and Lührmann, 2015). En el último paso de procesamiento el extremo 3' del pre-mRNA se corta y se le añaden numerosos nucleótidos de adenina, llamados cola poli-A. Este proceso se lleva a cabo por la formación de un complejo inestable con el factor específico de corte y poliadenilación (CPSF) de 360 kDa el cual está constituido por cuatro polipéptidos reclutados en la caja AAUAAA río arriba de los elementos con una secuencia rica en A. Al complejo de CPSF-RNA se le une el factor estimulador de corte (CStF) de 200 kDa, el heterodímero llamado factor de corte I (CFI) de 150 kDa y un segundo factor de corte (CFII). La poli(A) polimerasa (PAP) se une al complejo antes de la degradación endonucleolítica 35 nt río abajo de la caja AAUAAA y de esta manera el sitio 3' generado es rápidamente

poliadenilado. Una vez unida a la cola pequeña de adeninas adicionada por PAP, estimula la polimerización de adeninas adicionales. Por tanto, la poliadenilación es la adición lenta de aproximadamente 12 residuos de adenina y la adición rápida de 200 a 250 residuos por la unión de copias múltiples de la proteína de unión de poli(A) (PABII) con un motivo RNP, cuando se alcanza una longitud de 200 a 250 residuos PABII se influye a que PAP finalice la polimerización (Lodish *et al.*, 1999).

Exporte de mRNAs

El complejo transcripción y exporte (TREX) está involucrado directamente en el transporte de mRNA desde el núcleo hasta el citoplasma. Está altamente conservado de levadura al ser humano y se compone por el complejo THO junto con proteínas de exporte de mRNA UAP56 (Sub2 en la levadura) y Aly (Yra1 en la levadura). Estudios en *S. cerevisiae* proporcionan una fuerte evidencia que relaciona el complejo TREX con la elongación de la transcripción. El reclutamiento co-transcripcional de la maquinaria de exportación de mRNA en mamíferos indica que el complejo TREX se une a la maquinaria de splicing lo que sugiere que el complejo es reclutado durante una etapa tardía del mismo (Reed and Cheng, 2005).

También en levadura, el complejo THO está asociado con el mRNA naciente durante la transcripción lo que muestra que participa tanto en su elongación y como en el exporte del mRNA (Figura 1) porque cepas que tienen mutaciones en los genes que codifican cualquiera de los cuatro miembros del complejo THO tienen defectos en ambos procesos y muestran una acumulación de transcritos en o cerca de sus sitios de transcripción (Carmody and Went, 2009). Se ha demostrado también que HPR1 interactúa directamente con Sub2 y es necesario para la contratación de Sub2 e Yra1 al mRNA (Zenklusen *et al.*, 2002). En humanos, todos los componentes del complejo THO están asociados con spliceosomas purificados (Jurica and Moore, 2003).



Nature Reviews | Molecular Cell Biology

Figura 1. Ensemble co-transcripcional del complejo de exporte de mRNA.

THO interacta con (UAP56 en mamíferos) y con Yra1 (ALY o REF en mamíferos) para formar el complejo TREX, este se acopla a Mex67 que permite el acceso al complejo de poro nuclear (NPC). La precisión de este reordenamiento es controlada por el complejo nuclear exosoma TRAMP (Tutucci and Stutz, 2011).

Bioquímica de la reacción de “*splicing*”

Durante el *splicing*, un paso crítico es el reconocimiento de los límites intrón-exón, con una variación de un nucleótido en un sitio se podría generar un RNA no funcional. Para garantizar la correcta identificación de los sitios de *splicing*, los intrones tienen secuencias altamente conservadas en sus extremos 5' ss, 3' ss y en el BPS. Con base en éstas se diferencian dos tipos de intrones: tipo GT-AG, que en su mayoría son el 99% de los intrones (Figura 2), tienen un sitio 5' ss compuesto por ocho nucleótidos altamente conservados, el 3' ss, un BPS proximal y mantiene un tracto de polipirimidina que se encuentra entre el sitio 3' ss y el BPS (Reed, 1989). El BPS de éstos intrones tiene una secuencia consenso YNYURAC (en negrita

se representa la adenosina altamente conservada que media la primera reacción de transesterificación).

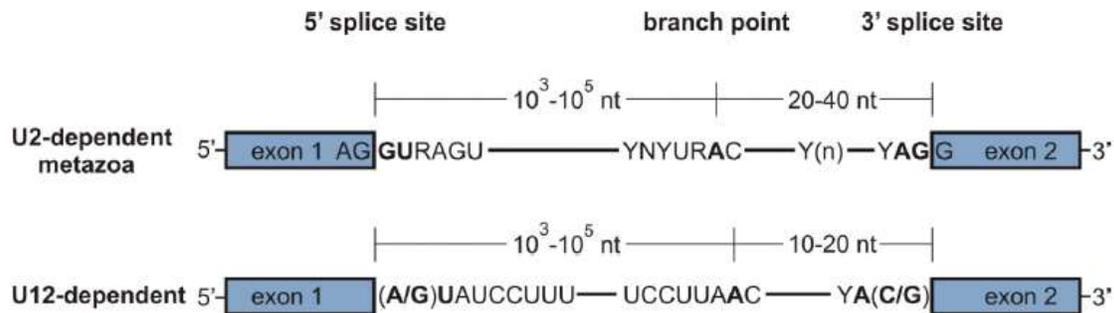


Figura 2. Secuencia consenso de los dos tipos de intrones.

Las secuencias de consenso de los sitios 5' y 3' de splicing, se muestran el punto de ramificación (BPS) y el tracto polypyrimidine (Y(n)). Los nucleótidos altamente conservados se muestran en negrita. Y: pirimidina, R: purina, N: cualquier nucleótido. Los exones se muestran como cajas, intrones se representan por una línea. Los valores numéricos por encima de los intrones informan sobre la duración media de nucleótidos (nt). (Tomado de Matlin et al., 2005)

En el segundo tipo de exones hay di-nucleótidos AT-AC terminales, principalmente se encuentran en metazoos y están ausentes en levaduras y nemátodos (Patel and Steitz, 2003), y conforman sólo el 0.4% de los intrones en humanos (Levine and Durbin, 2001).

Como se había mencionado que el BPS contiene la adenosina específica que actúa como el nucleófilo, en la primera reacción catalítica de splicing el grupo 2'-hydroxyl (OH) de ésta ataca al enlace fosfodiéster del sitio 5'ss que resulta en un producto intermediario en forma de lazo (lariat) y el exón 1 con un grupo hidroxilo 3'-OH libre (Figura 3). En la segunda reacción catalítica, el grupo OH libre del exón 1 ataca nucleofílicamente al enlace fosfodiéster del 5'ss frente al exón 2 produciéndose la ligación de ambos exones y la liberación del producto lariat el cual es degradado por la enzima DBR1 (Montemayor et al., 2014).

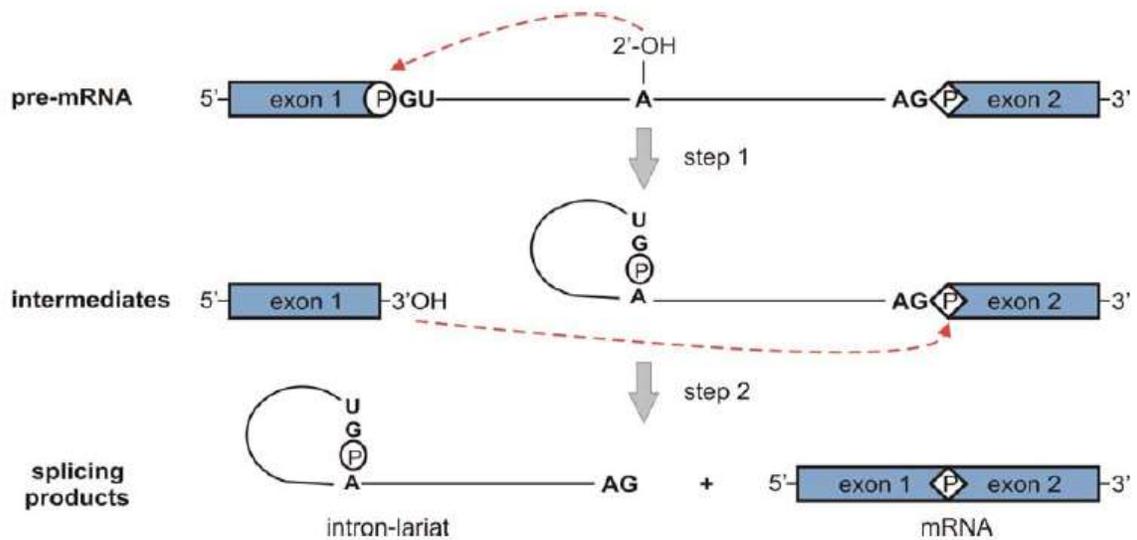


Figura 3. Pasos catalíticos de la reacción de splicing.

En la primera etapa de la reacción de splicing, el grupo 2'-OH de la adenosina del sitio de ramificación lleva a cabo un ataque nucleofílico al enlace fosfodiéster del 5' ss. En la segunda etapa, el resultante grupo 3'-OH libre del exón 1, realiza otro ataque nucleofílico al sitio límite de la unión del intrón y el exón 2. En rojo se muestran estos ataques (Tomado de Matlin et al., 2005).

Spliceosoma y estabilidad

El spliceosoma es un complejo enzimático dinámico que media las interacciones de transesterificación durante el procesamiento del pre-mRNA. Éste se reordena antes, durante y después de la reacción de splicing con la salida y entrada de snRNAs y proteínas no snRNP. En resumen, su ensamblaje comienza por la interacción independiente U1 con el sitio 5' ss conformando el complejo temprano o complejo E (Chanarat and Sträßer, 2013). Seguidamente se lleva a cabo la formación del complejo A o prespliceosoma en donde la snRNP U2 se asocia con el BPS, en una reacción que depende de ATP (Figura 4). En éste punto el factor bipartita U2AF reconoce principal y específicamente el pY y facilita el reclutamiento de snRNP U2 con el sitio de ramificación del pre-mRNA. En humanos, U2AF está conformado por una subunidad grande (U2AF65) y una subunidad pequeña (U2AF35). La subunidad U2AF65 junto con el factor de splicing 1 (SF1) reconocen simultánea y cooperativamente secuencias de consenso del BPS y el ensamblaje de U2 (snRNP). U2AF65 contiene en el N-terminal un dominio rico en serina/arginina, una región rica en Prolina (P) y tres motivos de reconocimiento al RNA (RRM), mientras que U2AF35 quien reconoce el

3' ss comprende cuatro dominios, un RRM central está flanqueado por dos dominios de unión a zinc CCCH (Zn) y un dominio RS en el C-terminal (Wu et al., 1999).

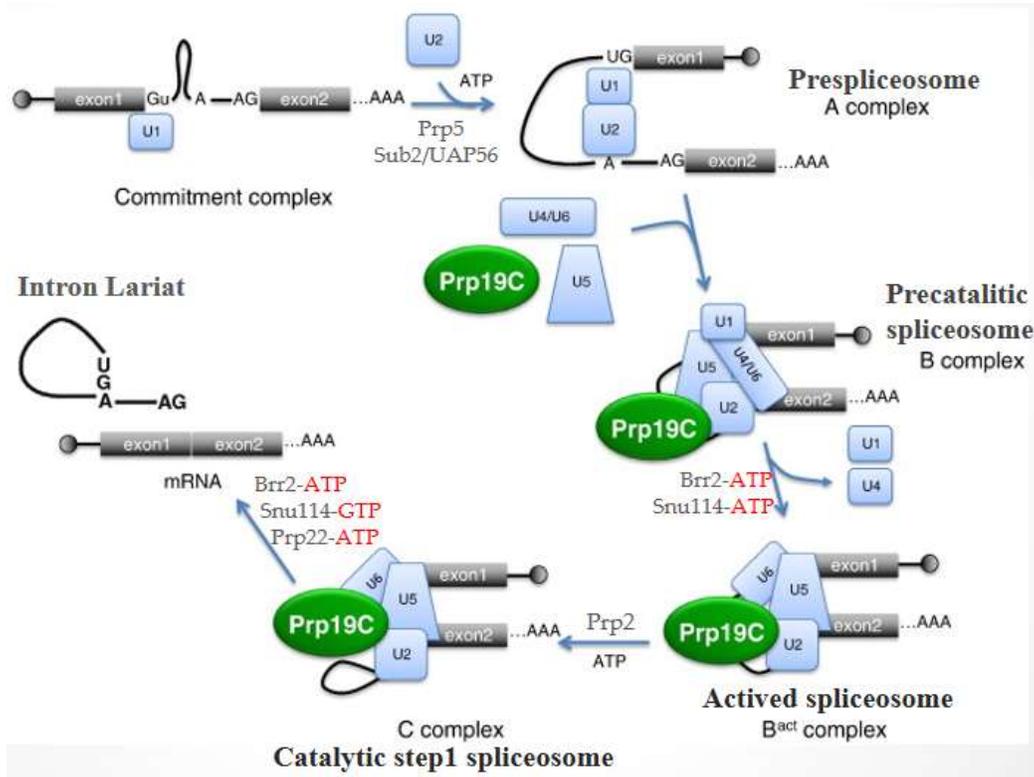


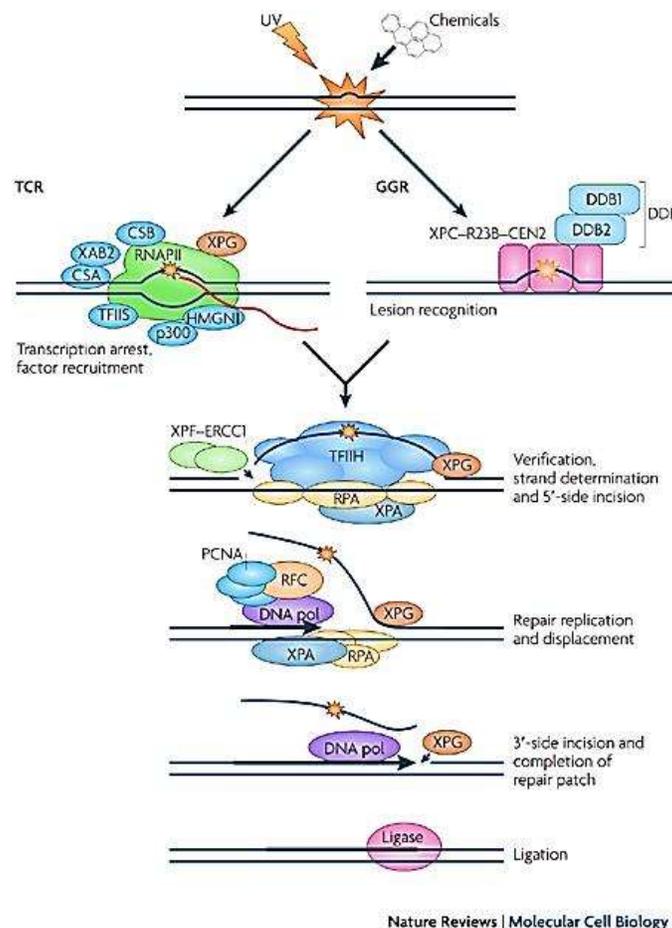
Figura 4. Ensamblaje y estabilidad del spliceosoma.

El reordenamiento spliceosomal está determinado por la interacción de los snRNPs. La estabilidad incluye el NTC (Prp19) para la unión estable de U5 y U6 con el spliceosoma después la disociación de U4 (Complejo B* act) Modificado Chanarat and Sträßer, 2013.

El complejo B o spliceosoma precatálítico se conforma mediante la integración del tri-snRNP U4/U6.U5 el cual se estabiliza con el complejo Prp19. La salida de U1 y U4 conforma el spliceosoma activado o Complejo B* activado, al menos dos hélices de snRNA U2/U6 junto con el tallo de U5 snRNA y la hélice intra molecular U6 participan en el sitio spliceosomal activo para conformar el spliceosoma catalítico o complejo C que llevan a cabo las reacciones de transesterificación (Lee and Rio, 2015).

En levaduras, PRP19 es el componente reclutador (junto con ocho proteínas centrales como Syf1/XAB2 de 94 kDa) de hasta 19 proteínas asociadas (Tabla 1) para conformar el complejo diecinueve (NTC). En *H. Sapiens*, es llamado CDC o Complejo Prp19-CDC5, éste ha sido

lo estabiliza), helicasas (XPB y XPD), proteína de replicación A (RPA) y XPA. Estas últimas proteínas pueden estar presentes antes y/o después de la aparición de TFIIH ya que tienen papeles en la verificación de la lesión y en la protección de la cadena de DNA por la acción de las helicasas. También el complejo de endonucleasa XPF-ERCC1 es reclutado y media la incisión de 24-32 nt de la cadena de DNA dañada junto con XPG. Posteriormente, la polimerasa realiza la elongación y una ligasa de DNA hace el empalme. En particular, los estudios *in vivo* recientes han proporcionado pruebas sólidas de que una vez que se ha producido la verificación de la lesión, la incisión lado 5' se realiza y la reparación se inicia antes de la incisión del lado 3', reduciendo al mínimo la exposición del DNA de una sola hebra durante la reparación (Hanawalt and Spivak, 2008).



Nature Reviews | Molecular Cell Biology

Figura 5. Reparación por remoción de nucleótidos (NER) en células animales.

Dos vías convergen para la reparación por daño en el DNA, al lado derecho GGR (reparación global del genoma) y al lado izquierdo TCR (reparación acoplada a transcripción) (Hanawalt and Spivak, 2008).

Motivos Repetidos Tetratrico-Péptido (TPRs)

Los TPRs son secuencias de 34 aminoácidos que se organizan en forma de tándem y conforman dos hélices α antiparalelas anfipáticas (Lamb et al., 1995). La figura 6 muestra la secuencia de alineamientos de 5 TPRs de distintas proteínas, el consenso de estas secuencias indican que están altamente conservados aminoácidos hidrofóbicos (Figura 6A) y son los que median la interacción de la hélice α A (aminoácidos: W, L, G y Y en las posiciones 4,7, 8 y 11) y hélice α B (aminoácidos: A, F, A y P en las posiciones 20, 24, 27 y 32 Figura 6B). Estos motivos se han reportado en distintas proteínas que controlan el ciclo celular, proteínas chaperonas, proteínas de transporte entre otras (Blatch and Lässle, 1999).

A.

		4	7	8	11		20	24	27	32
		W	L	G	Y		A	F	A	P
Consensus		---	L	---	I	A	---	L	---	S
		Y	MS	F			E	L	L	E
mSTI1	300	A	K	A	V	A	R	I	G	S
PP5	28	N	E	E	L	T	Q	A	N	D
Cyp40	226	S	E	D	L	K	N	I	G	N
FKBP52	273	S	A	T	V	K	F	H	T	V

B.

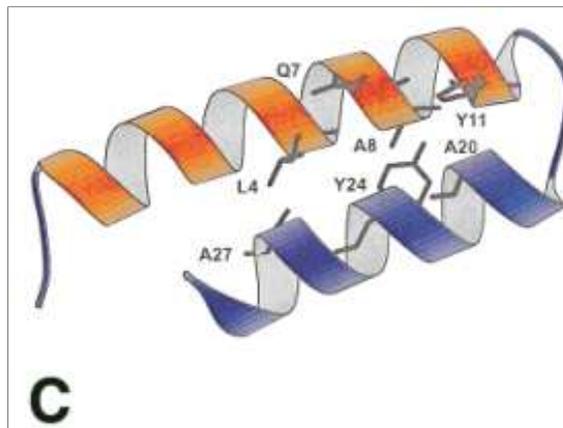
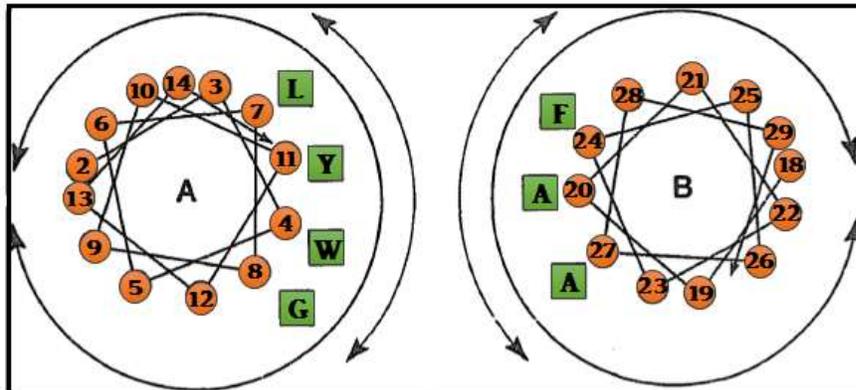


Figura 6. Distribución y estructura de los motivos TPRs.

- A. Secuencia de alineamiento de cinco motivos TPRs de proteínas, la secuencia consenso se muestra en la parte superior. Las cajas muestran los aminoácidos hidrofóbicos que se conservan o se cambian por aminoácidos de la misma naturaleza.
B. Diagrama propuesto por (Schiffer and Edmundson, 1967) que muestra las posiciones de los aminoácidos consenso entre las Hélices α A y B de un motivo TPR que se encuentran en la fase hidrofóbica de la predicción de las hélices alifáticas.
C. Primer motivo TPR de la proteína PP5, se ilustra el rol de los residuos consenso altamente conservados.

El análisis estructural de la proteína PP5 una vez cristalizada provee información sobre la organización de los motivos TPRs que la constituyen, por tanto, se puede apreciar que en la posición 32 con frecuencia corresponde a aminoácidos de residuos hidrofóbicos pequeños (Prolina principalmente) y que en las otras posiciones se ubican aminoácidos grandes también hidrofóbicos. Los residuos de los aminoácidos en las posiciones 8 y 20 son los que se encuentran en la posición de contacto más estrecho entre la hélices α A y la B en un TPR (Das et al., 1998). Dada la conformación estable de los bucles que forman estos motivos se ha presumido que sirven para la estabilidad de multicomplejos proteínicos por interacciones entre proteína-proteína. Diferentes variantes de estos motivos conforman su clasificación, un residuo de triptófano en la posición 3 está bien conservado entre las clases I y II, cuando no se conserva casi siempre se reemplaza por otro residuo hidrofóbico como en la clase III. También las diferencias incluyen los residuos 6 y 7, que son tirosina y la alanina en unidades de clase I y leucina y glicina en las clases II y III. Tirosina/leucina y glicina/alanina se puede considerar sustituciones conservadas. Otros residuos de las posiciones 11 y 12 en la clase I son residuos de ácido glutámico ambos, mientras que en los de Clase III corresponde a residuos de leucina y fenilalanina, también hay un cambio en la arginina en la posición 21 en la clase I por isoleucina en los de la clase II y III (Sikorski et al., 1991).

Splicing en *Entamoeba histolytica*

Los eucariontas de ramificación temprana tienen pocos o ningún intrón. Interesantemente, en *E. histolytica* se han identificado hasta 4328 intrones dentro de los 8201 genes reportados (Lorenzi et al., 2010). Este parásito protozoario es el agente causal de la amibiasis que actualmente es una de las tres causas más comunes de muerte por enfermedad parasitaria. El ciclo de vida de éste se conforma de una etapa infecciosa (quiste) y una etapa de multiplicación (trofozoíto). Los seres humanos se infectan al ingerir quistes infecciosos, que viajan a través de la luz intestinal del intestino delgado (íleon terminal) hasta la formar cada

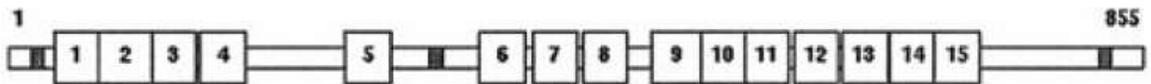
uno ocho trofozoítos. Los trofozoítos son las formas móviles que se adhieren e invaden las células epiteliales (Tanyuksel et al., 2003).

El genoma de *E. histolytica* ha revelado que hay una variedad de adaptaciones metabólicas compartidas con otros dos patógenos protistas mitocondriales como *Giardia lamblia* y *Trichomonas vaginalis* (Loftus et al., 2005). Aunque organismos de ramificación temprana como bacterias y archeas carecen de la vía spliceosomal y emplean el auto-*splicing* de intrones; organismos como hongos hemiascomicetos (Schwartz et al., 2008) y *E. histolytica* tienen procesamiento de pre-mRNA (Davis et al., 2007).

En *Entamoeba histolytica* se ha reportado que están bien conservados los 5'ss (GUUUGU) y 3'ss (UAG) pero los BPS no (Wilihoeft et al., 2001). También se ha revelado que sólo una pequeña fracción de isoformas alternativas de splicing y poliadenilación son poco probables y que numerosos productos de splicing carecen de conservación en el BPS y 3'ss lo que implica la relevancia funcional de splicing alternativo y poliadenilación (Hon et al., 2013). Otros estudios, han informado que los pre-mRNAs son mono-intrónicos en concordancia con análisis bioinformáticos que predicen la retención intrónica como principal ruta de splicing alternativo (McGuire et al., 2008), además análisis más recientes han identificado los snRNAs U2, U4, U5 and U6 (Miranda et al., 1996; Davis et al., 2007) y 32 factores de splicing específicos (Valdés et al., 2014).

ANTECEDENTES

La proteína Syf1 está ampliamente estudiada en humanos, se conoce como XAB2 y se caracteriza por ser altamente conservada en distintas especies como *D. melanogster*, *C. elegans*, *S. Pombe* y *S. cerevisiae* (Nakatsu et al., 2000). Principalmente está conformada por 855 aa (≈ 94 kDa) los cuales constituyen 15 motivos TPRs de la Clase I (Figura 7), por tanto, se ha sugerido que Syf1 es una proteína importante para la formación de complejos proteínicos.



B

TPR1	V	K	C	V	L	R	Y	I	-	E	F	K	Q	G	A	P	-	-	-	K	P	R	L	N	Q	L	Y	E	R	A	L	K	L	L	-	-	E	C	S	(35-67)	
TPR2	Y	K	L	V	Y	R	Y	L	K	A	R	R	A	Q	V	K	H	P	A	Y	E	D	V	N	H	C	H	E	R	A	F	V	F	M	-	-	H	K	M	(68-109)	
TPR3	P	R	L	V	L	D	Y	C	-	Q	F	L	M	D	Q	G	-	-	R	V	T	H	T	R	R	T	F	D	R	A	L	R	A	M	-	-	F	I	T	(110-143)	
TPR4	S	R	I	V	P	L	Y	L	-	R	F	L	R	S	H	P	-	-	L	P	E	T	A	V	R	G	Y	R	R	F	L	K	L	S	-	-	P	E	S	(146-179)	
TPR5	G	K	L	V	C	S	L	A	-	D	Y	Y	I	R	S	G	-	-	H	F	E	K	A	R	D	V	Y	E	E	A	I	R	T	V	-	-	M	T	V	(256-289)	
TPR6	V	H	E	V	H	K	R	V	-	A	L	H	Q	G	R	P	-	-	-	R	E	I	I	N	T	Y	I	E	A	V	Q	T	V	D	-	-	P	F	K	(357-389)	
TPR7	H	T	L	V	V	A	F	A	-	K	F	Y	E	D	N	G	-	-	Q	L	D	D	A	R	V	I	L	E	K	A	T	K	V	H	-	-	F	K	Q	(395-428)	
TPR8	A	H	V	V	C	Q	C	G	-	E	L	E	L	R	H	E	-	-	N	Y	D	E	A	L	R	L	L	R	K	A	T	A	L	-	-	-	P	A	R	(432-465)	
TPR9	L	K	V	S	M	L	A	-	D	L	E	E	S	L	G	-	-	T	F	Q	S	T	K	A	V	Y	D	R	I	L	D	L	R	-	-	I	A	T	(484-517)		
TPR10	P	Q	I	V	I	N	Y	A	-	M	F	L	E	E	H	K	-	-	Y	F	E	E	S	F	K	A	Y	E	R	G	I	S	L	F	K	V	P	N	V	(518-553)	
TPR11	S	D	I	V	S	T	Y	L	T	K	F	I	A	R	Y	G	G	R	K	L	E	R	A	R	D	L	F	E	Q	A	L	D	G	C	-	-	F	P	K	(554-590)	
TPR12	K	T	L	Y	L	L	Y	A	-	Q	L	E	E	E	V	G	-	-	L	A	R	H	A	M	A	V	Y	E	R	A	T	R	A	V	E	-	-	P	A	Q	(593-627)
TPR13	Y	D	M	F	N	I	X	I	K	R	A	A	E	I	Y	G	-	-	V	T	H	T	R	G	I	Y	Q	K	A	I	E	V	L	-	-	S	D	E	(629-662)		
TPR14	R	E	M	C	L	R	F	A	-	D	M	E	C	K	L	G	-	-	E	I	D	R	A	R	A	I	Y	S	F	C	S	Q	I	C	D	-	-	R	R	T	(665-699)
TPR15	G	A	F	V	Q	T	V	K	-	D	F	E	V	R	H	G	-	-	N	E	D	T	I	K	E	M	L	R	I	R	S	V	Q	-	-	A	T	Y	(701-734)		

C

cons. XAB2	.	K	I	V	L	.	Y	A	D	F	E	E	.	G	.	.	E	H	A	R	.	I	Y	E	R	A	L	K	L	V	P	.	.	
Class I TPR	V	K	L	V	I	K	Y	A	-	F	E	E	-	L	.	E	-	D	R	A	R	-	I	Y	E	R	A	L	E	-	-	P	-	D
Class II TPR	.	N	A	V	-	-	L	G	N	-	Y	S	-	L	Q	E	H	-	K	A	I	Y	C	F	-	R	A	I	-	-	P	-	-	
Class III TPR	A	A	L	G	H	A	L	F	-	A	G	D	Y	D	E	A	I	.	A	Y	R	K	A	L	E	L	E	.	.	N

Figura 7. Los aminoácidos de la proteína XAB2 están constituidos por 15 motivos TPR.

A. Representación esquemática de la proteína XAB2. Las cajas abiertas con los números indican los motivos de TPR y regiones ácidas, respectivamente. B. Alineamiento de las secuencias de TPR. Las 15 repeticiones en la proteína predicha XAB2 fueron alineadas, en sombreado oscuro se encuentran los residuos de aminoácidos que se encuentran en más de ocho de los 15 motivos; sombreado claro, sustituciones conservadoras se encuentran en más de siete de las 15 repeticiones. Las sustituciones se basaron en los siguientes grupos: Phe, Tyr y Trp; Ser, Thr, Ala, Gly, y Pro; Ile, Leu, Val y Met; Asp, Glu, Asn, y Gln; y Arg, His, Lys y regiones faltantes en las alineaciones se indican mediante guiones. A la derecha se encuentra la numeración que corresponde a las posiciones de aminoácidos en donde se encuentra cada secuencia de los TPRs. C. Secuencia de consenso de los TPRs en XAB2. La secuencia de consenso XAB2 está alineado con el consenso de las tres clases de TPRs reportados por Sikorski et al., 1991. Los residuos que se encuentran con más frecuencia en cada posición en

los TPRs de XAB2 se utilizaron en la secuencia consenso de XAB2 y las posiciones más variables están representados por puntos.

Como proteína de andamiaje puede ser multifuncional para distintos procesos celulares. En humanos, ha sido descrita como un factor importante en el reclutamiento de la maquinaria de NER, ensayos de pull down revelan que XAB2/Syfl interacciona específicamente con CSB y RNA Pol II. También con la microinyección de anticueros Anti-XAB2FL y Anti-XAB2C (parte carboxilo de 694-855 aa) en células normales humanas se inhibe la recuperación de la síntesis de RNA después de irradiación con UV al igual que la transcripción, pero no la síntesis de DNA no programada, esto indica que es una proteína que se encuentra involucrada específicamente en la vía TCR y en la transcripción, pero no en la vía GGR.

En células HL60 (células humanas de leucemia promielocítica) Kuraoka et al., 2008 demostraron que XAB2/Syfl tiene un efecto inhibitorio en la diferenciación celular inducida por ácido trans-retinoico (ATRA) debido a que está asociada con el complejo correpresor que une RAR y HDAC3 para reprimir la actividad transcripcional. Los receptores RAR-RXR (receptor de ácido retinoico ó Receptor retinoide X) en ausencia del ligando ATRA reprime los genes blanco de programas de diferenciación celular debido al reclutamiento de complejos que contienen HDAC atado através de co-represores. Interesantemente, XAB2 inhibe la diferenciación celular en presencia de ATRA por la disminución del mRNA de genes de diferenciación CYP26 y RAR β . Simultáneamente, ensayos de inmunoprecipitación indican que hay interacción directa entre el receptor RAR, XAB2 y HDAC y se pierde por el tratamiento con ATRA lo que indica que XAB2 tiene una participación en la diferenciación. Por el contrario, el tratamiento con ATRA en un *knockdown* de XAB2 por siRNA aumenta los mRNAs de los genes de diferenciación con el tratamiento. De esta manera, XAB2, aunque se asocie al complejo represor que continene HDAC3 por sí sola puede alterar la diferenciación celular mediada por ATRA y puede ser un objeto de estudio en la terapia del cáncer.

Kuraoka et al., 2008 ha demostrado por espectrometría de masas e inmunodetección que XAB2/Syfl está interactuando con proteínas claves del complejo PRP19 (hAquarius, hPRP19, CCDC16, hISY1 y PPIE), este complejo es requerido para la asociación estable de U5 y U6 con el spliceosoma después la disociación de U4 (Complejo B* activado) (Chan et

al., 2003) lo que indica que tiene una función en el procesamiento del pre-mRNA. Lo anterior se demostró también con ensayos de splicing y RRS *in vivo* que demuestran que un *knockdown* por iRNA de la proteína XAB2/Syf1 disminuye el mRNA, reduce la interacción con las proteínas claves de splicing (hAquarius, hISY1) y afecta la transcripción, la vía TCR y la viabilidad celular.

En *Saccharomyces cerevisiae* las proteínas Syf1 y Syf3 tienen una importante función en la progresión del ciclo celular (Russell et al., 2000) puesto que si hay ausencia del producto génico de Syf1 con un vector inducible a galactosa ó tetraciclina para Syf3 las células se arrestan en la Fase G2 del ciclo celular elucidado por morfología. Ensayos de FACS también corroboraron el arresto debido a que el 85% de células con depleción Syf1 tenían un contenido de ADN 2C, mientras que el control mostró principalmente el contenido de ADN 1C (88% de la población de células). También fue reportado por Chanarat et al., 2011 que Syf1 interacciona genéticamente y bioquímicamente con el complejo THO (específicamente con HHPR1 y MFT1) debido a los ensayos de doble híbrido que demostraron letalidad sintética por mutaciones en proteínas del complejo THO y en Syf1 (con la depleción de los cuatro últimos dominios TPR). Ensayos de copurificación también evidenciaron que Syf1 interactúa con el complejo TREX independiente de RNA y la ausencia del carboxilo de Syf1 disminuye la interacción con la subunidad grande de la Polimerasa-Rpb1. Simultáneamente, ensayos Clip para Hpr1, Sub2 y Yra1 (proteínas de THEX) demuestran que el carboxilo de la proteína Syf1 es necesario para el reclutamiento de los genes transcritos ADH1, PMA1 y DBP2 debido a que la depleción redujo en un 50% la detección de los éstos *in vivo* hasta, lo que se indica que está mediando el transporte de mRNAs después de su procesamiento.

Se puede atribuir otras posibles funciones a Syf1 (Chanarat and Sträßer, 2013), como parte del complejo PRP19 podría participar en la biogénesis de las gotitas de lípidos debido a que en ratones el *knockdown* de PSO4 (proteína también presente en el núcleo de PRP19) reprime la formación de éstas junto con la reducción de la expresión de proteínas implicadas en su biogénesis y los niveles de triacilglicerolos (Cho et al., 2007).

Recientemente, en *Entamoeba histolytica* se han revelado la presencia de 36 proteínas de splicing del complejo temprano a través de la clonación de la subunidad de snRNP U1A-HA, inmunoprecipitación y espectrometría de masas en tándem (MS/MS). Interesantemente se reportó el complejo PRP19 (Tabla 2 Valdés et al., 2014) sin embargo, aún se desconoce su función este protozooario. En datos no publicados de microarreglos de cDNA se observó la sobreexpresión de Syf (presumiblemente como parte del core del NTC) por transfección de plásmidos a trofozoítos de este parásito lo que indicaría un papel importante en el regulamiento del funcionamiento celular (comunicación personal).

Tabla 2. Componentes del complejo de splicing de pre-RNA de *Entamoeba histolytica*. Tomado de Valdés et al., 2014. Línea roja indica el complejo PRP19 de interés en esta investigación.

Particle/complex/class	Protein name	Gene ID	Protein access	MW	Splicing factor	Number of peptides ^a							Max % coverage ^b	
						U1A	C1	C1+	X	X+	M	M+		HA
Sm coreline	SmgGpp/sgg/ribonucleoprotein, Sm T ¹⁰	EHL_052090	185254267	12	SmD3	1							12	-
U4/U5/US tri-snRNP	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase domain containing protein	EHL_152130	47484372	52	HRG/GAD1		2			1				5
	FRF38 family protein	EHL_000490	47474026	23	Pyp18							1		15
Pyp19/DCSL complex	WD domain containing protein	EHL_139870	47478341	52	Pyp19	3	5	1						6
Pyp13/DCSL complex-related	Regulator of nonsense transcripts	EHL_139120	47474499	108	SLAAS60 (RAB184)	3								4
	EhDAD30	EHL_096390	47461276	62	p88 (EhD85)		1	1	2					6
Complex B/B'	EhDab14	EHL_033720	47469329	87	Pyp2	1	3	1			1			2
Complex C	EhDab18	EHL_077640	47466830	105	Pyp22		1		1	1	1			3
	EhDAD1	EHL_175030	47475758	66	Abscrv1		1	1				1		5
Splice factors	EhDab15	EHL_122790	47477533	98	Pyp14	2	1	1	1	1		3	3	8
EJC/snRNP	EhDAD18	EHL_151600	47460885	47	Sut2p/UAF56	2	4	1		2	2	1	4	15
Helicase with other splicing-related functions														
MS2 specific/splicing related	Rad3p DNA repair helicase	EHL_133450	47466485	90	Transcriptan/ transleton	2	6				2		2	5
	Sut2p-like DNA repair helicase	EHL_077260	47479113	89		2	4			2			4	4
Intron-binding, unspecific	Sut2p DNA repair helicase	EHL_088430	47467062	75		1					1		5	2
Intron-binding, unspecific	Ev2p-like DNA helicase	EHL_040360	47471882	48	Chromatin remodeling		2	1						4
	Sgp1p recG family DNA helicase	EHL_023090	4745429	59		1				1			3	3
	Sgp1p recG family helicase	EHL_028890	4746885	138		1	1	1					1	2
	Isw2p helicase	EHL_012470	47479899	98		4							2	
	Isw2p helicase	EHL_044830	47483374	112			2	1					3	1
Intron-binding, unspecific	Chain A structure of M94	EHL_125170	47464327	123	Poly-adenylation/ nuclear vacuole complexes	1	1	1	1	1	1		2	2
Intronless BBA-binding	EhDab12	EHL_134630	4747439	111		3			1				3	1
Nonsense-mediated mRNA decay and rRNA processing / biogenesis	EhDAD6	EHL_149050	47463588	72	Intronless-binding		1		1				3	1
	EhDAD9	EHL_151190	474629616	58	Pre-mRNA binding/ cotranscriptional	2		1			2		7	5

- a. Número de péptido para cada muestra: HA-IP (HA) utilizando extractos nucleares de amebas silvestres y transformantes HA-U1A (U1A) y MS2-IP (MS2) utilizando extractos nucleares a partir no tratada o unida por UV (+) HA- Rabc1 (C1), HA-gRabX13 (X) y los transformantes ameba HA-gRabX13-MS2 (M).
 Porcentaje de cobertura máxima obtenida para cada proteína en los diferentes ensayos de IP.

JUSTIFICACIÓN

- Los Eucariotas de ramificación temprana tienen pocos o ningún intrón, sin embargo, *Entamoeba histolytica* cuenta con más de 4328 intrones en los 8201 genes reportados. Además, los estudios proteómicos de ribonucleopartículas de mensajero realizados en este organismo permitieron identificar 36 factores de splicing, incluyendo PRP19.
- El complejo PRP19 es esencial para la formación del Complejo B* activado, está formado por ocho proteínas centrales como Isy1, Cef1, Prp46, Snt309, Cfl1, Syf2, Ntc20 entre las que se encuentra la proteína Syf1 o su ortólogo en humano XAB2 (≈ 94 kDa).
- La evaluación de los niveles de expresión génica por ensayos de microarreglos de cDNA mostraron la sobreexpresión de la proteína Syf1 en trofozoítos transfectados con plásmidos de proteínas que participan en la remoción y retención de los intrones. Debido a que esta maquinaria hasta la fecha no ha sido caracterizada fue de interés en este trabajo explorar y entender la participación de la proteína Syf1 (≈ 83 kDa) de *E. histolytica* en el procesamiento de los pre-mRNAs en este sistema celular para determinar si es el ortólogo de XAB2 en humanos y CFL1 en levadura.

HIPÓTESIS

Sí la proteína Syf1 (XAB2 en humanos y CFL1 en Levadura) participa en splicing, la sobreexpresión de esta molécula en *Entamoeba histolytica* provocará la remoción intrónica de los transcritos evaluados y la inhibición de su expresión por *knockdown* inducirá una disminución en la remoción intrónica ó perturbaciones en ella.

OBJETIVO GENERAL

Analizar el efecto de la sobreexpresión y el silenciamiento de Sfy1 sobre el splicing de pre-mRNAs blanco en *Entamoeba histolytica*.

Objetivos específicos

- A). Llevar a cabo un análisis *in silico* de la proteína Syf1 (77 kDa) de *E. histolytica* para identificar los motivos TPRs que la componen.
- B). Construir una herramienta molecular para llevar a cabo un silenciamiento de la proteína Syf1 de *E. histolytica* con el vector PKT3M (PK) y una sobre-expresión de ésta con el vector pExEhHA (HA).
- C). Evaluar los niveles de la sobreexpresión y el silenciamiento de la proteína Syf1 en los trofozoítos de *E. histolytica* cepa HM1-IMSS por medio de RT-PCR y Western Blot.
- D). Determinar la localización celular de la proteína Syf en trofozoítos de *E. histolytica* cepa HM1-IMSS por medio de microscopía confocal.
- E). Examinar el impacto de la sobreexpresión y el silenciamiento de la proteína Syf1 en trofozoítos de *E. histolytica* cepa HM1-IMSS en transcritos de genes blanco con y sin retención intrónica (*RabX13*, *Cdc2*, *CIC-B1*, *Sam50*, *EhMybS6* y *Actina*) por RT-PCR.

ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

Para cumplir el objetivo general se realizó la construcción de una herramienta molecular que permitiera tanto la sobreexpresión como el silenciamiento de la proteína Syf1 de *Entamoeba histolytica* usando el plásmido de sobreexpresión pExEhHA (HA) y el silenciador PKT3M (KT), estas construcciones fueron transfectadas en trofozoítos de de la cepa HM1-IMSS, tanto la sobreexpresión como el silenciamiento transcripcional se obtuvo al clonar la secuencia genómica de 2170 pb de Syf1 en cada vector, HA contiene la región del gen de cisteína sintasa flanqueante que contiene un promotor putativo y una región del gen de neomicina que les confirió resistencia al antibiótico G418. KT por el contrario genera sRNAs anti-sentido (AS) que se correlacionan inversamente con la expresión de mRNA de su gen cognado, lo que sugiere una participación en el silenciamiento de genes. Una vez obtenidos y secuenciados fueron transfectados a los trafozoítos y fue evaluado el impacto de cada uno en el splicing *in vivo*.

Para el objetivo específico A, se usó el formato FASTA de la proteína putativa de *Entamoeba histolytica* (EHI_073300) localizada en amoebadb. Este se analizó en Workbench frente al formato FASTA de las proteínas de interés. La construcción de las herramientas moleculares para expresar y silenciar Syf1 del objetivo específico B se llevó a cabo cuando se clonaron los 2147 nucleótidos correspondientes al gen Syf1 (EHI_073300) el cuál fue amplificando con primers específicos que tienen sitios de corte para las enzimas de restricción de SmaI y XhoI. Se llevó a cabo la restricción tanto del fragmento como de los vectores de expresión HA y de silenciamiento KT. Una vez ligados, los plásmidos se usaron en la transformación de células competentes de *E. coli* cepa Top10 y a partir de las colonias obtenidas, se analizó su producción. El DNA plasmídico de HASyf1 y KTSyf1 fue extraído por mini-preparación con CETAB y se realizó una digestión con enzimas de restricción usadas en el punto anterior de las posibles candidatas. Se secuenciaron los plásmidos para corroborar la presencia de los nucleótidos de Syf1 que fueron clonados.

Seguidamente se continuó con la evaluación de la expresión y el silenciamiento de la proteína Syf1 en *E. histolytica*. El plásmido de sobreexpresión HASyf1 y el silenciador KTSyf1 como los vectores sin inserto fueron transfectados a trofozoítos de *E. histolytica* con lipofectamina. Los trofozoítos que fueron transfectados se seleccionaron a las 24 horas posteriores a la

transfección con el antibiótico G418, iniciando con 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de G418 hasta una concentración de 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Una vez estabilizadas a las concentraciones de 5 y 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de G418 se analizó la producción del mRNA de Syf1, la expresión de la proteína y su ubicación celular. Para ello, se usó cDNA de transfectantes y se realizó PCR con primers específicos para Syf1 (2147 pb) el cual se monitorizaron en un gel de agarosa 1% por tinción con bromuro de etidio. A partir de extractos totales de proteína provenientes de las transfectantes que fueron evaluados por separación por SDS-PAGE y western blot con el anticuerpo XAB2 (proteína humana). Las transfectantes de HASyf1 fueron analizadas por microscopía confocal usando el anticuerpo HA-AlexaFlúor.

Finalmente, se estudió por triplicado el impacto de la sobreexpresión y el silenciamiento de Syf1 sobre el splicing de genes blanco por análisis *in vivo* de las señales intrónicas de los transcritos *RabX13*, *Cdc2*, *CIC-B1*, *Sam50*, *EhMybS6* y *Actina* a través de ensayos de RT-PCR en función de las concentraciones de antibiótico de la selección por comparación de las variantes de RNA. Lo anterior se esquematiza en la Figura 8.



Figura 8. Estrategia experimental de trabajo para el silenciamiento del gen que codifica para la proteína Syf1.

MATERIALES Y MÉTODOS

Construcción de plásmidos.

Se amplificó Syf1 (EHI_073300) de 2170 pb por PCR utilizando DNA genómico de *E. histolytica* con primers específicos (Tabla 3), se restringió el inserto y los vectores de sobreexpresión pExEhHA (HA) y de silenciamiento PKT3M (KT) (Morf et al., 2013 & Saito-Nakano et al., 2004) con 1 μ L de enzimas SmaI y XhoI (Biolabs Lote 74 y 291005), 4 μ L de buffer 4, 1 μ L de BSA 20 μ L a un volumen final de 20 μ L. La reacción se incubó a 25 °C y 37 °C 1 hora cada una. Posteriormente se inactivaron las enzimas a 65 °C por 20 minutos, se monitorearon 3 μ L en un gel de agarosa al 1% en TAE (Tris-acetato 4 mM, EDTA 1 mM) los cuales fueron teñidos posteriormente en una solución de bromuro de etidio para su visualización en Cámara UV (MiniBIS Pro). Se ligó el fragmento con cada vector (HA y KT en una proporción 1:3.2 y 2:5 respectivamente) por adición de 1 μ L de ligasa T4 (Invitrogen No. catálogo 15224-017) y buffer 5x en un volumen final de 20 μ L por 12 h a 16°C. Se transformaron bacterias competentes *E. coli* de la cepa TOP10 con 10 μ L de ligación durante 20 min en hielo, posteriormente fueron incubadas a 42 °C por 45 segundos y en hielo por 2 min. A éstas fue agregado 800 μ L de medio súper óptimo (SOB) y se llevó a incubación a 37 °C con agitación por 1 h 20 min. Finalmente, se espatuló una alícuota de 250 μ L en cajas con medio solido Luria-Bertani con ampicilina (100 μ g/mL) las cuales fueron incubadas a 37 °C toda la noche protegidas de la luz. Las colonias obtenidas se inocularon en tubos de cultivo amibiano 16 x 110 con 3 mL de medio líquido Luria-Bertani con ampicilina (100 μ g/mL) y se dejaron toda la noche a 37°C en Sheacker.

Se tomó una alícuota de 1.5 mL vaciando tubos de crecimiento bacteriano a tubos eppendorf y se centrifugó a 15000 rpm por 1 min. Se aspiró el sobrenadante al vacío y se resuspendió la pastilla con 300 μ L de STET (sacarosa 3% (w/v), tritón X-100 0.1% (v/v), EDTA 50 mM, Tris-HCl 50 mM pH 8.0) hasta disgregación total. Se adicionó 10 μ L de lisozima 50 mg/mL y se encubó a 37°C por 15 min en Termoblock Thermolyne 17600. Las muestras fueron hervidas por 1 min 15 seg y centrifugadas nuevamente a 15000 rpm por 15 min. La pastilla de restos celulares se retiró con un palillo, el sobrenadante se trató con 10 μ L de CTAB 5%

con agitación fuerte en vortex y se centrifugó a máxima velocidad por 10 min, se decantó el sobrenadante por inmersión y se adicionó 300 μ L de NaCl 1.2 M con 750 μ L de etanol absoluto. Se repitió la centrifugación, se descartó el sobrenadante y se lavó la pastilla con 750 μ L de etanol absoluto al 70 %. Se continuó con una centrifugación a máxima velocidad por 3 min, se tiró el sobrenadante por inmersión y se dejó escurrir sobre toallas de papel absorbente por 5 min. Finalmente fue resuspendida la pastilla en 33 μ L de H₂O mQ y se monitorearon 3 μ L de los plásmidos en gel de agarosa 1% para evaluar un retraso en el patrón de corrimiento.

Aquellos plásmidos recombinantes seleccionados fueron tratados con 1 μ L de las enzimas de restricción SmaI y XhoI, 4 μ L de buffer 1, 1 μ L de BSA en un volumen final de 20 μ L. Los productos fueron monitoreados en un gel de agarosa al 1% para corroborar la liberación del inserto correspondiente al gen Syf1 de 2147 pb. Se secuenció una clona positiva para cada construcción con primers específicos (pExEhSyf+116 TAGAATAGACTCTCATCAAC y -103 GCAAGAAGATGTTACAAAGC, KTSyf1 CS-F: TTGGTCAATGAACTGACAAACAC y CS-R ATACCCATCAC y los resultados se TTGTTCC).

Transfección de Cepa HM1-IMSS

Se preparó medio de transfección (TM: opti-MEM con 1 mg/mL de ácido ascórbico, 5 mg/mL L-Cys Ph 6.8 filtrado con Filtro Millex[®]HA 0.45 μ m Ref. SLHA033SS), 6×10^5 amibas fueron inoculadas en platos de cultivo celular de 12 pozos (Corning Ref 3512) por 20 min. Se preparó Mix 1 de transfección con 5 μ g de DNA, 10 μ L de Pulse (Invitrogen No. Catálogo 10964-021) y 8.5-50 μ L de TM y Mix 2 con 30 μ L y lipofectamina 20 μ L (Invitrogen No. Catálogo 10964-021). Las preparaciones de cada mix se encubieron 15 min a temperatura ambiente, posteriormente fueron mezcladas y reincubadas por 15 min a la misma temperatura y a cada mezcla se adicionó 400 μ L de TM (volumen final 500 μ L). Se retiró medio de amibas de los pozos, a éstas se les adicionó la mezcla final y se incubaron 5 h en condiciones anaerobias. Terminado este tiempo se pusieron en hielo 5 min y se pasaron a tubos de cultivo amibiano de 7 mL completando con medio TYI-S-33 (Peptona Biotriptasa

3.66%, Cloruro de sodio 0.04 M, Dextrosa 0.06 M, Fosfato de potasio monobásico 1×10^{-3} M, Fosfato dipotásico 1×10^{-3} M, Ácido ascórbico 1×10^{-3} M, L-Cisteína 0.01 M y Citrato de hierro amonio (III) 1×10^{-4} M). 24 horas después se comenzó la selección con $1 \mu\text{g/mL}$ de G418 en HEPES 0.5 M estéril (Life technologies No. catálogo 11811098) y se fue subiendo la concentración día a día hasta $5 \mu\text{g/mL}$ y $10 \mu\text{g/mL}$ según supervivencia.

Western Blot

Los extractos de proteína total se obtuvieron con buffer de lisis (Tris HCl 50 mM pH 7.5, NaCl 150 mM, Triton X-100 1% e inhibidor de proteasas E-64 $10 \mu\text{M}$ No. Catálogo E3132), estos fueron cuantificados con el fluorómetro Quibit 2.0 de acuerdo con las indicaciones del proveedor (Invitrogen No. catálogo Q32866). A $60 \mu\text{g}$ de proteína se les adicionó buffer de carga a una concentración final de 1x y fueron hervidos por 5 min. Las muestras fueron cargadas en un gel de poliacrilamida al 10% (Gel separador: 5 mL de acrilamida 30%-bisacrilamida 0.8%, 3.5 mL de Buffer Tris 4X/SDS 10% pH 8.8, $6.25 \mu\text{L}$ de $\text{H}_2\text{O}_{\text{mQ}}$, 0.05 mL de persulfato de amonio 10% y 0.01 mL de TEMED. Gel concentrador: 1.3 mL de acrilamida 30%-bisacrilamida 0.8%, 2.5 mL de Buffer Tris 4X/SDS 10% pH 6.8, $6.1 \mu\text{L}$ de $\text{H}_2\text{O}_{\text{mQ}}$, 0.05 mL de persulfato de amonio 10% y 0.01 mL de TEMED) y se corrieron en una cámara electroforética con buffer de corrida para proteínas 1X (Tris-base 30 g/L, Glicina 144 g/L y SDS 10%) a 120 V, 150 mA y 18 W durante 1 h 20 min aproximadamente.

Posteriormente se realizó la transferencia en cámara húmeda a 86 V, 350 mA y 100 W por 1 hora con buffer de transferencia (Glicina 0.18 M y Tris-base 25 mM) en una membrana de nitrocelulosa (PROTRAN $0.2 \mu\text{m}$ No. catálogo NBA085C001EA). Las proteínas transferidas fueron monitoreadas por tinción con rojo de Ponceau. Se lavó la membrana con PBS/Tween20 0.5%. (NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, Na_2HPO_4 10.1 mM, KH_2PO_4 1.8 mM y 0.05% Tween) y se bloqueó con leche Svelty baja en grasa al 5% en PBS/Tween20 0.5%. por 1 h a temperatura ambiente. Posteriormente, se lavó brevemente la membrana con PBS-Tween20 0.5% y se incubó toda la noche con anticuerpo primario anti XAB2 conejo (Thermo Scientific Prod# PA5-27101) dilución 1:1000, anti Pol II cabra (Santa Cruz Biotechnology prod#aG-20) y/o anti actina de ratón (no comercial) todos en PBS-Tween. Los anticuerpos

fueron recuperados y la membrana se lavó 3 veces durante 10 min con PBS-Tween20 0.5%. Se incubó 1 h con el anticuerpo secundario 1:10000 cabra x conejo IgG (Millipore Prod#AG132P) para XAB2, cabra x ratón IgG (Thermo Scientific Prod# 31430) para actina y conejo x cabra IgG (Invitrogen prod#81-1620) para Pol II todos en PBS-Tween20 0.5%, se repitieron los lavados y se mantuvo en PBS 1X. El revelado se hizo por quimioluminiscencia usando placas fotográficas Kodak film (Ref. 604 0331) con solución quimioluminiscente (Perkinelmer No. catálogo NEL103001EA). Las placas fueron fotografiadas en Cámara WL (MiniBIS Pro) y las imágenes fueron procesadas con el software ImageJ donde fueron obtenidos los valores IntDen de cada una de las de las bandas correspondientes a las proteínas, estos valores se normalizaron dividiéndolos con el valor IntDen del control de carga Actina y/o Pol II y se tomó como expresión del 100% los valores para los vectores sin insertos.

inmunofluorescencia

Un tubo confluyente al 80% con amibas sin transfectar, transfectantes HASyfl y transfectantes HAU1A se les retiró el medio, se agregó 1 mL de medio TYI-S-33 nuevo y se colocaron en hielo+H₂O por 20 min. Se tomó 250 µL de la suspensión celular y se colocó en un cubreobjetos que se encontraba en platos de cultivo celular de 6 pozos. Se incubaron a 34°C por 30 min, se quitó medio con micropipeta de 1 mL cuidadosamente y fueron sumergidos por 5 min en metanol puro previamente enfriado a -20°C. Las amibas fijadas se observaron en microscopio Nikon Eclipse TS100. Seguidamente se lavó con PBS 1X y se bloqueó por adición de Suero Fetal Bovino Adulto inactivo al 1% en PBS 1X por 1 h a temperatura ambiente. Se descartó el suero y se adicionó 10 µL de anti HA 1:1000 (HA.11 Clone 16B12 Monoclonal Alexa Fluor Labeled No. Catálogo: A488-101L) en PBS 1X sobre el cubreobjetos el cual se tapó con un acetato que tenía las mismas dimensiones y se dejó por 2 horas protegido de la luz. Se realizaron 5 lavados de 10 min con PBS 1X con agitación leve y se agregó 10 µL de Dapi (1:1000) procediendo de manera similar durante 20 min. Una vez realizados los mismos lavados, los cubreobjetos fueron tomados con pinzas se lavaron con H₂O_{mQ} y en seguida se colocaron sobre sobre 7 µL de Vectashield el cual estaba en un

portaobjeto. Finalmente, las esquinas se repizaron con barniz de uñas y se almacenaron a 4°C para su visualización en microscopio confocal Zeiss LSM700.

Extracción de RNA

El RNA total fue extraído desde cultivos de transfectantes (botellas de 25 cm² Corning #43072) con una confluencia del 95%. Las amibas fueron despegadas sumergiendo las botellas 20 min en hielo, se pasaron a un falcón de 15 mL y se centrifugaron por 5 min a 1000 rpm, el medio TYI-S-33 fue retirado y la pastilla celular fue resuspendida con el reactivo TRIZOL (Invitrogen, Cat. # 15596-018) cuidadosamente. La suspensión fue transferida a tubos eppendorf de 1.5 mL el cual se incubó durante 5 min y se les adicionó 160 µL de mezcla cloroformo: isoamílico (25:1), se agitó fuertemente en vortex y se dejó en reposo a temperatura ambiente 3 min. Posteriormente las muestras fueron centrifugadas a 11 000 rpm por 15 min a 4°C y la fase acuosa (RNA) se transfirió a tubos nuevos a los cuales se les agregó 400 µL de isopropanol frío y se dejaron en reposo 10 min a temperatura ambiente. Se repitió la centrifugación a 11 000 rpm por 5 min a 4°C, se descartó el sobrenadante y se adicionó 800 µL de etanol al 70% (en H₂O libre de RNasa) a cada uno. Fue centrifugado nuevamente a 9 000 rpm por 5 min a 4°C, se descartó el sobrenadante por inmersión y se dejó secando por 10 min. Finalmente, se resuspendió la pastilla de RNA en 60 µL de H₂O DEPC. La integridad del RNA se monitoreó en de geles de agarosa al 2% en TAE libre de RNAsas.

Para garantizar los resultados a partir de RNA, este se trató con según protocolo de DNAsa RQ1 (PROMEGA Cat. # M6101) y se purificó llevándolo a un volumen final de 200 µL con H₂O DEPC más 200 µL de Fenol:Cloroformo:Isoamílico (25:24:1), se agitó 30 seg en vortex y se centrifugó a 13 000 rpm por 3 min. Se recuperó la fase acuosa a la cual se le adicionó 200 µL de cloroformo:isoamílico (24:1) y se repitió centrifugación. Se volvió a recuperar la fase acuosa y se añadió 1 µL de glicógeno 5 mg/mL y 200 µL de isopropanol frío. El RNA se precipitó toda la noche a -80°C y fue recuperado por centrifugación a 13 000 rpm por 15 min a 4 °C, una vez empastillado se descartó el sobrenadante por inmersión y se lavó con 200 µL de etanol al 70 % libre de RNAsa. Se repitió centrifugación y se dejó secar la pastilla

por 10 min. Finalmente, el RNA fue resuspendido en 20 μ L de H₂O DEPC y se cuantificó según fluorómetro Qubit 2.0 conforme a las indicaciones del proveedor (Invitrogen No. catálogo Q32866).

RT-PCR

Todas las reacciones de retro-transcripción (RT) se llevaron a cabo en un volumen final de 12.5 μ L con 2 μ g de RNA libre de DNA. Se usó el kit RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit #K1622, para lo cual se completó a 11 μ L con H₂O_{mQ} DEPC estéril (según volumen de RNA) más 1 μ L de hexámeros y se incubó por 5 min a 65°C. Seguidamente se agregó 4 μ L de Buffer, 2 μ L de dNTPs, 1 μ L de Riblock y 1 μ L de RT-Transcriptasa para un volumen final de 20 μ L, la mezcla fue incubada a 42°C por 1 h. Se inactivó la enzima a 70°C por 5 min. Para el transcrito de RabX13, se incubaron 2 μ g de RNA total, 0.5 μ g de oligo(dT)₁₅, 0.5 μ M de desoxi nucleótidos trifosfatados (dNTPs) y se completó a 13 μ L con H₂O_{mQ} DEPC estéril (según volumen de RNA). Esta mezcla fue incubada durante 5 min a 65°C y se colocó en hielo 2 min, se le agregaron posteriormente 4 μ L del buffer *First Strand* 5X (Invitrogen Cat. # 28025-021), 2 μ L de DTT 0.1 M y se puso 2 min a 37°C. En seguida, se agregaron 1 μ L de la enzima M-MLV (Invitrogen Cat. # 28025-021) y se volvió a incubar a 37°C durante 50 min. Se llevó a cabo otra incubación de 10 min a 75°C para la inactivación de la enzima y el cDNA obtenido se usó como molde para las reacciones de PCR.

2 μ L del cDNA obtenido fueron utilizados como molde en las reacciones de PCR con las condiciones de la Tabla 3. Se usaron 0.5 mM de primers específicos para la amplificación de cada transcrito y distintas concentraciones (mM) de MgCl₂ (Tabla 3), buffer para PCR 1X, 0.2 mM de dNTP's, y 0.7 Unidades de Taq polimerasa (Invitrogen No. catálogo 11615-010) ó 0.005 Unidades Taq polimerasa (Kapa Biosystems No. catálogo KK1022) en tubos Axygen de 0.2 mL. Se completó con H₂O_{mQ} estéril a un volumen final de 12.5 μ L.

Tabla 3. Características de los primers usados en esta investigación.

Transcrito	Nombre	Secuencia de oligonucleótidos (5' → 3')	MgCl₂ (mM)	Producto Amplificado (pb)	Condiciones de amplificación
<i>rRNA 18S</i>	FRibEh239F RRibEh88R	ATTGTCGTGGCATCCTAACT CA GCGGACGGCTCATTATAACA	1	179	35 ciclos 94°C/45'', 60°C/45'', 72°C/45''
<i>Actina</i>	EhACT F EhACT R	GAGCTGTATTCCCATCCATT GTTG CTTTCAGCAGTAGTGGTGAA AGC	1.5	510	35 ciclos 94°C/45'', 65°C/45'', 72°C/45''
<i>Cdc2</i>	Cdc2 F Cdc2 R	CAATTAGGAGAAGGAACAT ATGG GTGGTTTCATATCTCTGTGA AG	1.5	440-361	45 ciclos 94°C/45'', 54°C/45'', 72°C/45''
<i>CC-B</i>	Chlo F ChIRE2	ATGGAACAAAATTTACCCTC CTATTGGAAGTGGATTATGG TG	2.5	652-596	45 ciclos 94°C/45'', 55°C/45'', 72°C/45''
<i>RabX13</i>	Rab2 F Rab2R	CGTTGTTGGAGACTCTTCAG TTGG GACCCATTTTCAGTTGAAACA GTTC	1.2	510-374	35 ciclos 94°C/45'', 62°C/45'', 72°C/45''
<i>Sam50</i>	FSam50 RSam50	GCAATGACAACAAGAATGC AA AAGAAACCCCAACTCCACA A	2.5	835-763	35 ciclos 94°C/45'', 64°C/45'', 72°C/45''
<i>EhMybS6</i>	S6 FWD S6 REV	TCAAGTTCGTTCTCATGCAC CTAGAACAATTGGTTCGAAG G	2.5	191-135	45 ciclos 94°C/45'', 54°C/45'', 72°C/45''
<i>POL II</i>	PolIIF	GATCCAACATATCCTAAAAC AACA	2	210	35 ciclos 94°C/45'',

	PolIIR	TCAATTATTTTCTGACCCGT CTTC			60°C/45'', 72°C/45''
<i>SyfI</i>	SyfSma	TCCCCGGGATGAATGAAG AAAAGAATATTTTC	3	2100	35 ciclos 94°C/45'', 64°C/45'', 72°C/45''
	SyfXho	CAACTCGAGTCATTCTGCTT CTCCAAAATA		410	
	Syf2F	GAAAGTCTTACTGTCCAAGA			
	Syf2R	TGAATTGTTTTAATTCCTTC			

Como control, en cada uno de los experimentos se realizaron reacciones de PCR utilizando como molde al RNA sin reacción previa de retrotranscripción. Todos los productos fueron analizados en geles de agarosa al 2% usando marcador de peso 100 pb (Invitrogen No. Catálogo 15628-019). Las imágenes fueron procesadas en software ImageJ donde fueron obtenidos los valores IntDen de cada una de las bandas, estos valores fueron normalizados dividiéndolos con el valor IntDen del control de carga Pol II.

RESULTADOS

Ánàlisis *in silico* de Syf1 de *Entamoeba histolytica*.

Ánàlisis *in silico* mediante BLAST revelaron una proteína hipotética conservada correspondiente a la proteína Syf1 de *Entamoeba histolytica* (EHI_073300), constituida por 699 aminoácidos, tiene un pI 5,86 y presenta una estructura de hélices α antiparalelas (Apéndice 2B). Búsquedas de homología de secuencia utilizando PSI-BLAST NCBI mostraron que la secuencia Syf1 amibiana comparada con otras secuencias de proteínas no redundantes tiene baja identidad con otros organismos: *Drosophila melanogaster* (ORF de CG6197, número de acceso AAF58348; 27% idéntica), *Caenorhabditis elegans* (ORF del C50F2.3, número de acceso AAB37794; 26% idéntica), y *Schizosaccharomyces pombe* (ORF de SPBC211.02c, número de acceso CAB75410; 29% idéntica). Esto se corroboró con el alineamiento de los últimos 4 motivos TPRs de cada especie (Figura 9) lo que indica que hay pocos aminoácidos totalmente conservados (asterisco azul) y conservados los grupos fuertes (dos puntos verdes, ver apéndice 3) y/o conservados como grupos débiles (punto azul oscuro).

D._Melanogaster	-PQIIINYGMFLEEHNYFEEAYRAYEKGISLFWKPNVYDIWNSYLTKFLE
H._Sapiens	TPQIVINYAMFLEEHKYFEESFKAYERGISLFWKPNVSDIWNSTYLTKFIA
C._Elegans	-PQMIMNYAMFLEENEYFELAFQAYEKGIALFKWPGVFDIWNLYLVKFIK
S._Pombe	-PQVVVNYANLLEENAYFEDSFKIYERGVALFSYPVAFELWNLYLTKFVK
E._Histolytica	TGRELIETIKEKDKDGDGDDIWKIYEKGINIFEYFVKGLYNQYINEWCS
S._Cerevisiae	-PAMAENFALFLQNHYEVMESFQVYEKTIPLFPPEIQYELWIEYLEVATS
	X
	XI
D._Melanogaster	RYGGTKL-ERARDLFEQCLDQCPP--EHAKEYFYLLYAKLEEEH-GLARHA
H._Sapiens	RYGGRKL-ERARDLFEQALDGCPP--KYAKTLVLLYLAQLEEEW-GLARHA
C._Elegans	RYGGKKL-ERARDLFEQCLNCP--THAKYIFLLYAKLEEEH-GLARHA
S._Pombe	RYQGTMM-ERTRDLFEQALEGCPP--EFSKSIYLLYADFEKFK-GKAKRS
E._Histolytica	LYGEKKK-ERTRDLFENAIESAPI--EWKKMYDQYIKYEIKN-NSFKRV
S._Cerevisiae	HQLSSLSPEHIRFLFEKALKNLCSNGIDCKTIFIAYSVFEERISGLISKS
	XII
D._Melanogaster	MSVYDR-----ATSAVKEDEMFDMYNIFIKKAAEIYGLPRTREIYEKAI
H._Sapiens	MAVYER-----ATRAVEPAQQYDMFNIIYIKRAAEIYGVTHTRGIYQKAI
C._Elegans	LSIYNR-----ACSGVDRADHMSMYNIYIKKQEMYGIAQCRPIFERAI
S._Pombe	ISILEK-----AADKVKTDADRLAIYNVLLVVKVALNYGVLATRIVYEKAI
E._Histolytica	IDLYKK-----EVNEILNEKKEVWIKYAQQVDEVFGFEETKRVYLEGL
S._Cerevisiae	IEILRRGAVIGTVSVSTHLESRLQLWRMCISKAESTLGPVTRRELYQECI
	XIII
D._Melanogaster	ESLPEQNMHRMCVKFAELETKLGEVDRARAIYAHCSQVCDPRITADFWQT
H._Sapiens	EVLSDEHAREMCLRFADMECKLGEIDRRARAIYFSCQICDPRITGAFWQT
C._Elegans	SELPEDKSRAMSLRYAQLETTVGEIDRRARAIYAHAAEISDPKVHVKFWDT
S._Pombe	ESLSDSEVMDCLRFAMETKLEIDRRARLIYIHGSQYCDPRVETDYWKA
E._Histolytica	NSIGRIDEWKLSLSFAEYLENQEDIEGAREIFSTGSKRCSVKEHEEYWDR
S._Cerevisiae	QILPNSKAVEFVIKFSDFESSIGETIRAREILAYGAKLLPPSRNTELWDS
	XIV
	XV
D._Melanogaster	WKEFEVRHGN-EDTMREMLRIKRSVQATYNTQVNMMAAQFLSTN--NGA
H._Sapiens	WKDFEVRHGN-EDTIKEMLRIRRSVQATYNTQVNFMAEQMLKVSQSATGT
C._Elegans	WKNFEVAHGN-EATVRDMLRVRRSVEASYNVNVTLTSVQMR-----VDA
S._Pombe	WQEFERYGNPEETVKEMLRIKRSVQTKFSTDS-----LHI
E._Histolytica	WKEFEERFGS-ENTFKDYLVTKRIVMKYFGAE-----
S._Cerevisiae	FEIFELKHGD-KETTKDMLKMKVLESNMLIDSASVSHE-----EGN

Figura 9. Secuencia de aminoácidos de los últimos motivos TPRs de Syf1 de *Entamoeba histolytica* alineados con cinco especies diferentes.

Los últimos motivos TPRs analizados fueron propuestos por Nakatsu et al., 2000 para cada especie distinta a *E. histolytica*, los aminoácidos totalmente conservados (asterisco azul rey) y conservados los grupos fuertes (dos puntos color verde) y/o conservados como grupos débiles (punto azul oscuro). Alineamiento hecho en Biology WorkBench con Clustalwprof.

Aunque el porcentaje de identidad con especies como *Homo Sapiens* y *Saccharomyces cerevisiae* (NP_010704) también fue bajo, 26% y 20% respectivamente, nuestros resultados *in silico* demuestran que por alineamiento de los motivos TPRs de XAB2, la proteína Syf1 de *E. histolytica* también presenta 15 motivos TPRs y que éstos son de la Clase I (Figura 10).

A.

```

Syf1_[Homo_sapiens]      MVMMARLSRPERPDLVFEEDLPYEEEIMRNQFSVKCWLRYIEFKQGAPK
EHI_073300_              -----MNEEKNISYIEFDVKQNPQSFKTWWNYYIEYFDESHE
                                . * * . * * * : : :
                                I
Syf1_[Homo_sapiens]      PRLNQLYERALKLLPCSYKLWYRYLKARRAQVKHRCVTDPAYEDVNNCHE
EHI_073300_              QSKITIFQRALHELPGSYKLWYHYLQTILINARKSGIDTEIRKSVNEVFE
                                : : * * * : * * * * * * * * : : : : : : : * * * : *
                                II
Syf1_[Homo_sapiens]      RAFVFMHKMPRLNLDYCQFLMDQGRVTHTRRTFDRALRAMPIIQHSRIWP
EHI_073300_              ESLVYMNKMPVINKLYIEWLIENGEITQMRRVFDRSLQSLPIGQHNELNK
                                . : * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
                                III          IV
Syf1_[Homo_sapiens]      LYLRFLRSHPLPETAVRGYRRFLKLSPESAEEYIEYLKSSDRLDEAAQRL
EHI_073300_              VVMKFVITLNTPLLFEKLVLRHILLDRGMIGEYIQICKKKGKEYYPLALK
                                : : * * : * : * : * : *
Syf1_[Homo_sapiens]      ATVVNDERFVSKAGKSNYQLWHELCDLISQNPDKVQSLNVDAIIRGGLTR
EHI_073300_              LLIQNVLSHSFRMKKEEYDFMIHIFESLTVQD---KGIDVQNIMKKGIQE
Syf1_[Homo_sapiens]      FTDQLGKLWCSLADYYIRSGHFEKARDVYEEAIRVMTVRDFTQVFDSYA
EHI_073300_              FPEDTGSLWVMSLYEIKEGRIETGISILEEMNEVITLRDLYIVRQCYE
                                * . * * . : * * * . : * . : * . : * . : * . : * . : * . : *
                                V
Syf1_[Homo_sapiens]      QFEESMIAAKMETASELGREEEDVDLELRLARFEQLISRRPLLLNSVLL
EHI_073300_              QVIHNYIN-----KPGIKEVEKQVIEERKEYLLGNQNIQMNLVLL
Syf1_[Homo_sapiens]      RQNPHVHEWHKRVALHQ--GRPREIINTYTEAVQIVDPFKAT-GKPHTL
EHI_073300_              KKEPYNVKEWIERSRLYVKNGVDVLSGVKTLIEGIRTIHGGKEINGKNEL
                                * : * * * * : * . : * * . : * . : * . : * . : *
                                VI          VII
Syf1_[Homo_sapiens]      WVAFAKFYEDNGQLDDARVILEKATKVNFKQVDDLASVWCCGELLRHE
EHI_073300_              WSELIGWYLKGNKRNEAKQLFEKAKEDNLTQREE-AEIWYEMIQNKIKSN
                                * : : * * . . . : : * * : * * * . : * * * * * : : * : :
                                VIII
Syf1_[Homo_sapiens]      NYDEALRLLRKATALPARRAEYFDGSEPVQNRVYKSLKVMSMLADLEESL
EHI_073300_              NINEARALCEEATLRQSK-----VKNERMIWKGYLEIEEIS
                                * : * * * . : * * * : : : * . : * * *
                                IX
Syf1_[Homo_sapiens]      GTFQSTKAVYDRILDLRIATPQIVINYAMFLEEHKYFEESFKAYERGISL
EHI_073300_              HNIMGKWSVYEKMIELKIITGRELIEYIKEKKDKGDGDDIWKIYEKGINI
                                . : . . : * * : * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
                                X
Syf1_[Homo_sapiens]      FKWPVNSDIWSTYLTKFIARYGGRKLERARDLFEQALDGCPPKYAKTLYL
EHI_073300_              FEYPVKGMLYNQYINEWCSLYGEKKKERTRDLFENAIESAPIEWKKMYD
                                * : * * . : . : * . : : : * * * * * * * * * * * * * * *
                                XI          XII
Syf1_[Homo_sapiens]      LYAQLEEEWGLARHAMAVYERATRAVEPAQQYDMFNIYIKRAEIYGVTH
EHI_073300_              QYIKYEIKNNSFKRVIDLYKKEVNEILNEEKCEVWIKYAQQVDEVPFGFEE
                                * : * * . . . : : * * : * * * . : : : * : : * * * * * .
                                XIII
Syf1_[Homo_sapiens]      TRGIYQKAIEVLSDEHAREMCLRFADMECKLGEIDRARAIYSFCSQICDP
EHI_073300_              TKKVYLEGLNSIGRIDEWKLSLSFAEYLENQEDIEGAREIFSTGSKRCSV
                                * : * * . : : . : * * * * * : : * * * * * * * * * *
                                XIV
Syf1_[Homo_sapiens]      RTGAFWQTWKDFEVRHGNEDTIKEMLRIRRSVOATYNTQVNFMASQMLK
EHI_073300_              KEHEEYNDRWKEFEERFGSENTFKDYLVIKTVMKYFGEAE-----
                                : . : * * * * * * * * * * * * * * * *
                                XV
Syf1_[Homo_sapiens]      VSGSATGTVSDLAPGQSGMDDMKLEQRAEQLAAEAERDQPLRAQSKILF
EHI_073300_              -----
Syf1_[Homo_sapiens]      VRSDASREELAELAQQVNPEEIQLGEDEDEDEMDLEPNEVRLEQQSVPAA
EHI_073300_              -----
Syf1_[Homo_sapiens]      VFGSLKED
EHI_073300_              -----

```

B. **Consensus** NELWKEYLEFVITLGNEPLLEEALVLFKALEE

C.

```

Conse_Syf_EHis      NELWKEYLEFVITLGNEPLLEEALVLFKALEE-
TPR_I               VKLWIKY-AF-----EE--LEDRARIYERALEPD
                   : ** : * *      : *  ** :   : : * : **

Conse_Syf_EHis      NELWKEYLEFVITLGNEPLLEEALVLFKALEE
TPR_II              -NAW-----LGNYSLQEHKAIYCFRAIP-
                   : *                *** . * * . :   : **

Conse_Syf_EHis      NELWKEYLEFVITLGNEPLLEEALVLFKALEE--
TPR_III             -----AALGNALFAGD---YDEAIA-YRKALELEN
                   *   . : * :   : ** . . : : **

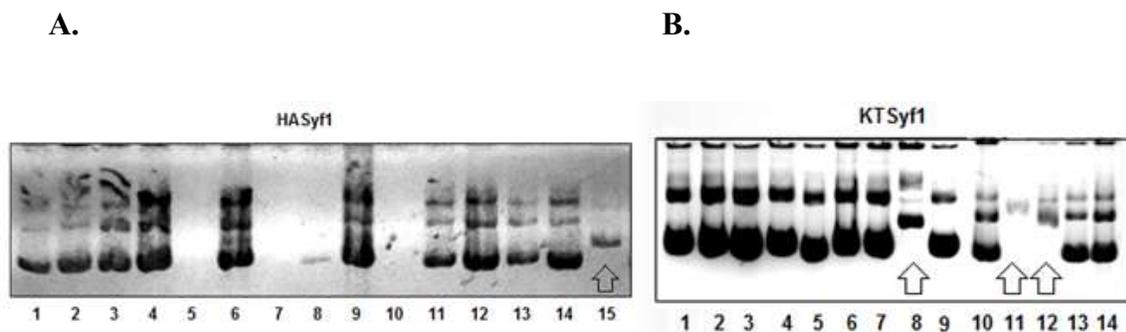
```

Figura 10. Syf1 de *Entamoeba histolytica* tiene 15 motivos TPRs de la Clase I.

A. Alineamiento de los motivos TPRs reportados para XAB2 por Nakatsu et al., 2000 con Syf1 de *Entamoeba histolytica*, notese que hay un alineamiento de cada uno. Los aminoácidos totalmente conservados (asterisco azul rey) y conservados los grupos fuertes (dos puntos color verde) y/o conservados como grupos débiles (punto azul oscuro). Alineamiento hecho en Biology WorkBench con Clustalwprof. B. Secuencia consenso de Syf1 de *E. histolytica* producto del alineamiento de cada motivo TPRs encontrado, se realizó con la herramienta CTREE en Biology WorkBench C. Alineamiento de la secuencia consenso de syf1 *E. histolytica* con la secuencia de las clases de TPRs reportados por Sikorski et al., 1991 que indica que los TPRs de la proteína Syf1 son del Tipo I.

Herramientas moleculares para silenciar y sobreexpresar Syf1 en *E. histolytica*.

La obtención del plásmido silenciador KTSyf1 y del plásmido de sobreexpresión HASyf1 se llevó a cabo por extracción de DNA plásmidico de bacterias *E. coli* transformadas y monitoreados en un gel de agarosa 1%. Las clonas que llevan el inserto presentaron un retraso en la migración (Figura 11 A y B, superior representadas por flechas) respecto al control negativo (carril 1 en A y B).



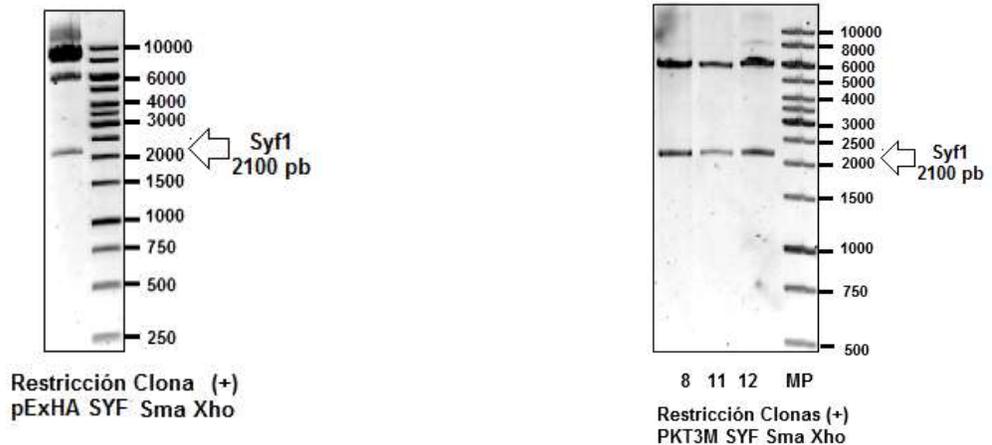


Figura 11. Perfil electroforético de clonas candidatas.

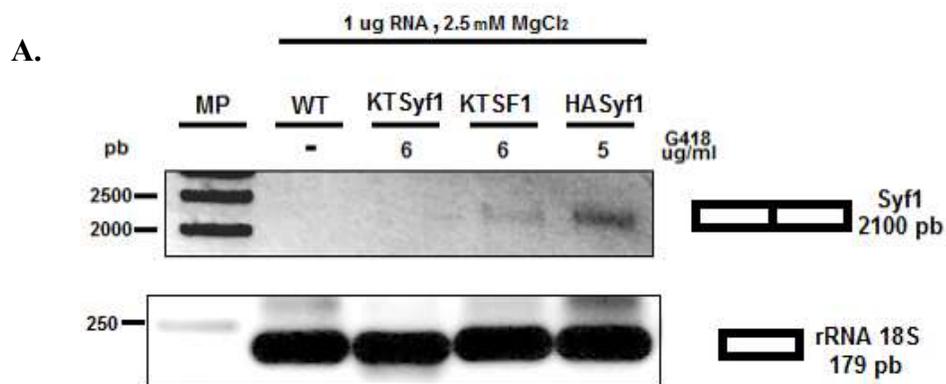
A. Monitoreo del plásmido de sobreexpresión HASyfl en un gel de agarosa 1% obtenido por miniprep de Top10 transformadas, el carril 1 corresponde al vector HA sin inserto y los carriles 2 al 15 corresponden a las colonias tratadas, la flecha indica la posible clona positiva. En la parte inferior se muestra la restricción del plásmido positivo (carril 15) con las enzimas de restricción SmaI y XhoI. **B.** Monitoreo del plásmido de silenciamiento KTSyfl obtenido por miniprep monitoreados en un gel de agarosa 1%, el carril 1 corresponde al vector KT sin inserto y los carriles 2 al 14 corresponden a las colonias candidatas seleccionadas, la flecha indica las posibles clonas positivas. En la parte inferior se muestra la restricción exitosa de los plásmidos positivos carril 8, 11 y 12 con las enzimas de restricción SmaI y XhoI.

Estas clonas positivas se secuenciaron con los primers específicos para HASyfl y KTSyfl (ver materiales y métodos). Posteriormente un análisis bioinformático fue llevado a cabo para comparar con el fragmento Syfl de *E. histolytica*. Los plásmidos fueron purificados por MaxiPreparaciones, se cuantificaron y se monitoriaron en gel de agarosa al 1%. Posteriormente se transfetaron en trofozoítos de *E. histolytica* de la cepa HM1-IMSS como se describe en materiales y métodos.

Transcurridas las 24 h de la transfección se realizó un cambio a medio TYI-S-33 suplementado con 1 µg/mL de antibiótico G418 y se incrementó hasta 2.5 µg/mL día a día. En este punto las amibas que no están transfectadas perecen y las pocas que sobreviven por presencia de los plásmidos se mantuvieron a esa concentración hasta un porcentaje de confluencia 50% para continuar la selección hasta 5 y 10 µg/mL de antibiótico G418. Una vez estabilizados los cultivos en tubos amibianos con una confluencia del 80% se pasaron a botellas de cultivo celular y aproximadamente 10^6 amibas se usaron para las extracciones de proteínas y RNA.

Análisis del mensajero de Syf1 de *Entamoeba histolytica*.

Se analizó el mensajero de la proteína Syf1 de 2100 pb por ensayos de RT-PCR (n=2) usando los primers Tabla 3. Trofozoítos de la cepa HM1-IMSS previamente transfectados y seleccionados entre 5 y 6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de G418 fueron analizados como se describe en materiales y métodos. En la Figura 12 carriles 1 y 2 después del MP corresponden a trofozoítos silvestres (sin transfectar) y a trofozoítos silenciados en los que no se observó señal. Sin embargo, en trofozoítos transfectados con un vector no relacionado KTSF1 se observa poco el mensajero y las en transfectantes con HASyfl sí se logró observar claramente, como era de esperar puesto que están sobreexpresando la proteína. Se usó como control de carga el transcrito rRNA 18S cuyo producto es de 179 pb. Los valores densitométricos fueron procesados en ImageJ únicamente para HASyfl tomando como 100% el valor de WT, una vez normalizados con rRNA18s se graficaron en GraphPad Prism 6. Se aprecia una sobreexpresión de 3 veces del mensajero de Syf1 respecto al basal de los trofozoítos silvestres.



B.

Eficiencia de sobreexpresión de Syf1 en *E. histolytica*

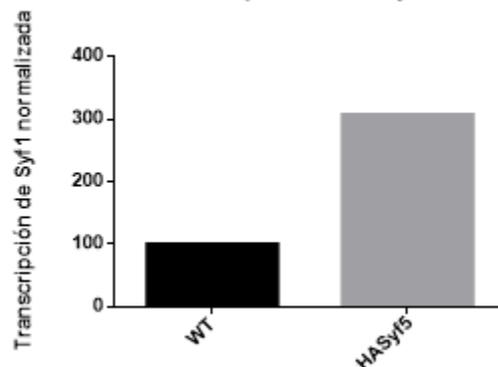


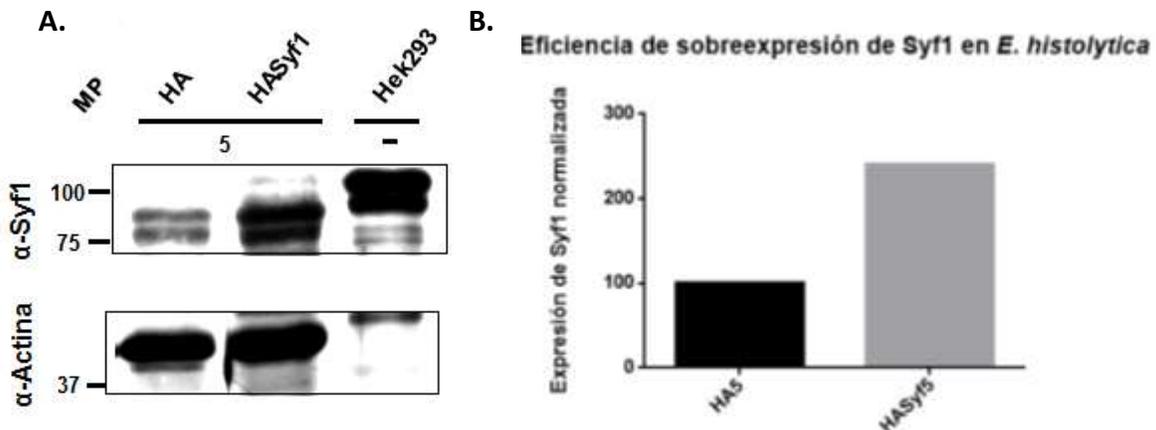
Figura 12. Evaluación del mensajero de Syf1 de *Entamoeba histolytica*.

A. Trofozoítos de *E. histolytica* Cepa cepa HM1-IMSS fueron transfectados con los vectores KTSyf1 para el *knockdown* y HASyf1 para la sobreexpresión; se usó KTSF1 como control de transfección, una vez seleccionados entre 5 y 6 $\mu\text{g/mL}$ de G418 se realizó la RT-PCR con primers específicos y se monitorearon en un gel de agarosa al 1%, células WT se usaron como control (sin transfección), el transcrito rRNA18s se analizó como control de carga. n=2 **B.** Densitometrías de Syf1 en trofozoítos HASyf1 y células WT analizadas con ImageJ, una vez normalizados con rRNA18s se tomó como 100% los valores de WT y se graficaron en GraphPad Prism 6.

Análisis de la expresión de Syf1 en trofozoítos de *E. histolytica* transfectados.

Para evaluar la inhibición de la expresión y la sobreexpresión de la proteína Syf1 en las cepas transfectantes se usó el anticuerpo comercial anti-XAB2 debido a que es el único anticuerpo disponible en el mercado. El epítipo (entre los aminoácidos 30-243 aa de la proteína Syf1 humana) tiene el 30% de identidad con la proteína amibiana (Ver Apéndice 1A). Su especificidad fue validada por western blot en extractos totales de proteína de células HEK293 y HELA. Para las primeras, se observó una señal doble en el peso aproximado de la proteína (≈ 94 kDa) mientras que para la segunda fue totalmente inespecífico (Apéndice 1B).

Reconociendo las limitaciones del anticuerpo, procedimos a evaluar la expresión de la proteína Syf1 en trofozoítos transfectados con las construcciones y seleccionados a 5 $\mu\text{g/mL}$ del agente selector G418 también analizados por western blot. Los resultados obtenidos de la inmunodetección muestran que tanto en la sobreexpresión como en el silenciamiento de la proteína Syf1 en trofozoítos transfectados se observó un aumento y una disminución en la expresión de esta proteína, respectivamente, en comparación con aquellas transfectadas con el vector sin inserto (Figura 13 A y C.)



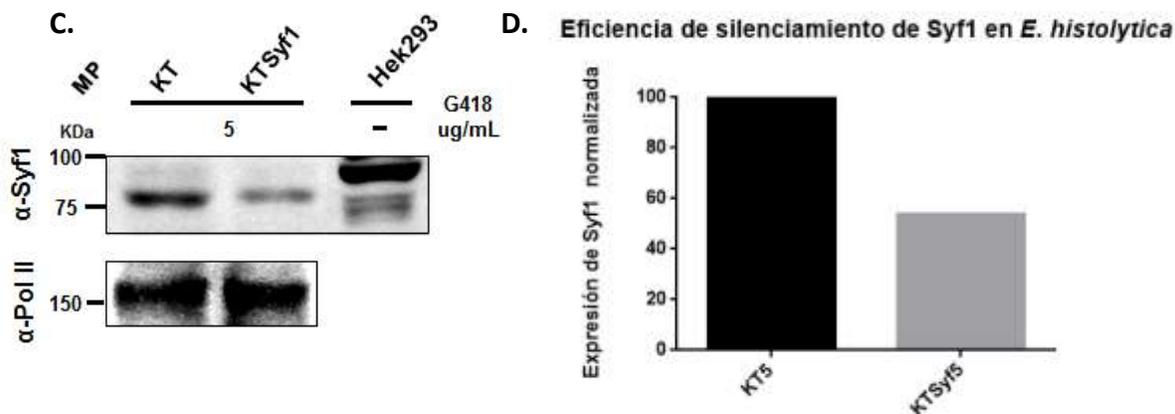


Figura 13. Evaluación de la expresión de Syf1 en trofozoitos de *Entamoeba histolytica* Transfectados.

A y C. Trofozoitos de *E. histolytica* cepa HM1-IMSS fueron transfectados y con plásmidos sobreexpresión de HASyfl y de silenciamiento de KTSyfl y control mock (vectores sin inserto) utilizando lipofectamina, una vez seleccionados con 5µg/mL de G418 los lisados celulares se obtuvieron por buffer de lisis y se resolvieron por SDS-PAGE en un gel 8%. La inmunotransferencia con anti-XAB2, anti-Actina y anti-PolII. Todos los experimentos se realizaron dos veces con resultados similares. **B y D.** Densitometrías de la expresión de Syf1 en trofozoitos transfectados con HASyfl y KTSyfl respectivamente junto con su control de células mock. Se analizaron los valores con ImageJ y se normalizaron con el control de carga, se tomó como 100% los valores del mock y se graficaron en GraphPad Prism 6.

Las densitometrías de estas imágenes fueron procesadas con ImageJ y normalizadas con respecto al respecto al vector mock (100% de expresión) y control de carga de actina para HASyfl y Pol II para KTSyfl. Nótese que la expresión Syf1 aumentó más del 100% y la inhibición de la expresión disminuyó aproximadamente un 40% (Figura 13 B y D). El ensayo se realizó por duplicado, con un error estándar de la media (SEM) de $240,4 \pm 7,535$ para la sobreexpresión y $53,78 \pm 4,189$ para el silenciamiento.

Inmunodetección de HA-Syf1

La determinación de la localización celular de la proteína Syf en trofozoitos de *E. histolytica* cepa HM1-IMSS se llevó a cabo por microscopía confocal (Figura 14). Las transfectantes de HA-Syf1 fueron tratadas según materiales y métodos para la inmunofluorecencia de anti-HA, se usó como control negativo trofozoitos sin transfectar HM1:IMMS y control positivo trofozoitos transfectados con HA-U1A como previamente se reportó por Valdés et al., 2014. Interesantemente, la señal de HA (canal verde) fue detectada para ambas transfectantes (carriles 2 y 3 respectivamente), esta señal colocalizó con la señal de DNA con DAPI (canal

azuL) como previamente se había descrito para HA-U1A por lo cual, se evidenció la localización nuclear de Syf1. Sólo la señal azul se detectó en los controles mock (Carril 1).

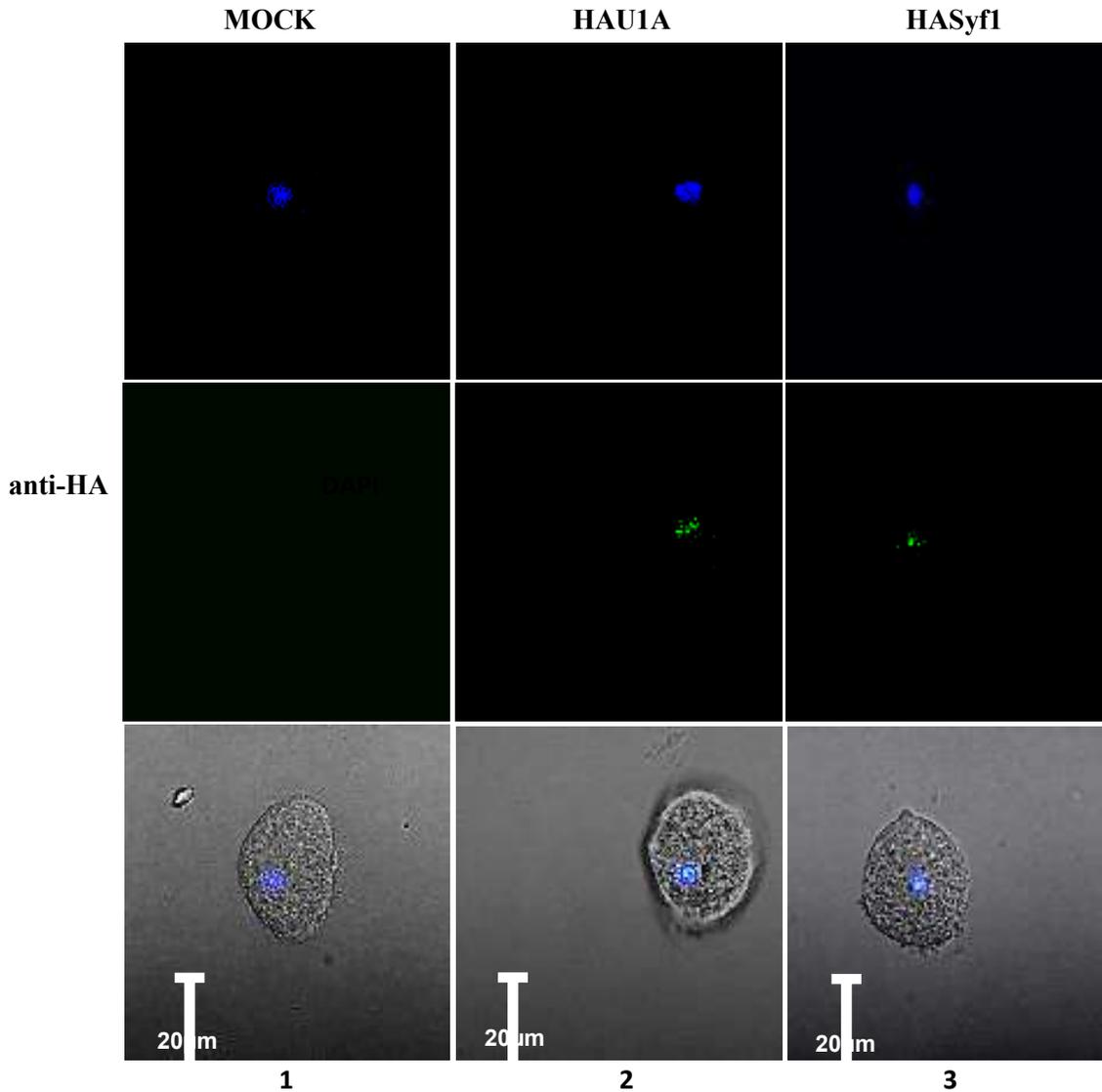


Figura 14. Localización nuclear de Syf1 en transfectantes de *Entamoeba histolytica*.

Mock (Carril 1), HAU1A (Carril 2), y HASyf1 (Carril 3), las transfectantes fueron tratadas para inmunofluorescencia y fueron observadas bajo microscopio confocal. La señal verde corresponde a anticuerpo Alexa Flúor 488 anti-HA y la señal azul corresponde a DNA nuclear contrastado por DAPI. PC muestra el contraste de fase de las imágenes con la colocalización de las señales fluorescentes.

Efecto de la sobreexpresión y el *knockdown* de Syf1 en el splicing de algunos productos génicos de *E. histolytica*.

Para analizar el efecto de la sobreexpresión y el silenciamiento de Sfy1 sobre el splicing de pre-mRNAs blanco en *Entamoeba histolytica* distintos productos génicos amibianos se seleccionaron conforme al análisis de las señales intrónicas claves para el splicing como: las características de sus trectos de polipirimidinas (pY), la longitud de los mismos y su proximidad al 3' ss (Tabla 4).

Tabla 4. Señales intrónicas de los transcritos seleccionados de *E. histolytica*. Acorde a la secuencia consenso NCURAY, en rojo se muestra la adenosina del punto de ramificación (BPS), en magenta el 3' ss y en negro el tracto de polipirimidinas (pY).

Pre-mRNA	ID Gene	Longitud del intrón (nt)	Características de las secuencias intrónicas (5'→3') BPS, pY y 3' ss
<i>Actina</i>	EHI_107290	NP	-
<i>Cdc2</i>	EHI_065280	81	taaaaaagataaaaagaaagta act gataaaatag
<i>RabX13</i>	EHI_065790	136	ttatcttgtaaataaatataaactaactttt att tag
<i>Sam50</i>	EHI_078220	72	tata ttta attagataaatgtaagactaaaagaaaaaa att aaagaatag
<i>CIC-B1</i>	EHI_186860	56	aattaattgaaaaataataagttctg atc gttttag
<i>MybS6</i>	EHI_155580	56	ttcttaaaaaaa att ccatgaaactaactttt at tag
<i>PolIII</i>	EHI_056690	NP	-
<i>Syf1</i>	EHI_073300	37	gtttgtaataattctctatataacaataaaagactt attgaattag

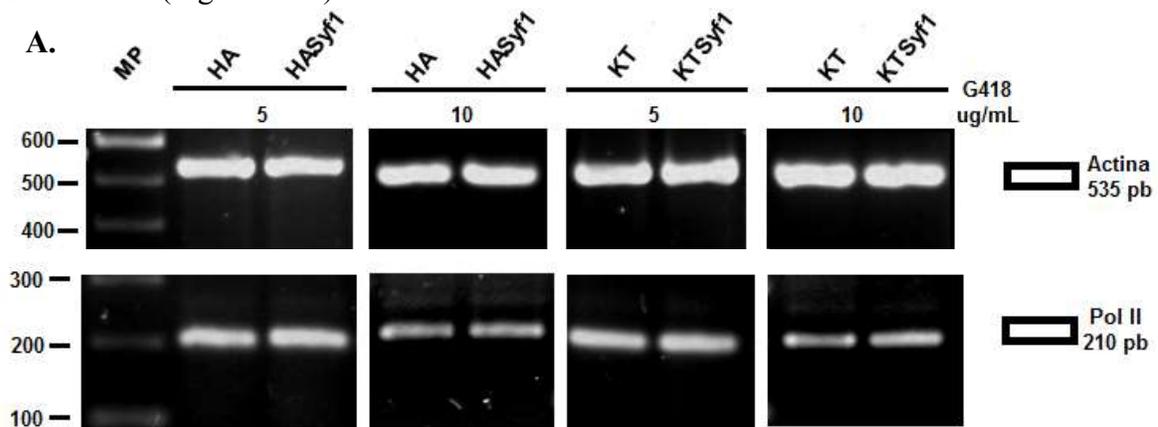
NP: No presenta.

Los ensayos de RT-PCR fueron realizados usando como templado cDNA obtenido a partir del RNA extraído y tratado con DNAsa de amebas transfectadas con los vectores sin inserto y con los vectores con inserto tanto de sobreexpresión y silenciamiento (HASyf1 y el KTSyf1, respectivamente) seleccionados a 5 y 10 µg/mL de G418. Los productos

amplificados se normalizaron con el transcrito del *Pol II* de un peso esperado de 210 pb. Adicionalmente, se realizó el control negativo para los RNAs usados en la RT-PCR con primers específicos para el transcrito del gen *Actina* y/o *Pol II* y descartar amplificaciones inespecíficas por presencia de DNA.

Transcrito del gen de *Actina*

En la Figura 15 se presentan los resultados obtenidos de la RT-PCR para el transcrito de *Actina* en un peso esperado de 535 pb. A la izquierda se encuentra la sobreexpresión y a la derecha el silenciamiento de Syf1 en transfectantes seleccionadas con 5 y 10 $\mu\text{g/mL}$, como se observa, aunque se ve afectada la transcripción del transcrito debido a que no detecta cambios en la cantidad de producto en todas las muestras analizadas a una selección de 10 μg el *knockdown* de Syf1 presenta una disminución de la transcripción conforme a las desintometías (Figura 15 B).



B.

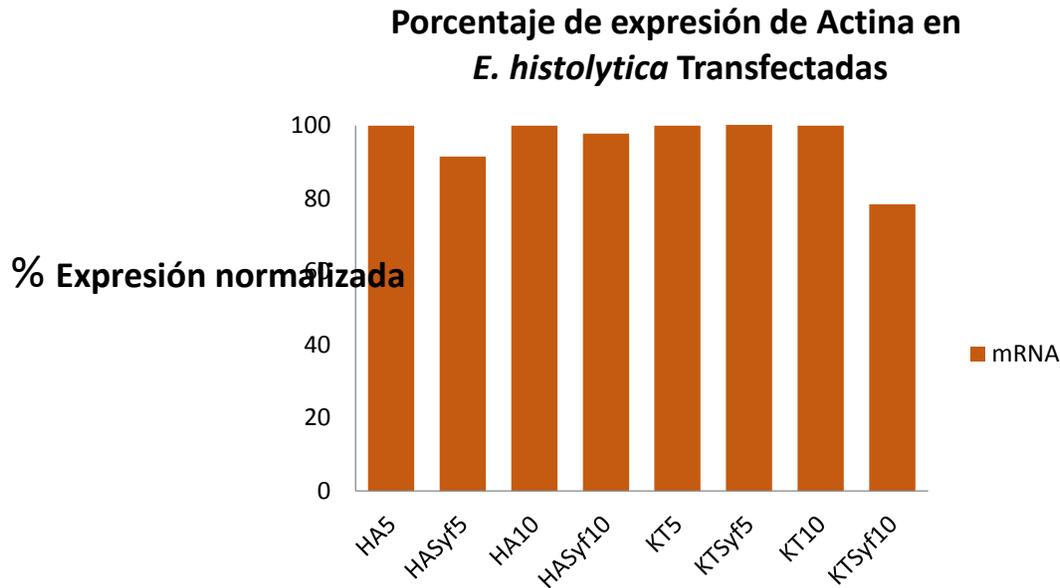


Figura 15. Expresión del transcrito de *Actina* en trofozoitos transfectados.

A. Reacción de RT-PCR del transcrito de *Actina*, de las transfectantes a concentraciones de 5 y 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de G418, el producto de la PCR es de 535 bp, en la parte inferior se presenta el transcrito de PolII de 210 pb todos monitoreados en un gel de agarosa 2%. B. Efecto de la sobreexpresión y silenciamiento de Syf1 de *E. histolytica* del transcrito de *Actina* normalizada contra PolII. En naranja se presenta el mRNA a las diferentes selecciones de antibiótico G418, HA5 y KT5 son vectores de mock a una selección de 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, HASyf15 y KTSyf15 son vectores de sobreexpresión y silenciamiento a una selección de 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Todos los experimentos se realizaron tres veces con resultados similares. Las densitometrías fueron tomadas de los valores IntDen del software ImageJ, se graficó los cocientes de los valores obtenidos para HASyf1 y KTSyf1 considerando los valores de los vectores sin inserto (mock) como 100% el valor de los vectores sin inserto (HA y KT) a cada concentración de antibiótico.

Transcrito del gen de *Cdc2*

El transcrito *Cdc2* es de 440 pb y posee un intrón de 81 nt, este intrón no posee un tracto de polipirimidinas (pY) sin embargo, el producto procesado vía splicing es de 359 bp. La Figura 16 A muestra las variantes de RNA descritas anteriormente, los resultados de las RT-PCR fueron monitoreados en un gel de agarosa al 2% y teñidos con bromuro de etidio, nótese que a pesar de que el intrón carece de algunas señales específicas para su remoción cuando se sobreexpresa Syf1 se observa un mejor procesamiento en ambas selecciones de antibiótico G418 debido a que decrementa la señal del pre-mRNA en 440 pb, este fenómeno se evidencia mejor en la normalización de las densitometrías Figura 16 B. (Barra naranja HASyf5 con respecto a HA5). Sorprendentemente, hay un incremento en el pre-mRNA de este transcrito con *knockdown* de Syf1 debido a que incrementa la señal en 440 pb, este suceso fue

evidenciado en ambas selecciones (KTSyf5 con respecto a KT5 y KTSyf10 con respecto a KT10) lo que indica que se está reteniendo el intrón.

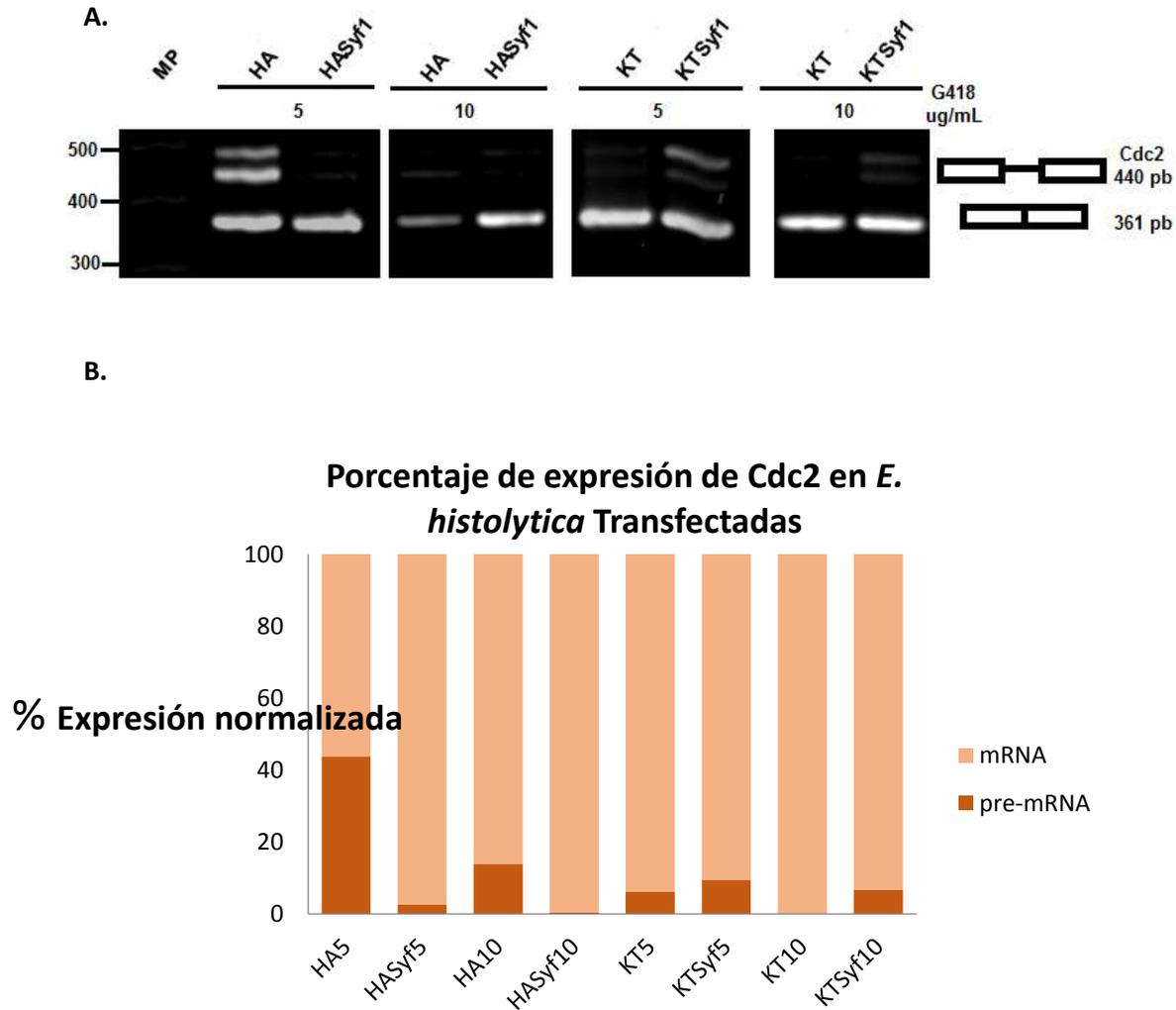
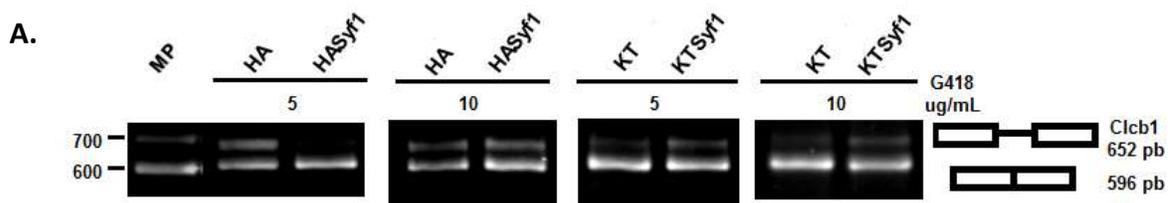


Figura 16. Expresión del transcrito de *Cdc2* en trofozoítos transfectados.

A. Reacción de RT-PCR del transcrito de *Cdc2*, de las transfectantes a concentraciones de 5 y 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de G418, el producto de las variantes de RNA son de 440 para el pre-mRNA y 361 bp para el mRNA amplificados por PCR y monitoreados en un gel de agarosa 2%. **B.** Efecto de la sobreexpresión y silenciamiento de Syf1 de *E. histolytica* del transcrito de *Cdc2* normalizada contra PolIII. En anaranjado se presenta el pre-mRNA a las diferentes selecciones y en rosado se presenta el mRNA. HA5 y KT5 son vectores mock (sin inserto) a una selección de 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, HASyf5 y KTSyf5 son vectores de sobreexpresión y silenciamiento a una selección de 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, nomenclatura similar para selección de 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Todos los experimentos se realizaron tres veces con resultados similares. Las densitometrías fueron tomadas de los valores IntDen del software ImageJ, se graficó los cocientes de los valores obtenidos para HASyf1 y KTSyf1 considerando los valores de los vectores sin inserto (mock) como 100% según la concentración de antibiótico para la selección.

Transcrito del gen de *CIC-B1*

El transcrito del gen de *CIC-B* posee dos intrones, en este trabajo evaluó el efecto de la sobreexpresión y el *knockdown* de Syf1 en el intrón 1 (*CIC-B1*) el cual presenta un tracto de polipirimidinas muy pequeño. Para ello se usó primers específicos que amplificaron estas variantes de RNA en 652 bp con intrón (pre-mRNA) y 596 bp sin intrón (mRNA). Los resultados de la RT-PCR se muestran en la Figura 17, evidenciamos que la sobreexpresión de Syf1 decremanta la señal de pre-mRNA en 652 bp, este fenómeno se observa mejor a una 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (HASyf1 con respecto a HA), mientras que el *knockdown* incrementa el pre-mRNA discretamente en ambas concentraciones de selección (KTSyf1 con respecto a KT) puesto que aparece mayor señal en 652 pb.



B.

Porcentaje de expresión de *CIC-B1* en *E. histolytica* Transfectadas

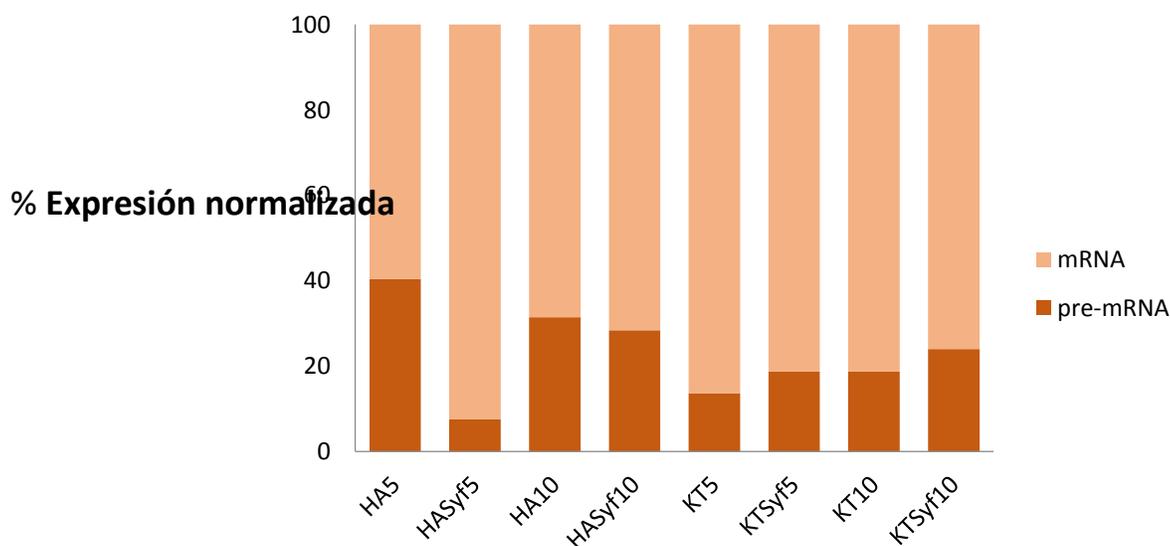


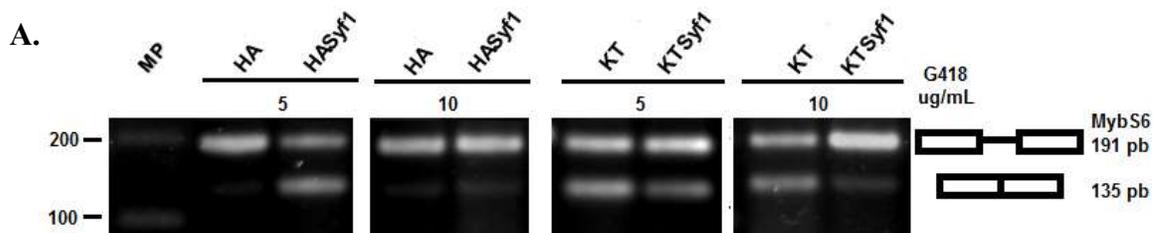
Figura 17. Expresión del transcrito de *CIC-B1* en trofozoítos transfectados.

A. Reacción de RT-PCR del transcrito de *CIC-B1*, de las transfectantes a concentraciones de 5 y 10 µg/mL de G418, el producto de las variantes de RNA son de 652 para el pre-mRNA y 596 bp para el mRNA amplificados por PCR y monitoreados en un gel de agarosa 2%. **B.** Efecto de la sobreexpresión y silenciamiento de Syf1 de *E. histolytica* del transcrito de *CIC-B1* normalizada contra PolII. En anaranja se presenta el pre-mRNA a las diferentes selecciones y en rosado se presenta el mRNA. HA5 y KT5 son vectores mock (sin inserto) a una selección de 5µg/mL, HASyF5 y KTSyF5 son vectores de sobreexpresión y silenciamiento a una selección de 5µg/mL, nomenclatura similar para selección de 10 µg/mL. Todos los experimentos se realizaron dos veces con resultados similares. Las densitometrías fueron tomadas de los valores IntDen del software ImageJ, se graficó los cocientes de los valores obtenidos para HASyF1 y KTSyF1 considerando los valores de los vectores sin inserto (mock) como 100% según la concentración de antibiótico para la selección.

Las densitometrías procesadas y normalizadas de los gels en la figura 17 B indican que a una selección de 5 µg/mL la sobreexpresión de Syf1 disminuye el pre-mRNA y aumenta el mRNA considerablemente (HASyF5 comparado con HA5, barras 1 y 2), indistintamente, no se evidencia tanto en una selección de 10 µg/mL de antibiótico. Por otra parte, el *knockdown* de Syf1 tiene un efecto más discreto debido a que se observa un poco incremento en los niveles de pre-mRNA en ambas selecciones (KTSyF5 y 10, barras 5 y 7 con respecto a KT5 y 10, barras 6 y 8).

Transcrito del gen de *EhMybS6*.

El transcrito *EhMybS6* posee un intrón de 56 nt que posee un tracto de pirimidinas yuxtapuesto con el 3' ss y en comparación con el de *RabX13* es más pequeño. Los resultados de las RT-PCR confirman la señal del transcrito sin procesar (incluido el intrón o pre-mRNA) en 191 pb y el mRNA o procesado en 135 pb, en la Figura 18 se observó que la sobreexpresión de Syf1 aumenta la señal del mRNA respecto a su control en ambas selecciones de antibiótico, sin embargo, se evidencia mejor a una selección de 5 µg/mL de G418. Por otro lado, el silenciamiento de Syf1 causó en este transcrito una disminución en la señal en 135 pb, es decir, que el *knockdown* indujo el no procesamiento del transcrito debido a que se observa una acumulación predominante en la señal de 191 pb.



B.

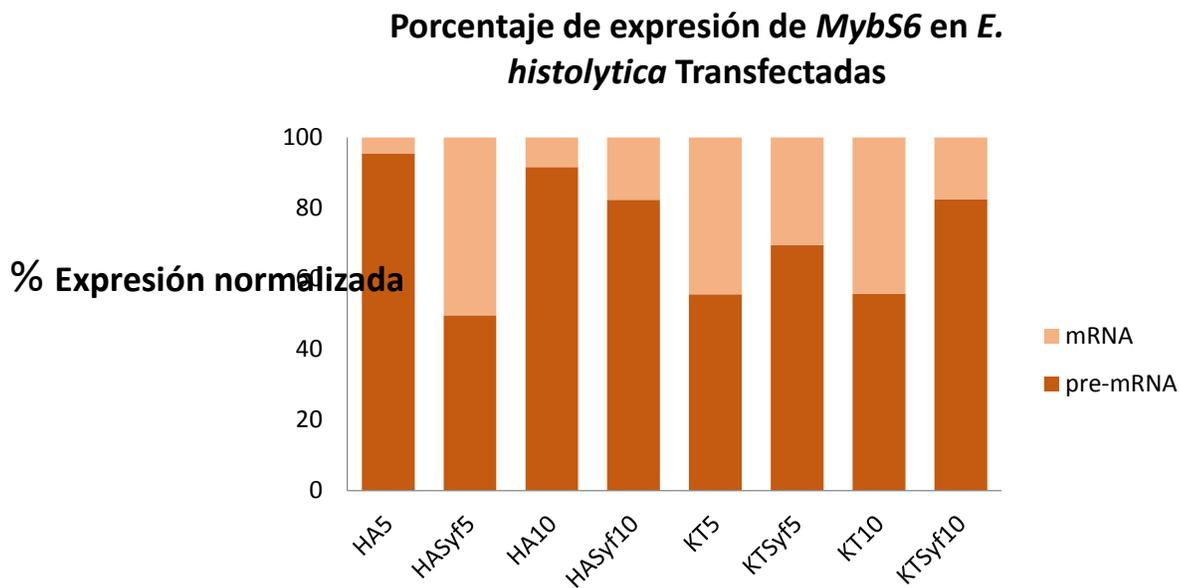


Figura 18. Expresión del transcrito de *MybS6* en trofozoítos transfectados.

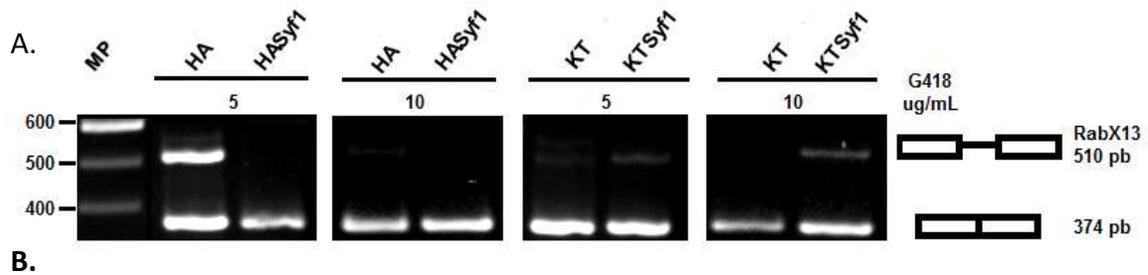
A. Reacción de RT-PCR del transcrito de *MybS6*, de las transfectantes a concentraciones de 5 y 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de G418, el producto de las variantes de RNA son de 191 para el pre-mRNA y 135 bp para el mRNA amplificados por PCR y monitoreados en un gel de agarosa 2%. B. Efecto de la sobreexpresión y silenciamiento de Syf1 de *E. histolytica* del transcrito de *MybS6* normalizada contra PolIII. En anaranjado se presenta el pre-mRNA a las diferentes selecciones y en rosado se presenta el mRNA. HA5 y KT5 son vectores mock (sin inserto) a una selección de 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, HASy5 y KTSy5 son vectores de sobreexpresión y silenciamiento a una selección de 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, nomenclatura similar para selección de 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Todos los experimentos se realizaron tres veces con resultados similares. Las densitometrías fueron tomadas de los valores IntDen del software ImageJ, se graficó los cocientes de los valores obtenidos para HASy1 y KTSy1 considerando los valores de los vectores sin inserto (mock) como 100% según la concentración de antibiótico para la selección.

El porcentaje de expresión de *EhMybS6* normalizado Figura 18 B indica que hay aumento del mRNA y una disminución del pre-mRNA cuando se sobreexpresa Syf1 en ambas selecciones de 5 y 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Barras HASy5 y HASy10) con respecto a los controles mock (Barras HA5 y HA10) sin embargo, a una selección de 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ es más evidente. Por el contrario, en ambas selecciones para el *knockdown* de Syf1 se observó un aumento del pre-mRNA y una disminución en el mRNA (PKT3Syf5 y PKT3Syf10) comparados con sus controles mock (KT5 y KT10), este efecto se distingue mejor a la mayor concentración de selección.

Transcrito del gen de *RabX13*

El transcrito de *RabX13* tiene una longitud de 510 pb incluyendo un intrón grande (136 nt), este intrón posee un tracto de polipirimidinas está bien definido y es cercano al 3' ss, con su remoción la longitud del transcrito es de 373 pb. Nuestros resultados de RT-PCR (Figura 19)

muestran para ambos casos de selección que cuando hay más proteína Syf1 se da disminución en la señal de 510 pb denotada mejor en la selección de 5 ug de antibiótico. En contraparte, la expresión reducida de Syf1 (KTSyf1) indica una acumulación de la señal en 510 pb lo que indicaría que no se está llevando a cabo la remoción del intrón.



Porcentaje de expresión de *RabX13* en *E. histolytica* Transfectadas

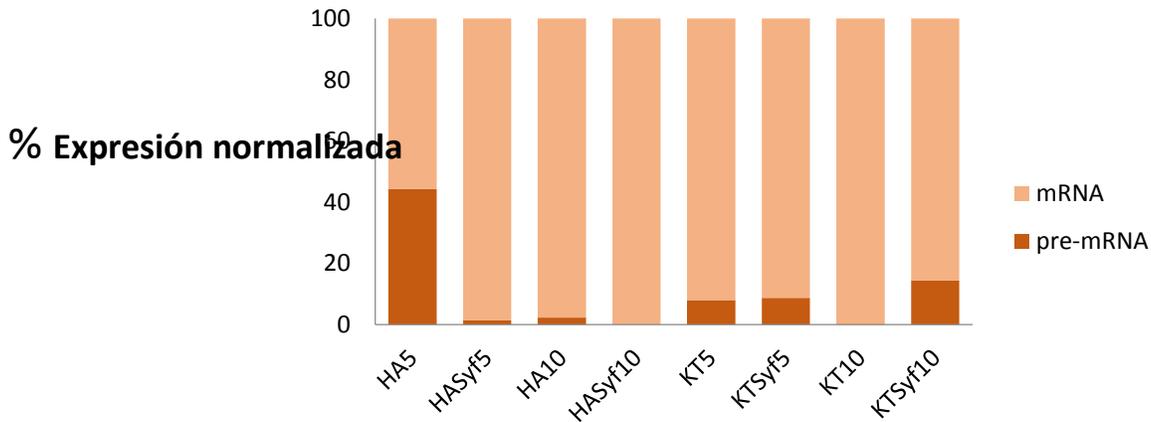


Figura 19. Expresión del transcrito de *RabX13* en trofozoítos transfectados.

A. Reacción de RT-PCR del transcrito de *RabX13*, de las transfectantes a concentraciones de 5 y 10 $\mu\text{g/mL}$ de G418, el producto de las variantes de RNA son de 510 para el pre-mRNA y 374 bp para el mRNA amplificados por PCR y monitoreados en un gel de agarosa 2%. **B.** Efecto de la sobreexpresión y silenciamiento de Syf1 de *E. histolytica* del transcrito de *RabX13* se normalizó contra PolIII. En anaranjado se presenta el pre-mRNA a las diferentes selecciones y en rosado se presenta el mRNA. HA5 y KT5 son vectores mock (sin inserto) a una selección de 5 $\mu\text{g/mL}$, HASyf5 y KTSyf5 son vectores de sobreexpresión y silenciamiento a una selección de 5 $\mu\text{g/mL}$, nomenclatura similar para selección de 10 $\mu\text{g/mL}$. Todos los experimentos se realizaron tres veces con resultados similares. Las densitometrías fueron tomadas de los valores IntDen del software ImageJ, se graficó los cocientes de los valores obtenidos para HASyf1 y KTSyf1 considerando los valores de los vectores sin inserto (mock) como 100% según la concentración de antibiótico para la selección.

Los valores normalizados de estas RT-PCRs confirman que en 5 $\mu\text{g/mL}$ de selección la sobreexpresión de Syf1 (Figura 19 B. Barras HASyf5 con respecto a Barra HA5) causa un aumento en el mRNA mientras que el silenciamiento causa disminución del mismo, por tanto, un aumento en el pre-mRNA.

Transcrito del gen de *Sam50*

El transcrito del gen de *Sam50* posee un intrón que contiene un tracto de pirimidinas 39 nt río arriba del 3' ss. Los productos de PCR esperados son con intrón de 835 bp y sin intrón de 763 bp, estos se presentan en la Figura 20 A. Conforme a los anteriores transcritos analizados, la sobreexpresión de Syf1 demuestra que disminuye la señal de 835 pb y la disminución de la expresión aumenta esta señal en comparación con sus controles. La gráfica de la Figura 20. B, indica más notablemente y de forma simultánea que en todas las selecciones HASyf1 se disminuye el pre-mRNA y aumenta el mRNA mientras que para KTSyf1 es inverso, sorprendentemente en este transcrito hay mayor afeción en las variantes de RNA.

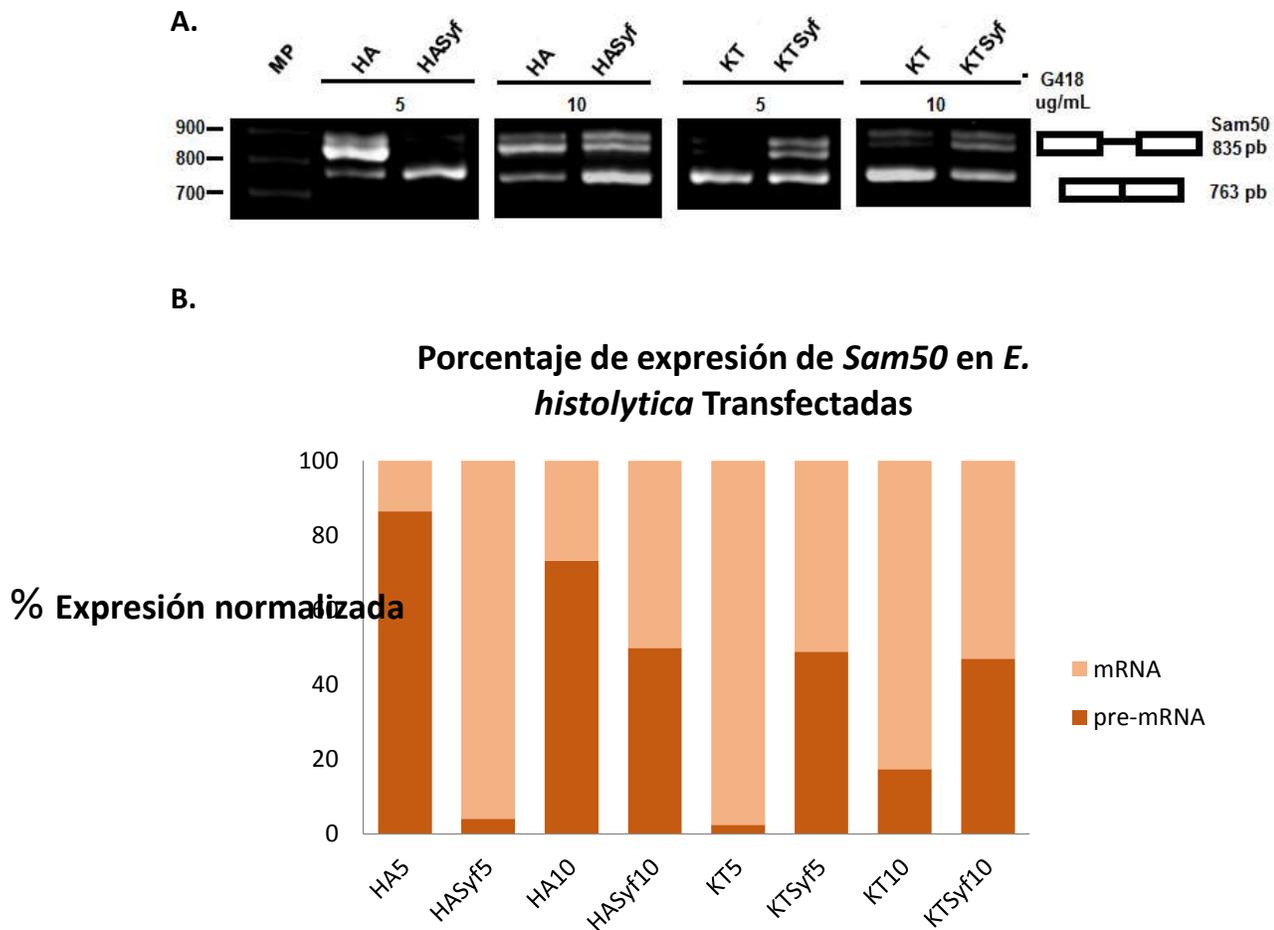


Figura 20. Expresión del transcrito de *Sam50* en trofozoítos transfectados.

A. Reacción de RT-PCR del transcrito de *Sam50*, de las transfectantes a concentraciones de 5 y 10 $\mu\text{g/mL}$ de G418, el producto de las variantes de RNA son de 835 para el pre-mRNA y 763 bp para el mRNA amplificados por PCR y monitoreados en un gel de agarosa 2%. **B.** Efecto de la sobreexpresión y silenciamiento de Syf1 de *E. histolytica* del

transcrito de *CIC-B1* normalizada contra PolIII. En anaranja se presenta el pre-mRNA a las diferentes selecciones y en rosado se presenta el mRNA. HA5 y KT5 son vectores mock (sin inserto) a una selección de 5µg/mL, HASyf5 y KTSyf5 son vectores de sobreexpresión y silenciamiento a una selección de 5µg/mL, nomenclatura similar para selección de 10 µg/mL. Todos los experimentos se realizaron tres veces con resultados similares. Las densitometrías fueron tomadas de los valores IntDen del software ImageJ, se graficó los cocientes de los valores obtenidos para HASyf1 y KTSyf1 considerando los valores de los vectores sin inserto (mock) como 100% según la concentración de antibiótico para la selección.

DISCUSIÓN

Ánisis *in silico* demuestran que Syf1 de *Entamoeba histolytica* está constituida por 15 motivos TPRs y no es conservada.

Hemos estudiado la proteína Syf1 putativa de *E. histolytica* e identificamos a homólogos y posibles ortólogos en *S. cerevisiae*, *D. melanogaster* y *C. elegans*, aunque con un bajo porcentaje de identidad, y aún más baja homología con Syf1 de *Homo Sapiens* (Figura 9). La conservación de la secuencia es discreta sobre toda la longitud de la proteína, lo que sugiere la proteína pudo tener cambios evolutivos e inclusive puede diferir en funcionalidad. En humanos, Syf1 (XAB2) está asociada a factores específicos de TCR y a la RNA Polimerasa y se le ha conferido una participación importante en el reclutamiento de la maquinaria de reparación por esta vía (Nakatsu et al., 2000). También se ha reportado que XAB2 es requerida para optimizar el splicing de pre-RNAs y un *knockdown* de XAB2 por siRNA tiene un defecto en la transcripción y en la vía NER (Kuraoka et al., 2008). Interesantemente, células embrionarias de *D. Megalonastrer* carecen de TCR detectable y aunque Syf1 aparentemente está codificada en el genoma, se cree que carece de CSA y CSB (proteínas indispensables en la vía de TCR) (Adams et al., 2000 y de Cock et al., 1992) lo que podría indicar que Syf1 cumple distintas funciones conforme al organismo. En nuestro modelo, aunque no se han evaluado todas las funciones atribuidas a la proteína, los alineamientos indican que su estructura presenta 15 motivos TPR del tipo I (Figura 10 y apéndice 2B) al igual que la proteína XAB2, lo que podría sugerirnos que en este parásito puede tener funciones en el andamiaje de multicomplejos como se señala en proteínas que los poseen (Blatch and Lässle, 1999).

El mRNA de Syf1 de *Entamoeba histolytica* es poco abundante.

La Figura 12 demuestra que el mensajero de Syf1 de *E. histolytica* es aparentemente escaso porque se detectó la señal del mRNA en 2100 pb por RT-PCR en punto final en el RNA procesado de transfectantes que sobreexpresan Syf1. Aunque nos interesaba evaluar la

función como proteína, la indetección del mRNA en células mock y/o poco en células transfectadas para la sobreexpresión puede ser debido a que la vida media de este mensajero particularmente puede ser del orden de varias horas como se ha reportado en células de mamífero (Singer and Penman, 1973 y Harpold et al., 1981) o que el mRNA puede ser destruído rápidamente como se observó en células Hela con una vida media < 2 h (Puckett et al., 1975). También se ha reportado por Yang y colaboradores, en 2003, la destrucción selectiva por el exosoma de ciertos transcritos que llevan tractos ricos en AU, cuyo promedio de velocidad de desintegración aumenta en presencia de estos tractos, especialmente cuando se encuentran en la 3'-UTR de un gen. La falta de una fuerte correlación entre el mRNA y los niveles de expresión de proteína ha sido analizada y se debe principalmente a: (1) la regulación de la traducción, (2) las diferencias en vida media de la proteína in vivo y (3) la cantidad significativa de errores experimentales, incluidas las diferencias en las condiciones experimentales (Wu et al., 2008). También, la fracción de mRNA unido a los ribosomas en un momento dado resulta en una mejor correlación con los niveles de proteína (Maier et al., 2009). Esto conlleva a que la célula puede controlar las velocidades de degradación o síntesis de una proteína dada lo que resulta en una heterogeneidad significativa incluso dentro de las proteínas que tienen funciones similares (Greenbaum et al., 2003). Nuestros resultados analizados por PCR en punto final pueden no ser suficientes para resolver estas variabilidades en el rendimiento puesto que la resolución en gel de agarosa es muy pobre (≈ 10 veces), por lo que esperamos evaluarlo por PCR en tiempo real que es lo suficientemente sensible para detectar estos cambios. También el gen de *Syf1* puede tener discretos niveles de mRNA debido a la baja actividad del promotor. Sin embargo, aquí no se probó la actividad de los promotores endógenos mediante la creación de construcciones del gen reportero, por ejemplo con luciferasa (Morf et al., 2013). Así mismo, se encontró una señal empobrecida del mensajero de *Syf1* en transfectantes con *KTSF1* usadas como control de transfección aunque mayor con respecto a las silvestres, observación que está en concordancia con los resultados de microarreglos que revelaron una sobreexpresión de *Syf* por transfección de plásmidos en trofozoítos de *E. histolítica* (Valdés y colaboradores, comunicación personal).

Transfectantes de *Entamoeba histolytica* sobreexpresaron y silenciaron la proteína Syf1 que se localizó en el núcleo.

Nosotros evaluamos la sobreexpresión (al doble) y el silenciamiento (a la mitad) de la proteína Syf1 en transfectantes de *E. histolytica* por western blot (Figura 13). El anticuerpo empleado es exclusivo para Syf1 humana, pese a que su especificidad varía conforme a la línea celular y a que el porcentaje de identidad con la proteína Syf1 amibiana es bajo (Ver Apéndice 1A.), nos proporcionó una caracterización parcial del su nivel de expresión en las transfectantes. También en nuestros resultados de sobreexpresión se detectaron otras proteínas en el peso molecular de Syf1, estas posiblemente tengan motivos TPRs y/o sean de unión a RNA como EHI_033670 de 799 aa 93.3 KDa y/o EHI_124060 de 811 aa 94.8 KDa encontradas por BLAST en AmoebaDB, por lo que se demostró la inespecificidad del anticuerpo en concordancia a lo que observamos con su validación en extractos proteicos de células HELA (Apéndice 1B). Aunque en otros sistemas el silenciamiento por iRNA de Syf1 (XAB2) fue más eficiente (Kuraoka et al., 2008 & Ohnuma-Ishikawa et al., 2007), nuestros datos indican que el silenciamiento de la proteína Syf1 amibiana no es total debido a la herramienta molecular usada para el *knockdown* la cual permitió la generación de sRNAs antisentido de 27-nt suficientes para el silenciamiento del gen Syf1 fusionado al vector KT (Morf et al., 2013). También el endógeno puede tener estructuras secundarias por plegamiento en sí mismo (Apéndice 2A) los cuales pueden impedir la hibridación de los sRNAs AS ocasionando la disminución en la eficiencia del *knockdown*. Nuestros análisis de inmunodetección se vieron entorpecidos por la pronta degradación de proteínas aún con tratamiento con inhibidor de peptidasas de cisteína (E64). Se ha reportado que las proteasas de cisteína extracelulares están implicadas en diversos procesos fisiológicos y fisiopatológicos, incluyendo la invasión tumoral y la metástasis. En este parásito se han catalogado como unos de los de los factores que contribuyen a su patogenicidad porque trofozoítos tienen una fuerte actividad proteolítica y liberan grandes cantidades de cisteína proteinasas en medio de crecimiento (Petri, 2008).

Encontramos una potencial secuencia de localización nuclear PRRIKKRQK reportada en la proteína de motivos TPRs “cm” por Zhang et al., (1991) conforme a la secuencias de

localización nuclear clásicas (proteína antígeno T grande de SV40, Chelsky et al., 1989), la cual se ubicó desde el aminoácido 292 en la proteína Syf1 de *E. histolytica*. Por lo anterior, evaluamos a través de microscopía confocal la localización celular de la proteína Syf en trofozoítos transfectados con HASyf1 seleccionados a 5 µg/mL de G418, nuestras imágenes de inmunodetección confirmaron su ubicación nuclear (Figura 14) por colocalización de la señal de HA con DAPI. Por lo tanto, la proteína Syf1 tuvo una participación en el splicing como ya se analiza a continuación y posiblemente medie otros procesos funcionales nucleares.

La sobreexpresión de Syf1 de *Entamoeba histolytica* disminuye el pre-mRNA de los transcritos analizados y el silenciamiento lo aumenta.

Una vez corroborado que en nuestro sistema la expresión de la proteína Syf estaba siendo modificada y su localización nuclear, se examinó el impacto de la sobreexpresión y el silenciamiento de ésta en trofozoítos de *E. histolytica* cepa HM1-IMSS en transcritos de genes blanco. El reconocimiento de señales específicas dentro del intrón resulta ser crucial para su remoción. Wu y colaboradores, en 1999, demostraron que U2AF a través de sus heterodímeros reconoce señales de tracto de polipirimidinas (pY) y 3' ss específicas, por tanto, hace dos clasificaciones de los intrones; aquellos que son AG dependientes (con pY débiles) y otros independientes a AG (con pY fuertes). Demostró también que a la adición del heterodimero U2AF35/65 o sólo la subunidad de 65 kDa restablecen el splicing en transcritos independientes de AG, mientras que en transcritos AG dependientes sólo se lleva a cabo la remoción intrónica con la adición de ambas subunidades (U2AF35/65). Aunque la subunidad de 65 kDa parece tener baja afinidad por los pY débiles su interacción con la subunidad de 35 kDa la mejora. Nosotros analizamos distintos transcritos con características diferentes en su pY y sorprendentemente se observó que tanto la sobreexpresión de Syf1 potencia la remoción intrónica (disminución del pre-mRNA) mientras que el silenciamiento la decreta (aumento del pre-mRNA), lo que podría indicar que el splicing amibiano no depende de las señales intrónicas sino de la estabilidad del spliceosoma.

El intrón del transcrito *Cdc2* no posee tracto de pirimidinas (Lohia and Samuelson, 1993), este transcrito evaluado en la cepa G3 tampoco presenta diferencias en las variantes de RNA por silenciamiento de U2AF84 (Morales-Tovar, tesis de maestría 2015). Interesantemente, nuestros resultados demuestran que su remoción se llevó a cabo exitosamente por sobreexpresión de Syf1 mientras que el *knockdown* la inhibe (Figura 16). Es posible que la retención de este intrón, aunque no depende del factor auxiliar U2AF84 es dependiente de la baja expresión de Syf1 lo que indica que la estabilidad del complejo spliceosomal está mediada por esta proteína. Conforme a lo anterior, también la ausencia de Syf1 afectó el splicing de los transcritos *CIC-B1* y *EhMybS6* siendo más discreto en el primero, estos intrones analizados poseen pY pequeños y cercanos al sitio de splicing 3'ss lo que les hace requerir de la interacción de U2AF35 (Coolidge et al., 1997). En *Drosophila*, transcritos similares como *msh-2* que tienen una distancia corta entre el tracto de pirimidinas y el sitio 3'ss (pY débil) requieren la interacción de U2AF35 con la secuencia AG para estabilizar la unión de U2AF65 (Valcárcel, 1999) y llevarse a cabo la remoción del intrón. Sin embargo, nosotros demostramos que el procesamiento de transcritos AG dependientes puede estar ligado a la conformación del spliceosoma, posiblemente mediada por Syf1 a través de PRP19 en el complejo B y no al reconocimiento del intrón en el complejo A.

En transcritos AG independientes como *RabX13* y *Sam50* los cuales tienen el tracto de pirimidinas largo y bien definido cercano al 3'ss en *E. histolytica* la sobreexpresión de Syf1 potencia el splicing mientras que el *knockdown* lo inhibe independientemente de estas señales en el intrón. La expresión *EhRabB* y su localización celular ya ha sido estudiada en este parásito durante la fagocitosis (Guzmán-Medrano et al., 2005) y en el tráfico vesicular involucrado en el enquistamiento (Nakada-Tsukui et al., 2010). En las levaduras *Schizosaccharomyces pombe* y *S. cerevisiae* se demostró que el reconocimiento del intrón por U2AF65 es fundamental para la remoción intrónica debido a que las mutaciones del RRM3 de prp2 y Mud (ortólogos de U2AF65 de H. Sapiens) afectaron el procesamiento del pre-mRNA (Sridharan and Singh, 2007) y son requeridos para el correcto splicing *in vivo* (Banerjee et al., 2004). Sin embargo, con nuestros resultados predecimos en *E. histolytica* que al igual que los transcritos AG dependientes, el splicing amebiano es dependiente de la presencia o ausencia de la proteína Syf1 (la cual podría estar conformando el PRP19) para

cumplir su función en el spliceosoma pre-catalítico y no de las señales de reconocimiento del intrón por U2AF.

El transcrito de *Actina* no se vió afectado excepto en el *knockdown* de la proteína a una selección de 10 µg respecto a su control. *Actina* participa activamente en la invasión a su huésped puesto que uno de los primeros signos para este suceso es la polimerización de moléculas de actina durante fijación del parásito a células diana (Bailey et al., 1985, 1987). Debido a que se evaluó la participación de Syf1 en el splicing amibiano, no esperábamos que hubiera una alteración en este transcrito porque no presenta intrones, sin embargo, nuestros resultados muestran que posiblemente la ausencia de Syf1 afecta la transcripción. Esto puede ser debido a que Syf1 esté interactuando con la polimerasa y con los componentes de THO que facilitan la elongación de la transcripción como se ha reportado en *S. cerevisiae* (Rondón et al., 2003) o en *H. Sapiens* (Nakatsu et al., 2000 & Chanarat et al., 2011). La disminución en la transcripción por *knockdown* de Syf1 y conforme a lo reportado (Nakatsu et al., 2000) también puede haber perturbado splicing de pre-mRNAs.

En *S. cerevisiae*, NTC está formado por ocho proteínas centrales como Syf1 (XAB2 ≈94 kDa en humano) y hasta 19 proteínas asociadas (Chanarat and Sträßer, 2013), ésteparticipa en el splicing (Tarn et al., 1994), en humanos se ha reportado como hPrp/CDC5L (Ajuh et al., 2000) en donde XAB2 forma parte del complejo con las helicasas Aquarius DEXD, hCDC5, hISY1, PPIE junto con proteínas que activan el spliceosoma (Kuraoka et al., 2008). Como PRP19 es esencial para la formación del Complejo B* activado (Chan et al., 2003), los hallazgos anteriores en levadura encajan muy bien con nuestra observación de que Syf1 de *E. histolytica* es una proteína que participa activamente en el splicing y que posiblemente estaría formando parte del complejo PRP19 ya que éste fue identificado por Valdés et al., 2014 en estudios proteómicos de ribonucleopartículas de mensajero. Por otra parte, Syf3 también se ha reportado como una proteína que participa en el procesamiento de mRNAs en *S. Cerevisie* (Russell et al., 2000). Nosotros realizamos un BLAST de esta en la base de datos de amoebaDB y encontramos que su posible ortólogo es de 473 aa (EHI_175230) el cual nose ha estudiado y se desconoce su función sin embargo, posiblemente también ejerce un papel en el splicing cuando hay un silenciamiento de Syf1 debido a que no observamos

disminución en la supervivencia por el *knockdown* mientras que en humanos sí se evidenció (Kuraoka et al., 2008).

La funcionalidad de XAB2 puede proporcionar una pista para entender el papel de Syf1 amebiana; nuestros datos muestran que Syf1 de *E. histolytica* puede ser el ortólogo de XAB2 humano y CFL1 de levadura, en nuestro modelo parece ser que la proteína forma parte del centro del complejo PRP19 y puede ser esencial para el ensamblaje del spliceosoma gracias a los motivos TPR que encontramos (Figura 10). Por lo tanto, es posible que también está involucrada en los procesos asociados con el control del ciclo celular (Russell et al., 2000), exporte de mRNA vía THEX/THO (Chanarat et al., 2011) como se ha reportado en *S. cerevisiae* y/o en la reparación de DNA vía TCR reportado en *H. sapiens* (Nakatsu et al., 2000 & Kuraoka et al., 2008). Por otra parte, la biogénesis de flicRNAs (intrones de longitud total circularizados) de amiba ya ha sido estudiada por Mendoza-Figueroa, en 2016 (tesis doctorado), estos aparecen ser dependientes del procesamiento del RNA debido a que su expresión incrementa concomitante a la del mRNA, aunque su biogénesis no ha sido esclarecida la formación de flicRX13 puede ser producida a partir de una reacción de desramificación deficiente por la enzima Dbr1. Interesantemente, ya se ha reportado que XAB2 puede interactuar con hDbr1 *in vivo* e *in vitro* (Masaki et al., 2015) y en levadura análisis de dobles híbrido también demuestran la interacción de Dbr1 con Syf1/Ntc90 (Garrey et al., 2014), si bien la función biológica de esta asociación actualmente se desconoce se puede explorar la idea de que posiblemente en amiba Syf1 que participa activamente en el splicing soporte a la enzima hDbr1 para ejercer su papel en la circularización de los intrones.

También es de interés corroborar si una delección del carboxilo de la proteína Syf1 amibina afecta simultáneamente la transcripción y el splicing, como lo encontramos con el *knockdown*. La delección de los últimos cuatro motivos TPRs en otros organismos disminuye su interacción con la polimerasa, afecta el reclutamiento de los transcritos para su exporte hacia citoplasma (Chan et al., 2003) y la microinyección en células normales de anti-XAB2 dirigidos al carboxilo inhibe la RRS y la síntesis de RNA naciente (Nakatsu et al., 2000). En nuestro modelo de estudio tales aspectos no se han investigado y hacerlo nos llevaría al mejor entendimiento de la funcionalidad de la proteína. Tampoco descartamos la

posibilidad de que como parte del complejo PRP19, Syf1 esté involucrada en la formación de gotitas de lípidos (orgánulos subcelulares de almacenamiento de lípidos neutros, principalmente triglicéridos) conforme a lo reportado con el descenso en la expresión Pso4/Prp19 mediante iRNA en las células 3T3-L1 lo cual inhibió la expresión de proteínas asociadas su biogénesis (perilipina y S3-12) (Cho et al., 2007).

CONCLUSIONES

- La proteína Syf1 de *Entamoeba histolytica* tiene 15 motivos TPRs de la clase I.
- Syf1 amebiana localiza en el núcleo de los trofozoítos.
- La sobreexpresión y silenciamiento de Syf1 afectó respectivamente, positiva o negativamente el splicing de distintos transcritos amebianos sin importar los elementos que componen el 3' ss.
- De la misma manera, en transcritos sin intrones, el silenciamiento de Syf1 afectó moderadamente su transcripción.
- Nuestros datos apoyan la interpretación de que Syf1 de *E. histolytica* pudiera ser el ortólogo de XAB2 humano y CFL1 de levadura y que posiblemente forme parte del NTC para una formación más estable del spliceosoma amibiano.

PERSPECTIVAS

Detectar el mensajero de Syf1 por PCR en tiempo real.

Hacer experimentos de pull-down para probar la interacción de Syf1 con otros factores nucleares.

Evaluar, si de manera análoga a XAB2, el COOH de Syf1 sea el responsable de la participación en el splicing amebiano.

BIBLIOGRAFÍA

- Adams, M.D., Celniker, S.E., Holt, R.A., Evans, C.A., Gocayne, J.D., Amanatides, P.G., Scherer, S.E., Li, P.W., Hoskins, R.A., Galle, R.F., et al. (2000). The Genome Sequence of *Drosophila melanogaster*. *Science* 287, 2185–2195.
- Ajuh, P., Kuster, B., Panov, K., Zomerdijk, J.C.B.M., Mann, M., and Lamond, A.I. (2000). Functional analysis of the human CDC5L complex and identification of its components by mass spectrometry. *EMBO J.* 19, 6569–6581.
- Bailey, G.B., Day, D.B., Nokkaew, C., and Harper, C.C. (1987). Stimulation by target cell membrane lipid of actin polymerization and phagocytosis by *Entamoeba histolytica*. *Infect. Immun.* 55, 1848–1853.
- Banerjee, H., Rahn, A., Gawande, B., Guth, S., Valcarcel, J., and Singh, R. (2004). The conserved RNA recognition motif 3 of U2 snRNA auxiliary factor (U2AF 65) is essential in vivo but dispensable for activity in vitro. *RNA N. Y. N* 10, 240–253.
- Bentley, D.L. (2014). Coupling mRNA processing with transcription in time and space. *Nat. Rev. Genet.* 15, 163–175.
- Blatch, G.L., and Lässle, M. (1999). The tetratricopeptide repeat: a structural motif mediating protein-protein interactions. *BioEssays* 21, 932–939.
- Brow, D.A. (2002). Allosteric Cascade of Spliceosome Activation. *Annu. Rev. Genet.* 36, 333–360.
- Carmody, S.R., and Wenthe, S.R. (2009). mRNA nuclear export at a glance. *J. Cell Sci.* 122, 1933–1937.
- Chan, S.-P., Kao, D.-I., Tsai, W.-Y., and Cheng, S.-C. (2003). The Prp19p-Associated Complex in Spliceosome Activation. *Science* 302, 279–282.
- Chanarat, S., and Sträßer, K. (2013). Splicing and beyond: The many faces of the Prp19 complex. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Res.* 1833, 2126–2134.
- Chanarat, S., Seizl, M., and Sträßer, K. (2011). The Prp19 complex is a novel transcription elongation factor required for TREX occupancy at transcribed genes. *Genes Dev.* 25, 1147–1158.
- Chelsky, D., Ralph, R., and Jonak, G. (1989). Sequence requirements for synthetic peptide-mediated translocation to the nucleus. *Mol. Cell. Biol.* 9, 2487–2492.
- Cho, S.Y., Shin, E.S., Park, P.J., Shin, D.W., Chang, H.K., Kim, D., Lee, H.H., Lee, J.H., Kim, S.H., Song, M.J., et al. (2007). Identification of Mouse Prp19p as a Lipid Droplet-associated Protein and Its Possible Involvement in the Biogenesis of Lipid Droplets. *J. Biol. Chem.* 282, 2456–2465.

de Cock, J.G.R., Klink, E.C., Lohman, P.H.M., and Eeken, J.C.J. (1992). Absence of strand-specific repair of cyclobutane pyrimidine dimers in active genes in *Drosophila melanogaster* Kc cells. *Mutat. Res. Repair* 274, 85–92.

Coolidge, C.J., Seely, R.J., and Patton, J.G. (1997). Functional analysis of the polypyrimidine tract in pre-mRNA splicing. *Nucleic Acids Res* 25, 888–896.

Das, A.K., Cohen, P.W., and Barford, D. (1998). The structure of the tetratricopeptide repeats of protein phosphatase 5: implications for TPR-mediated protein-protein interactions. *EMBO J.* 17, 1192–1199.

Davis, C. a., Brown, M.P.S., and Singh, U. (2007). Functional characterization of spliceosomal introns and identification of U2, U4, and U5 snRNAs in the deep-branching eukaryote *Entamoeba histolytica*. *Eukaryot. Cell* 6, 940–948.

Greenbaum, D., Colangelo, C., Williams, K., and Gerstein, M. (2003). Comparing protein abundance and mRNA expression levels on a genomic scale. *Genome Biol.* 4, 117.

Guzmán-Medrano, R., Castillo-Juárez, B. a., García-Pérez, R.M., Salas-Casas, A., Orozco, E., and Rodríguez, M. a. (2005). *Entamoeba histolytica*: Alterations in EhRabB protein in a phagocytosis deficient mutant correlate with the *Entamoeba dispar* RabB sequence. *Exp. Parasitol.* 110, 259–264.

Hamann, L., Nickel, R., and Tannich, E. (1995). Transfection and continuous expression of heterologous genes in the protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 92, 8975–8979.

Hanawalt, P.C., and Spivak, G. (2008). Transcription-coupled DNA repair: two decades of progress and surprises. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 9, 958–970.

Harpold, M.M., Wilson, M.C., and Darnell, J.E. (1981). Chinese hamster polyadenylated messenger ribonucleic acid: relationship to non-polyadenylated sequences and relative conservation during messenger ribonucleic acid processing. *Mol. Cell. Biol.* 1, 188–198.

Harvey Lodish, Arnold Berk, Lawrence Zipursky, Paul Matsudaira, David Baltimore, J.E.D. (2000). *Molecular Cell Biology* (New York: W. H. Freeman and Company).

Hon, C.-C., Weber, C., Sismeiro, O., Proux, C., Koutero, M., Deloger, M., Das, S., Agrahari, M., Dillies, M.-A., Jagla, B., et al. (2013). Quantification of stochastic noise of splicing and polyadenylation in *Entamoeba histolytica*. *Nucleic Acids Res.* 41, 1936–1952.

Jurica, M.S., and Moore, M.J. (2003). Pre-mRNA Splicing: Awash in a Sea of Proteins. *Mol. Cell* 12, 5–14.

Kuraoka, I., Ito, S., Wada, T., Hayashida, M., Lee, L., Saijo, M., Nakatsu, Y., Matsumoto, M., Matsunaga, T., Handa, H., et al. (2008). Isolation of XAB2 Complex Involved in Pre-mRNA Splicing, Transcription, and Transcription-coupled Repair. *J. Biol. Chem.* 283, 940–950.

Lander, E.S., Linton, L.M., Birren, B., Nusbaum, C., Zody, M.C., Baldwin, J., Devon, K., Dewar, K., Doyle, M., FitzHugh, W., et al. (2001). Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 409, 860–921.

Levine, A., and Durbin, R. (2001). A computational scan for U12-dependent introns in the human genome sequence. *Nucleic Acids Res.* 29, 4006–4013.

Lewin, B. (2008). *Genes* 9 (Jones & Bartlett Learning).

Loftus, B., Anderson, I., Davies, R., Alsmark, U.C.M., Samuelson, J., Amedeo, P., Roncaglia, P., Berriman, M., Hirt, R.P., Mann, B.J., et al. (2005). The genome of the protist parasite *Entamoeba histolytica*. *Nature* 433, 865–868.

Lohia, a, and Samuelson, J. (1993). Cloning of the Eh cdc2 gene from *Entamoeba histolytica* encoding a protein kinase p34cdc2 homologue. *Gene* 127, 203–207.

Lopez, P.J., and Séraphin, B. (2000). YIDB: the Yeast Intron DataBase. *Nucleic Acids Res.* 28, 85–86.

Lorenzi, H. a., Puiu, D., Miller, J.R., Brinkac, L.M., Amedeo, P., Hall, N., and Caler, E. V. (2010). New assembly, reannotation and analysis of the *Entamoeba histolytica* genome reveal new genomic features and protein content information. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 4.

Maier, T., Güell, M., and Serrano, L. (2009). Correlation of mRNA and protein in complex biological samples. *FEBS Lett.* 583, 3966–3973.

Maniatis, T., and Reed, R. (2002). An extensive network of coupling among gene expression machines. *Nature* 416, 499–506.

Masaki, S., Yoshimoto, R., Kaida, D., Hata, A., Satoh, T., Ohno, M., and Kataoka, N. (2015). Identification of the Specific Interactors of the Human Lariat RNA Debranching Enzyme 1 Protein. *Int. J. Mol. Sci.* 16, 3705–3721.

Masuda, S., Das, R., Cheng, H., Hurt, E., Dorman, N., and Reed, R. (2005). Recruitment of the human TREX complex to mRNA during splicing. *Genes Dev.* 19, 1512–1517.

Matlin A.J., Clark F., Smith C.W., Clark F., Smith C.W., Smith C.W. Understanding alternative splicing: Towards a cellular code. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2005;6:386–398.

McGuire, A.M., Pearson, M.D., Neafsey, D.E., and Galagan, J.E. (2008). Cross-kingdom patterns of alternative splicing and splice recognition. *Genome Biol.* 9, R50.

Mendoza-Figueroa S.M. (2016). Retención y circularización intrónica en *Entamoeba histolytica*. Tesis de Doctorado. Cinvestav-Departamento de Bioquímica.

Miranda, R., Salgado, L.M., Sánchez-López, R., Alagón, A., and Lizardi, P.M. (1996). Identification and analysis of the u6 small nuclear RNA gene from *Entamoeba histolytica*. *Gene* 180, 37–42.

Montemayor, E.J., Katolik, A., Clark, N.E., Taylor, A.B., Schuermann, J.P., Combs, D.J., Johnsson, R., Holloway, S.P., Stevens, S.W., Damha, M.J., et al. (2014). Structural basis of lariat RNA recognition by the intron debranching enzyme Dbr1. *Nucleic Acids Res.* gku725.

Morf, L., Pearson, R.J., Wang, A.S., and Singh, U. (2013). Robust gene silencing mediated by antisense small RNAs in the pathogenic protist *Entamoeba histolytica*. *Nucleic Acids Res.* 41, 9424–9437.

Morales-Tovar M (2015). Efecto del silenciamiento del factor auxiliar U2AF84 sobre el splicing de pre-mRNAs de *Entamoeba histolytica*. Tesis maestría. Cinvestav - Departamento de Bioquímica.

Nakada-Tsukui, K., Saito-Nakano, Y., Husain, A., and Nozaki, T. (2010). Conservation and function of Rab small GTPases in *Entamoeba*: Annotation of *E. invadens* Rab and its use for the understanding of *Entamoeba* biology. *Exp. Parasitol.* 126, 337–347.

Nakatsu, Y., Asahina, H., Citterio, E., Rademakers, S., Vermeulen, W., Kamiuchi, S., Yeo, J.-P., Khaw, M.-C., Saijo, M., Kodo, N., et al. (2000). XAB2, a Novel Tetratricopeptide Repeat Protein Involved in Transcription-coupled DNA Repair and Transcription. *J. Biol. Chem.* 275, 34931–34937.

Ohnuma-Ishikawa, K., Morio, T., Yamada, T., Sugawara, Y., Ono, M., Nagasawa, M., Yasuda, A., Morimoto, C., Ohnuma, K., Dang, N.H., et al. (2007). *Knockdown* of XAB2 Enhances All-Trans Retinoic Acid-Induced Cellular Differentiation in All-Trans Retinoic Acid-Sensitive and -Resistant Cancer Cells. *Cancer Res.* 67, 1019–1029.

Patel, A.A., and Steitz, J.A. (2003). Splicing double: insights from the second spliceosome. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 4, 960–970.

Petri, W.A. (2008). Intestinal invasion by *Entamoeba histolytica* shahram solaymani-mohammadi. *Subcell. Biochem.* 47, 221–232.

Puckett, L., Chambers, S., and Darnell, J.E. (1975). Short-lived messenger RNA in HeLa cells and its impact on the kinetics of accumulation of cytoplasmic polyadenylate. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 72, 389–393.

Reed, R. (1989). The organization of 3' splice-site sequences in mammalian introns. *Genes Dev.* 3, 2113–2123.

Reed, R., and Cheng, H. (2005). TREX, SR proteins and export of mRNA. *Curr. Opin. Cell Biol.* 17, 269–273.

Rondón, A.G., Jimeno, S., García-Rubio, M., and Aguilera, A. (2003). Molecular Evidence That the Eukaryotic THO/TREX Complex Is Required for Efficient Transcription Elongation. *J. Biol. Chem.* 278, 39037–39043.

- Russell, C.S., Ben-Yehuda, S., Dix, I., Kupiec, M., and Beggs, J.D. (2000). Functional analyses of interacting factors involved in both pre-mRNA splicing and cell cycle progression in *Saccharomyces cerevisiae*. *RNA* 6, 1565–1572.
- Saito-Nakano, Y., Yasuda, T., Nakada-Tsukui, K., Leippe, M., and Nozaki, T. (2004). Rab5-associated Vacuoles Play a Unique Role in Phagocytosis of the Enteric Protozoan Parasite *Entamoeba histolytica*. *J. Biol. Chem.* 279, 49497–49507.
- Schiffer, M., and Edmundson, A.B. (1967). Use of Helical Wheels to Represent the Structures of Proteins and to Identify Segments with Helical Potential. *Biophys. J.* 7, 121–135.
- Schwartz, S.H., Silva, J., Burstein, D., Pupko, T., Eyras, E., and Ast, G. (2008). Large-scale comparative analysis of splicing signals and their corresponding splicing factors in eukaryotes. *Genome Res.* 18, 88–103.
- Sikorski, R.S., Michaud, W.A., Wootton, J.C., Boguski, M.S., Connelly, C., and Hieter, P. (1991). TPR Proteins as Essential Components of the Yeast Cell Cycle. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 56, 663–673.
- Singer, R.H., and Penman, S. (1973). Messenger RNA in HeLa cells: Kinetics of formation and decay. *J. Mol. Biol.* 78, 321–334.
- Sridharan, V., and Singh, R. (2007). A conditional role of U2AF in splicing of introns with unconventional polypyrimidine tracts. *Mol. Cell. Biol.* 27, 7334–7344.
- Tanyuksel, M., Jr, W. a P., and Petri, W. a (2003). Laboratory Diagnosis of Amebiasis. *Clin. Microbiol. Rev.* 16, 1–18.
- Tarn, W.Y., Hsu, C.H., Huang, K.T., Chen, H.R., Kao, H.Y., Lee, K.R., and Cheng, S.C. (1994). Functional association of essential splicing factor(s) with PRP19 in a protein complex. *EMBO J.* 13, 2421–2431.
- Valca, J. (1999). Inhibition of msl-2 splicing by Sex-lethal reveals interaction between U2AF 35 and the 39 splice site AG. *Nature* 402, 1–4.
- Valdés, J., Nozaki, T., Sato, E., Chiba, Y., Nakada-Tsukui, K., Villegas-Sepúlveda, N., Winkler, R., Azuara-Liceaga, E., Mendoza-Figueroa, M.S., Watanabe, N., et al. (2014). Proteomic analysis of *Entamoeba histolytica* in vivo assembled pre-mRNA splicing complexes. *J. Proteomics* 111, 30–45.
- Venema, J., Mullenders, L.H., Natarajan, A.T., Zeeland, A.A. van, and Mayne, L.V. (1990). The genetic defect in Cockayne syndrome is associated with a defect in repair of UV-induced DNA damage in transcriptionally active DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 87, 4707–4711.
- Wilihoeft, U., Campos-Góngora, E., Touzni, S., Bruchhaus, I., and Tannich, E. (2001). Introns of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar*. *Protist* 152, 149–156.

Wu, G., Nie, L., and Zhang, W. (2008). Integrative Analyses of Posttranscriptional Regulation in the Yeast *Saccharomyces*. *Curr. Microbiol.* *57*, 18–22.

Wu, S., Romfo, C.M., Nilsen, T.W., and Green, M.R. (1999). Functional recognition of the 3' splice site AG by the splicing factor U2AF35. *Nature* *402*, 832–835.

Yang, E., Nimwegen, E. van, Zavolan, M., Rajewsky, N., Schroeder, M., Magnasco, M., and Darnell, J.E. (2003). Decay Rates of Human mRNAs: Correlation With Functional Characteristics and Sequence Attributes. *Genome Res.* *13*, 1863–1872.

Zenklusen, D., Vinciguerra, P., Wyss, J.-C., and Stutz, F. (2002). Stable mRNP Formation and Export Require Cotranscriptional Recruitment of the mRNA Export Factors Yra1p and Sub2p by Hpr1p. *Mol. Cell. Biol.* *22*, 8241–8253.

APÉNDICE

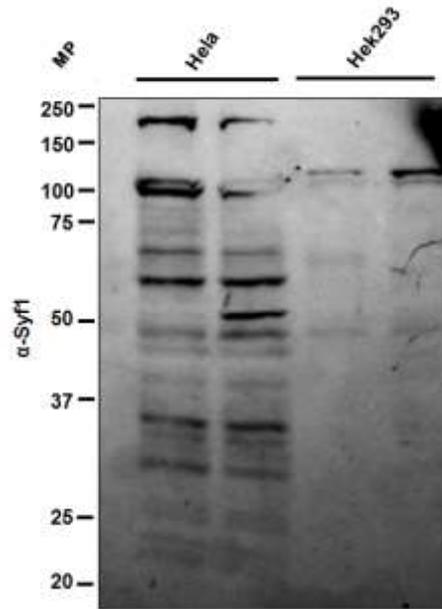
A.

```

AntiXAB2_30-243_aa  -----NQFSVKCWLRYIEFKQGAPKPRLNQLYERALKLLPCSYKLWYRY
EHI_073300_        MNEEKNISIEYFDVKQNPQSFKTWNNYIEYFDESHFQSKITIFQRALHELPGSYKLWYHY
                    *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *
AntiXAB2_30-243_aa  LKARRAQVKHRCVTDPAYEDVNNCHERAFVFMHKMPRLWLDYCQFLMDQGRVTHTRRTFD
EHI_073300_        LQTTILINARKSGIDTEIRKSVNEVFEEESLVYMNKMPVIWKLYIEWLIENGEITQMRRVFD
                    *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *
AntiXAB2_30-243_aa  RALRAMPIITQHSRIWPLYLRFRLRSHPLPETAVRGYRFLKLSPEAEYIEYLKS-----
EHI_073300_        RSLQSLPIGQHNELWKVVMKRVITLNTPLLFKLVLRHILLDRGMIGEYIQICKKKEKY
                    *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *

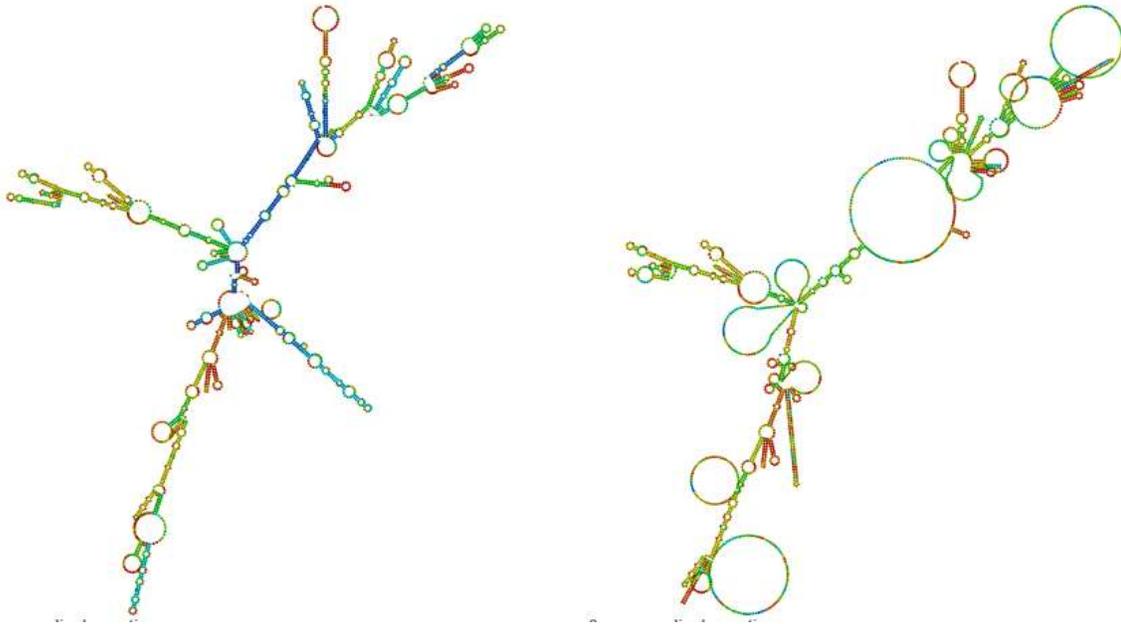
```

B.



Apéndice 1. Validación de anti-XAB2. A. Alineamiento del epítipo de anti-XAB2 frente a Syf1 ambiana (EHI_073300), los aminoácidos totalmente conservados (asterisco azul rey) y conservados los grupos fuertes (dos puntos color verde) y/o conservados como grupos débiles (punto negro). Alineamiento hecho en Biology WorkBench con Clustalwprof. B. Extractos totales de proteínas de células HeLa y Hek293 se obtuvieron por buffer de lisis y se resolvieron por SDS-PAGE en un gel 10%. La inmunotransferencia con anti-XAB2 por duplicado con resultados similares.

A.



B.



Apéndice 2. Predicción de la estructura por plegamiento del gen y la proteína Syf1 de *Entamoeba histolytica*. **A.** Plegamiento del gen de Syf1 de *E. histolytica*. Imagen obtenida en RNAfold desde los nucleotidos de 5' → 3' del gen de Syf1. **B.** Estructura de la proteína Syf1. Imagen obtenida en I-tasser desde los 699 aa en formato FASTA.

Clustal Conservation Groups

The clustal format read and written by [Multalign Viewer](#) includes characters symbolizing degree of conservation.

Positions where every residue is the same type (complete identity) are marked with an asterisk (*).

Positions where one of the following **strong** groups is fully conserved are marked with a colon (:).

STA
NEQK
NHQK
NDEQ
QHRK
HILV
HILF
HY
FVH

Positions where one of the following **weak** groups is fully conserved are marked with a period (.)

CSA
ATV
SAG
STHK
STPA
SGND
SMDEQK
NDEQHI
NEQHRK
FVLIIH
HFV

The groups are defined using the PAM250 matrix: scores within the strong groups are over 0.5 and scores within the weak groups are positive but no greater than 0.5.

Other positions are not marked with any character.

UCSF Computer Graphics Laboratory / April 2003

Apéndice 3. Especificación nomenclatura aminoácidos en Workbench. En la imagen se indica los aminoácidos conservados como grupos fuertes (dos puntos verdes en alimeamientos) y/o conservados como grupos débiles (punto azul oscuro en alimeamientos).