



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

**UNIDAD ZACATENCO
DEPARTAMENTO DE INFECTÓMICA Y PATOGÉNESIS
MOLECULAR**

**"Análisis de la heterodimerización del complejo EhCPADH de
Entamoeba histolytica y su asociación con la proteína claudina-2 de las
uniones epiteliales"**

**TESIS QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
Doctora en Ciencias en Infectómica y Patogénesis Molecular**

PRESENTA

M. en C. Maricela Sarita Montaña Valdéz

Ciudad de México, enero de 2016

El presente trabajo se realizó en el laboratorio 2 del Departamento de Infectómica y Patogénesis Molecular del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV-IPN), bajo la dirección de la Dra. Esther Orozco Orozco y la co-dirección de la Dra. Abigail Betanzos Fernández y gracias al apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología. La beca otorgada por el CONACyT para la realización del presente trabajo correspondió al número de registro: 241649. El proyecto fue apoyado por el Instituto de Ciencia y Tecnología con número: 64-2012

COMITÉ TUTORIAL

DIRECTORA

Dra. Esther Orozco Orozco

Centro de Investigación y de Estudios Avanzados CINVESTAV-IPN
Departamento de Infectómica y Patogénesis Molecular

CO-TUTORA

Dra. Abigail Betanzos Fernández

Centro de Investigación y de Estudios Avanzados CINVESTAV-IPN
Departamento de Infectómica y Patogénesis Molecular

ASESORES

Rossana Arroyo Verástegui

Centro de Investigación y de Estudios Avanzados CINVESTAV-IPN
Departamento de Infectómica y Patogénesis Molecular

Dr. Mario Alberto Rodríguez Rodríguez

Centro de Investigación y de Estudios Avanzados CINVESTAV-IPN
Departamento de Infectómica y Patogénesis Molecular

Dr. José Correa Basurto

Escuela Superior de Medicina del IPN
Coordinador Líder del Departamento de Posgrado e Investigador de la SEPI-ESM

Dr. Michael Schnoor

Centro de Investigación y de Estudios Avanzados CINVESTAV-IPN
Departamento de Biomedicina Molecular

Dra. Cecilia Bañuelos Barrón

Instituto Politécnico Nacional
Directora de la unidad de desarrollo tecnológico del IPN

A Sara

Si deve suonare tutto questo pezzo delicatissimamente e senza sordini

sempre pp e senza sordini

Tacu miaá noo anímai

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a la Dra. Esther Orozco Orozco por la dirección al presente trabajo, su disponibilidad, aportaciones, sugerencias y el apoyo otorgado.

A la Dra. Abigail Betanzos Fernández por la co-dirección del trabajo, por su apoyo, sugerencias, participación y disponibilidad. Un ejemplo de lucha constante.

Al Dr. José Correa Basurto, por aceptarme dentro de su grupo de investigación, por la participación, observaciones, sugerencias que enriquecieron en gran medida este proyecto.

A los asesores de este trabajo, el Dr. Mario Alberto Rodríguez, Dra. Rossana Arroyo Verástegui, Dra. Cecilia Bañuelos Barrón y al Dr. Michael Schnoor, Por el tiempo dedicado, las sugerencias y aportaciones para mejorar este trabajo.

Al Dr. Jaime Ortega López, por el apoyo, la confianza, las observaciones, sugerencias para mejorar el trabajo y sobre todo por el espacio otorgado en su laboratorio, su ayuda fue fundamental en el desarrollo este proyecto.

Al Dr. Jaime García Mena, por el apoyo, sugerencias y observaciones en la realización de este proyecto, así como el espacio otorgado en su laboratorio para el desarrollo del presente trabajo.

A la Dra. Olga Zamudio Prieto, por su paciencia, generosidad y apoyo incondicional, su ayuda fue un factor clave en el progreso de este trabajo.

Al Dr. Carlos Zepactonal Gómez Castro, por sus observaciones, disponibilidad y apoyo en el desarrollo de este proyecto

Al M en C Fernando Violante Mota, por su disponibilidad y apoyo incondicional, su ayuda fue invaluable en la culminación de este trabajo.

Héctor Oliver Hernández, por su valiosa participación, amabilidad, disponibilidad y su ayuda incondicional en el desarrollo del presente trabajo.

A mis compañeros y amigos del laboratorio y de los laboratorios en donde desarrollé parte de este trabajo, de los que aprendí e hicieron que mi estancia fuera amena: Wendy Fonseca, Ramón Ocadiz, Marlet Martínez, Normandé Carrillo, Gema Ramírez, Jhonatan Pais, Jenny Bolaños, Rosario Javier, Silvia Castellanos, Ravi Kumar, Luilli Contreras, Fernando Violante, Rosa María Pineda, Olga Zamudio, César Zapata, Marcos Muñiz, Elahe Mirzaei, Guillermina García, Tomás Sánchez, Elizabeth Nava, Patricia Cuellar, Alejandrina Reyez y Rocío Guerrero.

A mis amigos de vida: Beni Camacho Pérez, Irma Teresita Aguilar Camacho, Libia Castro Morales, Violeta Graciano Graciano, Carmen Vargas Peralta, Nedel Sánchez Gonzales, Janet Zamarripa Vizcarra, Anayeli Zavala Huerta, Amilamia Acuña, por su apoyo incondicional, paciencia y comprensión las veces que he estado ausente en sus proyectos de vida.

A mi Familia, a mis padres: Idalia Valdéz Rueda y Adán Montaña Navarrete, a mis hermanos Adán, Javier y Dulce, a todos mis sobrinitos, por motivarme a ser mejor cada día, por su apoyo y amorosa comprensión. A mi tata por su amor y lecciones de vida.

A LANCAD y a los responsables de este valioso proyecto en pro de la ciencia en México, por el apoyo brindado en este proyecto.

A los integrantes del Clúster Híbrido de Supercomputo Xiuhcoatl, Ricardo Velázquez y Héctor Oliver Hernández, por los recursos computacionales otorgados a la realización de este proyecto.

A la Universidad Autónoma de Sinaloa por permitirme ser parte del grupo Doctores Jóvenes, por el apoyo a la ciencia y a este nuevo proyecto de relevo generacional.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	1
1. AMEBIASIS	1
2. CICLO DE VIDA DE <i>E. HISTOLYTICA</i>	1
3. PATOGENICIDAD DE <i>E. HISTOLYTICA</i>	4
3.1 Adhesión	4
3.2 Citólisis	5
3.3 Fagocitosis	6
4. COMPLEJO EHCPADH	7
4.1. CISTEÍNAS PROTEASAS (CPs) DE <i>E. HISTOLYTICA</i>	8
4.1.1. <i>EhCP112</i>	13
4.2. EHADH.....	14
5. INVASIÓN DE <i>E. HISTOLYTICA</i> AL EPITELIO	16
6. UNIONES INTERCELULARES (UIC)	16
6.1 UNIONES ESTRECHAS (UES).....	19
6.1.1. <i>Claudinas</i>	22
7. PATÓGENOS QUE AFECTAN LA UE	23
7.1 EFECTO DE <i>E. HISTOLYTICA</i> SOBRE LA UE.....	25
8. ANÁLISIS <i>IN SILICO</i>	26
8.1. DINÁMICA MOLECULAR (DM).....	27
8.1.1. <i>Mecánica clásica</i>	28
8.2. ACOPLAMIENTO MOLECULAR	30
9. MÉTODOS DE ESTUDIO DE LAS INTERACCIONES ENTRE PROTEÍNAS	31
9.1 RESONANCIA DE PLASMÓN SUPERFICIALES (RPS).....	32
10 JUSTIFICACIÓN	36
11. HIPÓTESIS	37
12. OBJETIVOS	38
12. 1. OBJETIVO GENERAL	38
12.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	38
13. MATERIALES Y MÉTODOS	39
13.1. ANÁLISIS <i>IN SILICO</i>	39
13.1.1. <i>Modelaje tridimensional de las proteínas</i>	39
13.1.2. <i>Modelo teórico de la estructura 3D de EhCP112</i>	40
13.1.3. <i>Modelo teórico de la estructura 3D de EhADH</i>	40
13.1.4. <i>Modelo teórico de la estructura 3D de claudina-2</i>	41

13.2. EVALUACIÓN DE LOS MODELOS TEÓRICOS 3D Y SU UBICACIÓN EN LA MEMBRANA	41
13.3. DINÁMICA MOLECULAR (DM)	42
13.3.1. ANÁLISIS DE LA TRAYECTORIA DE DM	43
13.4. ACOPLAMIENTO MOLECULAR	44
13.5. ESTUDIOS EXPERIMENTALES	45
13.5.1. Cultivo celular	45
13.5.2. Cultivo de la línea celular Caco-2	45
13.5.3. Preparación de bacterias <i>Escherichia coli</i> competentes	46
13.5.4. Clonación del gen <i>Ehadh</i> de <i>E. histolytica</i>	46
13.5.5. Transformación de bacterias competentes	47
13.5.6. Expresión de las proteínas recombinantes	48
13.5.7. Purificación de las proteínas recombinantes	48
13.5.8. Ensayos de inmunofluorescencia indirecta	49
13.5.9. Resonancia de plasmón superficiales (RPS)	50
14. RESULTADOS	52
14.1. RESULTADOS BIOINFORMÁTICOS	53
14.1.1. Generación del modelo teórico de las estructuras terciarias	53
14.1.2. Evaluación de los modelos teóricos 3D	63
14.1.3. Orientación de las proteínas en membranas	65
14.1.4. Dinámica molecular (DM)	68
14.1.5. Evaluación de la trayectoria de DM	79
14.1.6. Distancia entre los residuos catalíticos de la proteína EhCP112	87
14.1.8. Acoplamiento molecular entre pEhCP112 y EhADH	90
14.1.9. Acoplamiento molecular entre mEhCP112 y EhADH	94
14.1.10. Complementariedad entre EhCP112 y EhADH	97
14.1.11. Acoplamiento molecular entre las proteínas mEhCP112 y claudina-2	102
14.1.12. Acoplamiento molecular entre las proteínas EhADH y claudina-2	105
14.2. RESULTADOS EXPERIMENTALES	107
14.2.1. Localización de las proteínas EhCP112 y EhADH en trofozoítos de <i>E. histolytica</i>	107
14.2.2. Asociación entre EhCP112 y EhADH	112
Ensayos de inmunoprecipitación	112
14.2.3. Estudios de RPS	114
14.2.4. Purificación de la proteína recombinante His-pEhCP112	114
14.2.5. Generación y purificación de la proteína recombinante His-EhADH	116
14.2.6. Cinética de unión entre las proteínas pEhCP112 y EhADH	119
15. DISCUSIÓN	128
16. CONCLUSIONES	143
17. BIBLIOGRAFÍA	145

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 Ciclo de vida de <i>E. histolytica</i>	3
Figura 2. Estructura lineal de las cisteínas proteasas de <i>E. histolytica</i>	9
Figura 3. Mecanismo de hidrólisis del sustrato de las proteasas de la familia de las papaínas	12
Figura 4. Modelo simplificado de los complejos de UIC	18
Figura 5. Proteínas de la UE y la replicación de virus	21
Figura 6. Estrategias que utilizan algunos patógenos para alterar la unión estrecha	24
Figura 7. Inmunosensor de RPS, basado en el método de Kretschmann	35
Figura 8. Estructura 3D de la proteína pEhCP112 de <i>E. histolytica</i>	55
Figura 9. Estructura 3D de la proteína mEhCP112 de <i>E. histolytica</i>	57
Figura 10. Estructura 3D de la proteína EhADH de <i>E. histolytica</i>	59
Figura 11. Estructura 3D de la proteína claudina-2 de <i>Homo sapiens</i>	62
Figura 12. Gráfica de Ramachandran de los modelos 3D obtenidos con el servidor I-TASSER	64
Figura 13. Orientación en la membrana de los modelos 3D	67
Figura 14. Estructura 3D de las proteínas después de la trayectoria de DM	70
Figura 15. Estructura secundaria durante 500 ns de DM de la proteína pEhCP112	72
Figura 16. Gráfica de Ramachandran de los modelos 3D obtenidos después de la trayectoria de DM	73
Figura 17. Estructura secundaria durante 500 ns de DM de la proteína mEhCP112	75
Figura 18. Estructura secundaria durante 500 ns de DM de la proteína EhADH	77
Figura 19. Análisis estructural de la proteína EhCP112	82
Figura 20. Análisis estructural de la proteína EhADH	84
Figura 21. Análisis estructural de la proteína claudina-2	86
Figura 22. Distancia entre los residuos catalíticos de la proteína EhCP112	88
Figura 23. Distancia entre los residuos catalíticos de la proteína pEhCP112 y mEhCP112	89
Figura 24. Acoplamiento entre las proteínas pEhCP112 y EhADH	91
Figura 25. Acoplamiento entre las proteínas mEhCP112 y EhADH	95
Figura 26. Modelos de superficie de los complejos pEhCPADH y mEhCPADH	99
Figura 27. Representación esquemática de las regiones de interacción en los complejos pEhCPADH y mEhCPADH	101
Figura 28. Acoplamiento molecular de las proteínas mEhCP112 y claudina-2	104

Figura 29. Acoplamiento molecular entre las proteínas EhADH y claudina-2	106
Figura 30. Localización de EhADH y EhCP112 en trofozoítos de <i>E. histolytica</i> , mediante microscopía confocal	109
Figura 31. Localización de EhADH, EhCP112 y EhCPADH en trofozoítos de <i>E. histolytica</i> , mediante MET	111
Figura 32. Inmunoprecipitación de EhCP112, EhADH y EhCPADH, en trofozoítos de <i>E. histolytica</i>	113
Figura 33. Purificación y actividad enzimática de la proteína EhCP112	115
Figura 34. Generación de la construcción <i>pCOLD-1-Ehadh</i> y purificación de la proteína His-EhADH	117
Figura 35. Espectro de masas correspondiente al péptido SAVQSFQQAAGAFQK de la proteína EhADH.	118
Figura 36. Inmovilización de la proteína His-pEhCP112 al sensor CM5.	120
Figura 37. Cinética de unión entre His-EhCP112 y His-EhADH	122
Figura 38. Purificación de la proteína GST	124
Figura 39. Cinética de unión entre las proteínas His-pEhCP112 y GST	126

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Estructuras α y β del modelo 3D de la proteína pEhCP112 obtenido con el servidor I-TASSER	56
Tabla 2. Estructuras α y β del modelo 3D de la proteína mEhCP112 obtenido con el servidor I-TASSER	58
Tabla 3. Estructuras α y β del modelo de la proteína EhADH obtenido en el servidor I-TASSER	60
Tabla 4. Estructuras α y β del modelo 3D de la proteína pEhCP112 después de 500 ns de DM	71
Tabla 5. Estructuras α y β del modelo 3D de la proteína mEhCP112 después de 500 ns de DM	74
Tabla 6. Estructuras α del modelo 3D de la proteína EhADH después de 500 ns de DM	78
Tabla 7. Residuos de pEhCP112 y EhADH que participan en la formación del complejo pEhCPADH a 200 ns de DM	92
Tabla 8. Residuos de pEhCP112 y EhADH que participan en la formación del complejo pEhCPADH a 300 ns de DM	92
Tabla 9. Residuos de pEhCP112 y EhADH que participan en la formación del complejo pEhCPADH a 400 ns de DM	93
Tabla 10. Residuos de pEhCP112 y EhADH que participan en la formación del complejo pEhCPADH a 500 ns de DM	93
Tabla 11. Residuos de mEhCP112 y EhADH que participan en la formación del complejo a 200 ns de DM	96
Tabla 12. Residuos de mEhCP112 y EhADH que participan en la formación del complejo a 300 ns de DM	96
Tabla 13. Residuos de mEhCP112 y EhADH que participan en la formación del	97

complejo a 400 ns de DM	
Tabla 14. Residuos de mEhCP112 y EhADH que participan en la formación del complejo a 500 ns de DM	97
Tabla 15. Residuos de la claudina-2 (Cl-2) que participan en la formación del homodímero a 100 ns de DM.	103
Tabla 16. Residuos de la claudina-2 (Cl-2) que participan en la asociación con mEhCP112	105
Tabla 17. Residuos de la claudina-2 (Cl-2) que interaccionan con la EhADH	107

LISTA DE ABREVIATURAS

E. histolytica = *Entamoeba histolytica*
EhCPADH= Complejo proteico de *Entamoeba histolytica* de 124 kDa
EhADH= Adhesina 112 de *Entamoeba histolytica*
EhCP112 = Cisteína proteasa 112 de *Entamoeba histolytica*
aa= Aminoácidos
CPs= Cisteínas proteasas
RGD= Arginina, Glicina, Asparagina
AHA= Absceso hepático amebiano
ESCRT= Endosomal sorting complex required for transport
UIC= Uniones intercelulares
UEs= Uniones estrechas
UA= Unión adherente
UC= Unión comunicante
TAMPs= *TJ-associated marvel proteins*
JAM= *Junctional Adhesion Molecules*
CAR= *Coxsackie virus and Adenovirus Receptor*
DM= Dinámica Molecular
kDa= Kilodaltons
Pb= pares de bases
3D= Tridimensional
ns= Nanosegundos
ALIX= *ALG-2 interacting protein X*
Fig = Figura
RPS= Resonancia de plasmón superficial
RMN= Resonancia magnética nuclear
I-TASSER= *Iterative Threading ASSEMBLY Refinement*
RMSD= *Root mean square deviation*
PDB = Protein Data Bank
OPM= *Orientation of protein in membranes*
RG= radio de giro
RMSF= por sus siglas en inglés *root mean square fluctuations*
C α = carbonos alfa
Caco-2= por sus siglas en inglés de *colorectal adenocarcinome cells*
ml= mililitro
 μ g= microgramo
mM= milimolar
cm²= centímetro cuadrado
°C= grados centígrados
nm= nanómetro

RESUMEN

EhCPADH es un complejo proteico de 124 kDa que participa en la virulencia de *Entamoeba histolytica*, el protozoario responsable de la amebiasis. Este complejo está formado por la cisteína proteasa EhCP112 y la adhesina EhADH. Con la finalidad de investigar las bases moleculares que forman el complejo EhCPADH, construimos los modelos teóricos de las posibles estructuras tridimensionales (3D) de ambas proteínas, además realizamos dinámica molecular durante 500 ns y ensayos de acoplamiento molecular *in silico*. Los resultados obtenidos predicen que los modelos 3D de la enzima precursora pEhCP112 y madura mEhCP112 presentan una forma globular y son proteínas periféricas de membrana. En la proteína pEhCP112, el propéptido estructuralmente esconde el sitio catalítico (C167, H329, N348); mientras que en mEhCP112, este sitio se encuentra expuesto. Además, los aminoácidos que componen el sitio catalítico se encuentran más cercanos, en comparación con los de pEhCP112. La EhADH presenta una estructura 3D extendida y también se predijo como una proteína periférica de membrana. Esta proteína presenta fluctuaciones importantes en el dominio Bro1 y en el dominio V. Los resultados del acoplamiento entre pEhCP112 o mEhCP112 y EhADH, predicen diferentes conformaciones del heterodímero estructuralmente estables. pEhCP112 interactúa con EhADH por la región del propéptido y el carboxilo terminal, mientras que mEhCP112 interactúa principalmente por la región carboxilo terminal; en ambos casos la formación del heterodímero está dada

por puentes de hidrógeno. EhADH se une a mEhCP112 por los residuos 442-479, una región adyacente al dominio de adherencia (480-600 aa) y por el dominio Bro1 (9-349 aa). La asociación entre EhADH y EhCP112 en los trofozoítos, se validó experimentalmente mediante experimentos de inmunoprecipitación y por resonancia de plasmones superficiales; y a través de ensayos de inmunofluorescencia y MET, ambas proteínas co-localizaron en la membrana plasmática, en la membrana de las vacuolas y dentro de ellas. Adicionalmente, se obtuvo el modelo teórico de un posible receptor epitelial para estas proteínas, la proteína de la unión estrecha claudina-2. Los resultados *in silico* indicaron que la claudina-2 se une por su primera asa extracelular con mEhCP112 y EhADH, a través de su extremo carboxilo terminal y del dominio Bro1, respectivamente. Esto sugiere que las proteínas EhCP112, EhADH y EhCPADH podrían usar a la claudina-2 como receptor para su entrada hacia el epitelio por la ruta paracelular. La relevancia de obtener los modelos teóricos de pEhCP112, mEhCP112 y EhADH y descifrar la formación del heterodímero y su asociación con los posibles receptores epiteliales, podría ser aplicada para el diseño de compuestos prometedores que representen una futura solución para combatir a la amibiasis.

ABSTRACT

EhCPADH is a protein complex involved in the virulence of *Entamoeba histolytica*, the protozoan responsible for human amoebiasis. It is formed by the EhCP112 cysteine protease and the EhADH adhesin. To explore the molecular basis of the complex formation, we built 3D theoretical models of both proteins and performed molecular dynamics simulation and docking. Results predicted that the pEhCP112 proenzyme and the mEhCP112 mature enzyme were globular and peripheral membrane proteins. Interestingly, in pEhCP112, the propeptide appeared hiding the catalytic site (C167, H329, N348); while in mEhCP112, this site was exposed and amino acids that compose it were found structurally closer than in pEhCP112. EhADH emerged as an extended peripheral membrane protein with high fluctuation in Bro1 and V shape domains. Dynamics simulations at 500 ns and protein-protein docking predictions evidenced different heterodimeric conformers with structural stability. pEhCP112 interacted with EhADH by the propeptide and carboxy regions and mEhCP112 by the carboxy terminus, through hydrogen bonds. In contrast, EhADH bound to mEhCP112 by amino acids 442 to 479, adjacent to the target cell-adherence region (480 to 600 residues) and by the Bro1 domain (9 to 349 residues). Co-localization and binding of EhCP112 and EhADH inside trophozoites were proved by immunofluorescence, TEM, immunoprecipitation and surface plasmon resonance assays. Additionally, the 3D theoretical model of claudin-2, a possible epithelial receptor for these proteins, was generated. *In silico* results showed that by the first extracellular loop, claudin-2 interacted with mEhCP112 and

EhADH, by their carboxy terminus and Bro1 domain, respectively. This suggests that EhCP112, EhADH and EhCPADH use the claudin-2 as receptor for epithelial invasion through paracellular pathway. The relevance of generate 3D theoretical models of pEhCP112, mEhCP112 and EhADH and decipher the formation of the heterodimeric complex and its binding with epithelial receptors might be applied in the design of promising pharmacological compounds to defeat amoebiasis.

INTRODUCCIÓN

1. Amebiasis

La amebiasis humana, causada por el protozoario *Entamoeba histolytica*, es una enfermedad que se manifiesta clínicamente como disentería intestinal y amibiasis extraintestinal. El periodo de incubación del parásito en su hospedero puede variar de días hasta años, aunque generalmente es de una a cuatro semanas (Marion & Guillén, 2006). Esta parasitosis se encuentra ampliamente distribuida en el mundo, siendo las áreas que presentan mayor incidencia la India, el sur y el oeste de África, el lejano oriente y el centro y sur de América (Ravdin, 1995). Esta enfermedad se relaciona con la pobreza, la ignorancia, las condiciones sanitarias inadecuadas, el hacinamiento y la desnutrición (Sepúlveda, 1982). *E. histolytica* pertenece a la familia *Entamoebidae*, orden *Amoebida*, subfilo *Sarcodina*, superclase *Rhizopoda* y a la clase Lobosea (Martínez-Palomo, 1987).

2. Ciclo de vida de *E. histolytica*

E. histolytica posee dos fases principales en su ciclo de vida (Fig. 1): el quiste, el cual se ingiere por vía oral a través de alimentos contaminados con el parásito y es la forma infectiva. Es una célula esférica de 10-15 μm de diámetro, posee cuatro núcleos. En el intestino delgado (íleon), los quistes eclosionan formando cuatro

células que se dividen, para producir ocho trofozoítos uninucleados, los cuales posteriormente se dividen por fisión binaria, se adhieren a la mucosa intestinal y pueden vivir como comensales. El trofozoíto es pleomórfico, mide de 10-40 μm y posee moléculas que participan directamente en la invasión y destrucción de la célula huésped. Después que el epitelio intestinal es invadido, los trofozoítos pueden diseminarse a través de la sangre causando lesiones en órganos, como el hígado, en donde provoca abscesos hepáticos y, con menos frecuencia en el pulmón, cerebro, piel, órganos genitales, bazo y riñón. En algunos casos los trofozoítos se quedan en el intestino, donde son enquistados nuevamente para ser eliminados por las heces. Los quistes son resistentes a las condiciones del medio, a los jugos gástricos del tubo digestivo del huésped y fuera de él pueden resistir por semanas o meses (Martínez-Palomo, 1987).

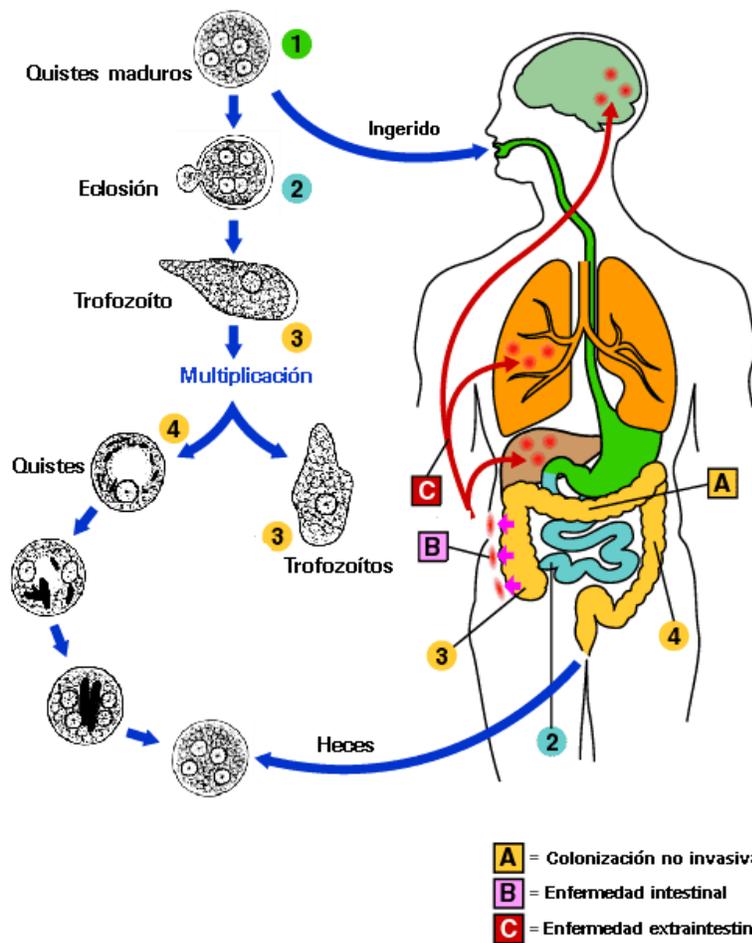


Figura 1. Ciclo de vida de *E. histolytica*. La infección por *E. histolytica* ocurre por ingestión de quistes maduros (1) en alimentos, agua o manos contaminados con heces. El desenquistamiento (2) ocurre en el intestino delgado y los trofozoítos (3) son liberados y migran al colon. Los trofozoítos se reproducen por fisión binaria y producen quistes (4) que se eliminan con las heces. Debido a la protección de la pared, los quistes pueden sobrevivir días o semanas en el medio externo y son los responsables de transmisión. Los trofozoítos en el medio externo mueren rápidamente. En muchos casos, los trofozoítos permanecen confinados en la luz intestinal (A, infección no invasiva) de los individuos infectados, quienes son entonces portadores asintomáticos o eliminadores de quistes. En algunos individuos los trofozoítos invaden la mucosa intestinal (B: enfermedad intestinal) y a través de la circulación invaden el hígado, pulmones, cerebro, etc (C: enfermedad extraintestinal) (<http://www.cdc.gov/dpdx/amebiasis/>).

3. Patogenicidad de *E. histolytica*

La virulencia de *E. histolytica* es un fenómeno multifactorial. Se sugiere que la microbiota bacteriana además de ser fuente de alimento provee las condiciones óxido-reductoras necesarias para el crecimiento y la multiplicación de los trofozoítos y para el inicio del enquistamiento (R, Y, & Mirelman, 2002). Entre los múltiples factores de virulencia responsables de la patogenicidad de *E. histolytica*, se encuentran moléculas que participan en la adhesión de la amiba a la célula blanco, factores activadores de membrana involucrados en la muerte rápida de las células hospederas, tales como el amebaporo y las proteasas, que degradan la matriz extracelular y median la desintegración de tejido (García-Rivera et al., 1999; Ocadiz et al., 2005; Ocadiz-Ruiz et al., 2013).

3.1 Adhesión

La adhesión es el primer paso en el mecanismo de patogenicidad de la amiba y regula la lisis de las células del hospedero de manera dependiente de contacto. Algunas moléculas de adhesión reportadas para este parásito son: dos lectinas una lectina inhibible por galactosa y otra por N-acetil-galactosamina (Gal/GalNAc) (Kobiler y Mirelman, 1980; Rosales-Encinas et al., 1987), una proteína rica en serinas (SREHP) y el complejo EhCPADH, formado por una adhesina (EhADH) y una cisteína proteasa (EhCP112) (Arroyo & Orozco, 1987; Meza *et al.*, 1987; Petri

et al., 2002; Stanley *et al.*, 1990). Este complejo se localiza en la membrana plasmática y se ha demostrado que se une a las células del hospedero. Aunque su ligando no se ha identificado, tiene afinidad por la superficie de eritrocitos y células epiteliales, ya que posee en su extremo carboxilo terminal un dominio involucrado en la adhesión a la célula hospedera (García-Rivera *et al.*, 1999; Rodríguez *et al.*, 1989).

3.2 Citólisis

El efecto citopático de *E. histolytica* presenta dos mecanismos diferentes: uno es la citólisis dependiente de contacto, en este mecanismo participan fosfolipasas, la lectina Gal-Gal/Nac de 170 kDa y el complejo EhCPADH, formado por una cisteína proteasa (EhCP112) y una proteína de la familia de las proteínas ALIX (EhADH) (Cecilia Bañuelos *et al.*, 2012). El segundo mecanismo de citotoxicidad independientes del contacto involucra la liberación de factores secretados con actividad citolítica. Se ha reportado un gran número de enzimas líticas, muchas de ellas localizadas principalmente en la membrana plasmática de la amiba. Entre estas enzimas se encuentra la neuraminidasa que libera ácido N-acetilneurámico a partir de compuestos como la mucina y que tiene un papel importante en la respuesta quimiotáctica del trofozoíto, ya que el ácido N-acetilneurámico estimula y dirige el movimiento de los trofozoítos (Udezulu, 1987). Otras enzimas líticas reportadas son las cisteínas proteasas (CPs), con pesos moleculares de 28, 36, 45, 70, 112, 124, 150, 175, 195 (Eva Avila, 1993; García-Rivera *et al.*, 1999). Otros

factores involucrados son los lisosomas de superficie (Eaton et al., 1969 y 1979); la colagenasa (Muñoz et al., 1982); los amebaporos, los cuales son péptidos que forman poros en la membrana de la célula blanco (Lynch, Rosenberg, & Gitler, 1982); y la prostaglandina E2, que a través de su receptor EP4 presente en las células epiteliales y de manera independiente de contacto, desencadena la diarrea amebiana (Lejeune, Moreau, & Chadee, 2011).

3.3 Fagocitosis

La fagocitosis de *E. histolytica* es un evento multifactorial en el que intervienen diversos componentes celulares de señalización, entre los que participan enzimas digestivas, adhesinas y el citoesqueleto de actina, entre otros. La importancia de la fagocitosis se demostró desde 1983 generando trofozoítos mutantes, deficientes en fagocitosis, los cuales fueron deficientes en producir abscesos hepáticos en animales de experimentación (Orozco et al., 1983). El complejo EhCPADH también participa en la fagocitosis. Este complejo se une al eritrocito por medio de la adhesina, antes de ser ingerido a través del canal fagocítico. Posteriormente, este complejo se localiza en las vacuolas fagocíticas y al término de la ingestión del eritrocito, el complejo se relocaliza en la membrana plasmática (García-Rivera et al., 1999). Además, el tráfico vesicular es un proceso clave en la virulencia de este parásito, ya que controla la maduración del fagosoma (Okada et al., 2006).

4. Complejo EhCPADH

Como se mencionó anteriormente, el complejo heterodimérico EhCPADH se compone de dos proteínas: una adhesina (EhADH) y la cisteína proteasa 112 (EhCP112), que al parecer permanecen unidas durante los eventos de adhesión, fagocitosis y citopatogenicidad de los trofozoítos sobre las monocapas de células epiteliales en cultivo; Inclusive, se ha observado que el complejo EhCPADH permanece unido bajo condiciones desnaturalizantes, lo que sugiere que ambas proteínas pudieran estar unidas por enlaces covalentes o fuerzas electrostáticas (García-Rivera et al., 1999). Sin embargo, tanto la EhCP112 como la EhADH se han encontrado en forma separada en el citoplasma y en la membrana plasmática del trofozoíto (García-Rivera et al., 1999; Ocádiz et al., 2005). Por medio de técnicas de microscopía electrónica e inmunofluorescencia se localizó al complejo amibiano cerca de la membrana plasmática y en fagosomas de los trofozoítos amebianos (García-Rivera et al., 1999; Martínez-López et al., 2004; Rodríguez et al., 1989).

En el genoma de la amiba, los genes que codifican para estas proteínas se encuentran adyacentes, separados por 188 pares de bases no codificantes y son transcritos de manera independiente; sin embargo, es posible que la expresión de estos genes se encuentre co-regulada. Además, en la cadena complementaria adyacente al gen *ehcp112*, se encuentra el gen *ehrabb*, por lo que el locus donde se encuentran estos tres genes podría considerarse como un "clúster" de virulencia (Azuara-Liceaga et al., 2005; Rodríguez et al., 2000).

Por otro lado, diferentes estudios han demostrado que al inocular hámsteres con péptidos recombinantes ó el cDNA de la EhADH y EhCP112, los animales presentaron protección parcial contra la amibiasis hepática (Madriz, 2004; Martínez-López et al., 2004).

4.1. Cisteínas proteasas (CPs) de *E. histolytica*

Las proteasas se clasifican de acuerdo a su especificidad por el sustrato ó por el mecanismo de catálisis. Con base en el mecanismo de hidrólisis de su sustrato conocemos cinco principales tipos de proteasas: serina, cisteína, aspártico, treonina y metalo-proteasas. Las cisteína proteasas (CPs) son sintetizadas como un polipéptido que contiene una pre-secuencia, la cual generalmente es una región hidrofóbica de 12-20 aa, un pro-dominio de 55-148 aa y un dominio catalítico ó enzima madura de 109-488 aa (Fig. 2). El pro-dominio mantiene a la proteasa inactiva y participa como molde durante la translocación (Que et al., 2002). El propéptido presenta tres funciones principalmente: i) participa como chaperona para el transporte de la pro-enzima al compartimento endosomal-lisosomal, ii) se comporta como andamio en el plegamiento del dominio catalítico y iii) previene la activación prematura de la enzima (Lecaille, Kaleta, & Brömme, 2002).

Estructura de cisteínas proteasas de *E. histolytica*

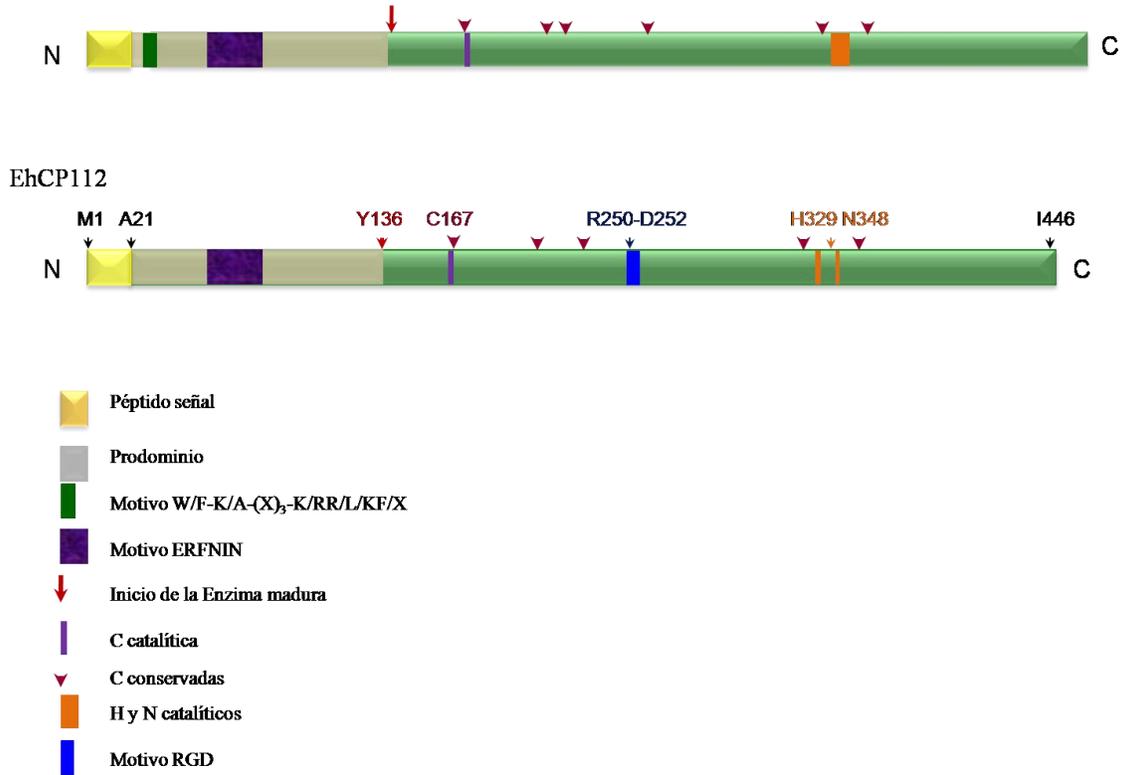


Figura 2. Estructura lineal de las CPs de *E. histolytica*. Las CPs de amiba son sintetizadas con un péptido señal y un pro-dominio que son removidos para activar a la enzima madura. El péptido señal participa en la translocación y tráfico de la proteína, mientras el pro-dominio mantiene a la proteína en un estado inactivo. El dominio RGD se presenta en la región del pro-dominio de algunas proteasas. En el caso de la EhCP112 y EhCP5, el dominio RGD se encuentra en la enzima madura (Modificado de Kissoon-Singh et al., 2011).

El genoma de *E. histolytica* contiene 50 genes que codifican para CPs y la mayoría de éstas se relaciona estructuralmente con la familia C1 de las calpaínas. Por análisis filogenético se encontró que 37 de estas enzimas se pueden clasificar en tres clados distintos A, B y C, cada uno con 13, 11 y 13 miembros, respectivamente (Tillack et al., 2007). Las proteasas ubicadas en el clado A poseen pro-dominios cortos (72-90 aa) y las proteínas maduras se componen de 190 a 254 residuos, comparadas con las del clado B que presentan 105-144 y 230-353 aminoácidos, respectivamente. A la fecha, no existe evidencia estructural del clado C, ya que no se han descrito proteínas recombinantes purificadas (Tillack et al., 2007). En general las CPs presentan un tamaño de 16-66 kDa. EhCP1 y EhCP2 son proteínas unidas a la membrana, mientras EhCP3 se localiza en el citoplasma. EhCP5 y EhCP112 poseen un dominio RGD (Arg, Gly y Asp) que le facilita el anclaje a la membrana, sin necesidad de un dominio transmembranal o un ancla de tipo glicosilfosfatidil-inositol (Kissoon-Singh et al., 2011).

Las CPs de *E. histolytica* hidrolizan enlaces peptídicos internos a través de un intermediario que se forma cuando la cisteína catalítica adquiere carga negativa formando un ión tiolato. Este nucleófilo ataca el grupo carbonilo del péptido sustrato y forma un intermediario tetraédrico que es estabilizado por el par oxianión, conformado por la histidina y la asparagina catalíticas. Posteriormente, se libera la porción amino terminal y al mismo tiempo se produce la acilación de la enzima. Para la deacilación es necesaria una molécula de agua, de tal forma que se libera la porción carboxilo terminal del sustrato y la regeneración de la enzima se produce

de manera alterna. La actividad catalítica es inhibida por grupos electrofílicos o con afinidad por iones sulfuro de la cisteína catalítica (Fig. 3).

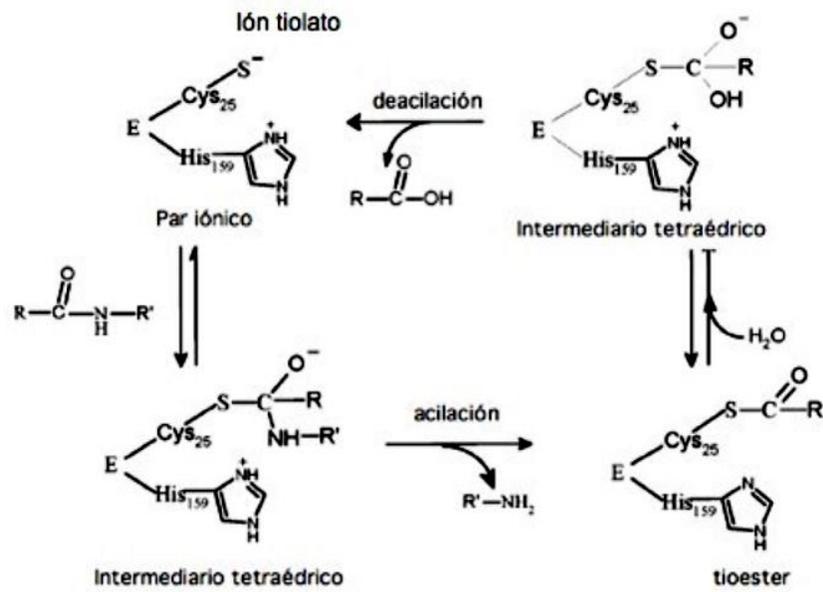


Figura 3. Mecanismo de hidrólisis del sustrato de las proteasas de la familia de las papaínas (Modificado de Kissoon-Singh et al., 2011).

4.1.1. EhCP112

La proteína EhCP112 de 446 aa es una proteína del tipo de la catepsina L y pertenece al clado B. Al igual que todos los miembros de esta familia, EhCP112 posee un péptido señal ubicado en los primeros 19 aa de la proteína, un propéptido ubicado del amino ácido 20 al 136 y un dominio catalítico característico formado por los residuos: C167, H329 y N348. También posee un dominio ERFNIN (70 a 90 aminoácidos) que es un elemento estabilizador de las interacciones intramoleculares (Bleischwitz, Albert, Fuchsbauer, & Kaldenhoff, 2010) y un motivo RGD (250 al 252 aminoácidos), el cual es un dominio de interacción con integrinas celulares (García-Rivera et al., 1999) (Fig. 4). Además, se ha demostrado que esta proteasa es secretada por los trofozoítos (Ocádiz et al., 2005). La proteína recombinante EhCP112 digiere gelatina, colagenasa tipo I, fibronectina, hemoglobina y es capaz de unirse a los glóbulos rojos y destruir monocapas de células epiteliales MDCK (Ocádiz et al., 2005). También, se ha demostrado que la expresión de las proteínas EhCP112 y EhADH se encuentra co-regulada (Ocádiz-Ruiz et al., 2013, 2015), ya que al silenciar el gen *Ehcp112*, se regula simultáneamente la expresión del gen *Ehadh* y viceversa. Además, el silenciamiento de cada uno de estos genes produce una reducción significativa en la virulencia de los trofozoítos, tanto en ensayos *in vivo* como *in vitro*.

4.2. EhADH

Los miembros de la familia ALIX (por sus siglas en inglés de *ALG-2 interacting protein X*) de mamíferos se localizan en el citosol, se caracterizan por presentar un dominio Bro1 en el extremo amino, una región rica en prolinas en el extremo carboxilo y poseen regiones susceptibles de fosforilación. Debido a estos dominios, las proteínas ALIX son consideradas adaptadores multifuncionales (Ichioka et al., 2007) que participan en endocitosis (Kim et al., 2005), autofagia (Petiot et al., 2008), apoptosis (Strappazzon et al., 2010), vacuolización de los endosomas, gemación viral (Lee, Joshi, Nagashima, Freed, & Hurley, 2007) y división celular (Eikenes et al., 2015), entre otros. En células de mamíferos, la proteína ALIX interacciona con la calpaína-7, una CP miembro de la familia de las catepsinas (Kato et al., 2003; Maemoto, Kiso, Shibata, & Maki, 2013). La proteína de hongos PalB es un ortólogo de la calpaína-7 y es reclutada a la membrana endosomal por el ESCRT-III y por proteínas de la familia ALIX (Maemoto et al., 2013). En *E. histolytica*, la proteína ALIX llamada EhADH interacciona con la proteasa EhCP112 (García-Rivera et al., 1999).

EhADH es una proteína de 687 aa, con un peso de ~70 kDa y se organiza principalmente en dos regiones: (i) el extremo amino terminal contiene al dominio Bro1 (F9-L349 aminoácidos), característico de la familia ALIX y responsable del reclutamiento de la proteína EhVps32 en la fagocitosis (Bañuelos et al., 2005); tres segmentos hidrofóbicos localizados en los residuos 114-130, 176-195 y 224-247; y

cuatro posibles sitios de N-glicosilación en las posiciones 352, 369, 562 y 600 (García-Rivera et al., 1999). (ii) La región V (P350-L687 aminoácidos) contiene el dominio involucrado en la adhesión a la célula hospedera (447-601 aminoácidos) (García-Rivera et al., 1999) y es el sitio de reconocimiento del anticuerpo que reconoce a la proteína EhADH en complejo con la EhCP112. Este anticuerpo inhibe la adherencia a la célula blanco y la fagocitosis (García-Rivera et al., 1999). En otros eucariontes la región V se conforma por 11 α -hélices (Fisher et al., 2007). Martínez-López et al., (2004) caracterizaron una región que comprende los residuos 444-687, ubicados en la región carboxilo terminal de la proteína EhADH y observaron que este polipéptido es capaz de adherirse a eritrocitos humanos. Además, esta secuencia inhibe la eritrofagocitosis y la destrucción de células epiteliales. Cuando este fragmento se administró por distintas vías a hámsteres, se redujo la formación de abscesos hepáticos amebianos (AHA). Por su parte, Madriz et al., (2004) administró plásmidos con la secuencia que codifica para la región carboxilo terminal de la EhADH (*pcDNA-Ehadh112*) o con el gen completo de la *ehcp112* (*pcDNA-Ehcp112*), a hámsteres, de manera independiente o ambas construcciones. Los resultados demostraron que la administración simultánea de ambos plásmidos reduce la formación del AHA.

EhADH también es una proteína accesoria de la maquinaria ESCRT (por sus siglas en inglés de *endosomal-sorting complex required for transport*) y es el núcleo de la endocitosis, como su homólogo en mamíferos (Avalos-Padilla et al., 2015; Kim et al., 2005).

5. Invasión de *E. histolytica* al epitelio

Diversos estudios han demostrado que al poner en contacto trofozoítos, así como lisados de *E. histolytica*, con células epiteliales, se genera un daño a la monocapa epitelial. Uno de los primeros estudios en evaluar el daño que genera la amiba en el epitelio fue el desarrollado por (Martinez-Palomo et al, 1985), donde se observó que a tiempos tempranos de interacción entre trofozoítos de *E. histolytica* y la monocapa confluyente de células MDCK, los trofozoítos inducían cambios morfológicos que consistían en ampliar el espacio intercelular, debido a la separación gradual de las células epiteliales adyacentes. También observó que se abrían las uniones intercelulares, la formación de burbujas en la membrana plasmática de células y la distorsión de las microvellosidades. Además, se observó que los trofozoítos se adhirieron a la monocapa, en el sitio donde se unen dos células. En este espacio intercelular epitelial se ubican las uniones intercelulares (UIC).

6. Uniones intercelulares (UIC)

El transporte a través de un epitelio se realiza a través de las rutas transcelular y paracelular. La primera requiere del tránsito de sustancias a través de la membrana apical, el citoplasma y la membrana basal, lo que requiere que la sustancia a

transportar se endocite, sea de naturaleza lipofílica, o que utilice transportadores de membrana, canales o bombas. La ruta paracelular se da en el espacio entre las dos células adyacentes, a través de las UIC que se comportan como una compuerta transportadora de iones y moléculas.

La integridad de los epitelios se mantiene por una serie de complejos intercelulares y de unión a la matriz extracelular (Fig. 4). Entre estos complejos se encuentran: la unión estrecha (UE), la unión adherente (UA), la unión comunicante (UC), los desmosomas (Des) y los hemidesmosomas, estos últimos son un complejo de unión a la matriz extracelular.

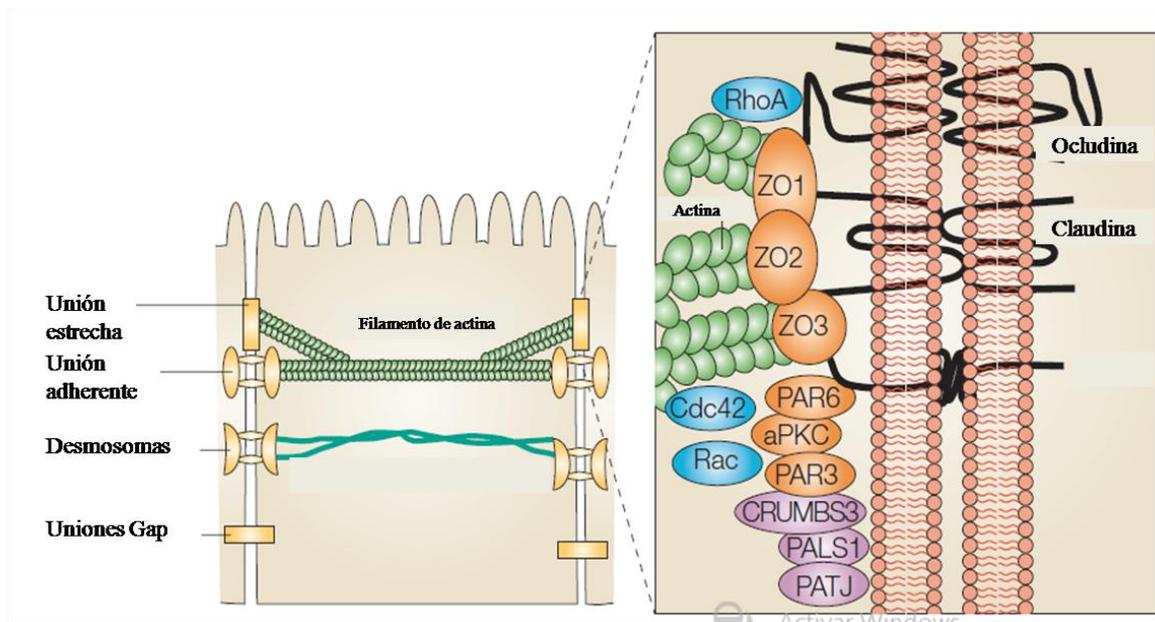


Figura 4. Modelo simplificado de las UIC. Se muestra una ampliación de la zona correspondiente a la UE, donde se observan algunos componentes de estas estructuras (Modificado de *Nature Reviews Microbiology*, Aktories & Barbieri, 2005)].

6.1 Uniones estrechas (UEs)

Las UEs están presentes en las células epiteliales, mesoteliales y endoteliales, así como en las células de Schwann y los oligodendrocitos; se localizan en la parte más apical de la membrana lateral de dos células adyacentes. La UE está formada por un conjunto de proteínas, que por microscopía electrónica, usando la técnica de criofractura, se asemeja un cinturón de filamentos intramembranosos interconectados que rodean a la célula en el sitio basolateral más exterior del espacio intercelular (A. Martínez Palomo and D. Erij, 1973; Staehelin L.A., 1973). Cada filamento se asocia lateralmente con otro filamento de la membrana opuesta de la célula adyacente, formando un par de cadenas, donde el espacio intercelular juega el papel de una barrera. El patrón de los filamentos de la UE varía de acuerdo al epitelio y existe una relación directa entre el grado de sellado y el número de filamentos que la conforman (Claude & Goodenough, 1973). El tamaño del poro de la UE es de aproximadamente 8 Å, por lo tanto moléculas de menor tamaño podrían atravesarla; sin embargo, la UE selecciona las moléculas que se van a transportar con base en su carga eléctrica y su tamaño (Van Itallie & Anderson, 2004). La UE se compone principalmente por dos tipos de proteínas, proteínas integrales de membrana que se unen homotípicamente o heterotípicamente con las de la célula vecina, formando una compuerta selectiva; y por proteínas submembranales ó adaptadoras que sirven como puente entre las proteínas transmembranales y el citoesqueleto de actina.

Estructuralmente las UE son complejos multiproteicos formados por diferentes proteínas integrales de membrana vinculadas con proteínas adaptadoras citoplásmicas que forman una placa cuya principal función es unir componentes de membrana de la UE al citoesqueleto de actina y también permitir el reclutamiento de proteínas de señalización. Las proteínas integrales de membrana que forman la UE pertenecen a tres diferentes familias (Fig. 5). 1) La familia de las claudinas cuya principal función es regular el paso de iones del espacio paracelular, serán descritas con detalle más adelante. 2) Las proteínas TAMPs (por sus siglas en inglés de *TJ-associated marvel proteins*) son los últimos componentes transmembranales de la UE. Esta familia se conforma de tres miembros: ocludina, tricelulina y marvel D3. La ocludina como otras proteínas TAMPs presenta un dominio MARVEL, que se ha visto asociado con dominios de membranas ricos en colesterol y se cree que están envueltos en la biogénesis de las vesículas endocíticas (Sanchez-Pulido et al., 2002). 3) Las proteínas JAM (por sus siglas en inglés de *Junctional Adhesion Molecules*), que son tres: JAM-A, JAM-B y JAM-C; y las proteínas receptoras de CAR (por sus siglas en inglés de *Coxsackie virus and Adenovirus Receptor*), que pertenecen a la superfamilia de las inmunoglobulinas. Ambas proteínas atraviesan la membrana una sola vez y tienen un dominio extracelular formado por dos asas tipo inmunoglobulinas o "*Ig-like*" (por sus siglas en inglés). La región carboxilo terminal se localiza en el citoplasma e interacciona con otras proteínas de la UE a través del dominio PDZ (Garrido-Urbani et al. 2014). Tanto los miembros de la familia JAM como CAR funcionan como receptores para muchos virus.

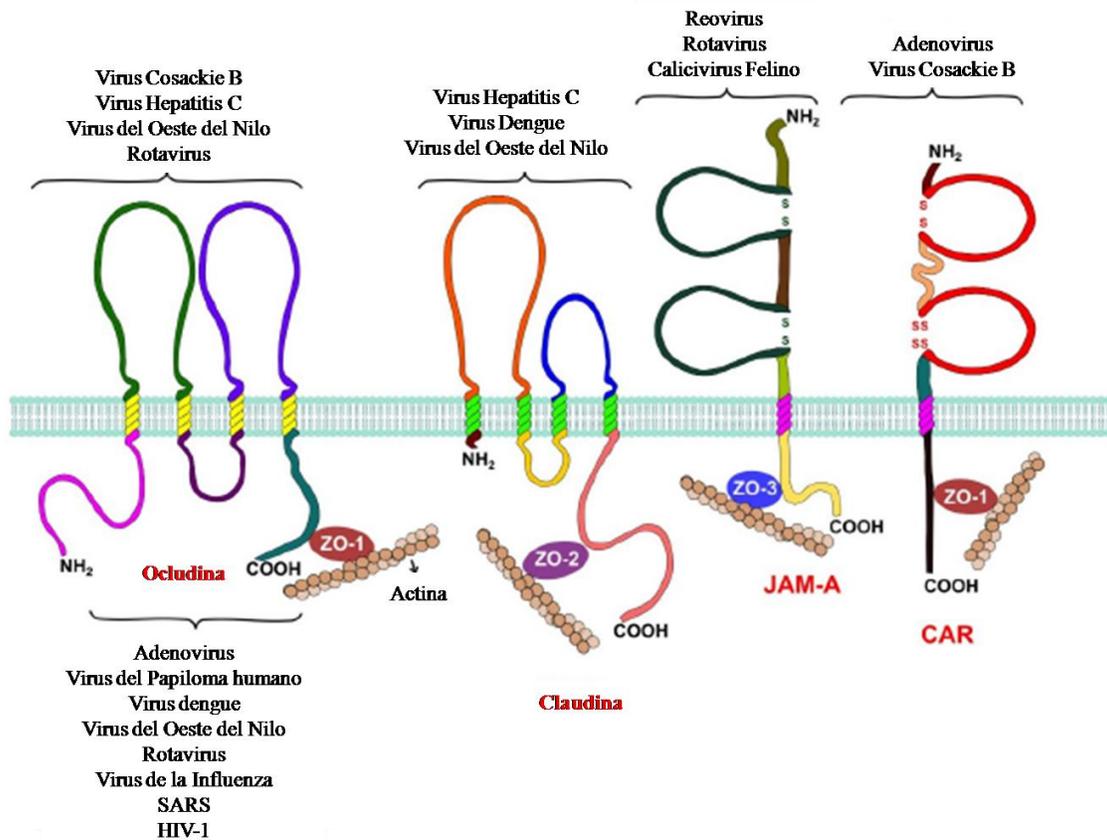


Figura 5. Proteínas de la UE y la replicación de virus. La ocludina es requerida por el virus de la hepatitis C, coxsackie B y rotavirus durante la entrada al hospedero. El virus del Oeste del Nilo tiene la habilidad de abrir la UE deteriorando a la ocludina para lograr su diseminación. Tanto los reovirus como los calicivirus usan a la proteína JAM-A como receptor durante su proceso de entrada. Por su parte, los rotavirus utilizan a JAM-A como co-receptor y los adenovirus y el virus coxsackie B, utilizan a la proteína CAR durante su proceso de entrada.

Estas proteínas integrales de la UE, interaccionan con el dominio PDZ de algunas proteínas citoplasmáticas como: ZO-1, ZO-2 y ZO-3, Par-3 y Par-6 y proteínas MAGI (Rodgers et al., 2013).

6.1.1. Claudinas

El nombre claudina proviene del latín “*Claudere*” que significa cerrar (Furuse *et al.*, 1998). La familia de las claudinas (aproximadamente 24 miembros) son proteínas integrales de membrana de la UE que atraviesan cuatro veces la membrana (Furuse *et al.*, 1998). Poseen cuatro hélices transmembranales, dos asas extracelulares y dos regiones citoplasmáticas, el extremo amino (~7 aminoácidos), y el extremo carboxilo (residuos 21-44). La primera asa extracelular contiene aproximadamente 50 aminoácidos y un motivo común GLW-(2 aa)-C-(8-10 aa)-C. Este dominio también contiene aminoácidos cargados, donde el número y la distribución de éstos dependen del tipo de claudina y determinan la selectividad de carga y conductancia a través de la ruta paracelular. La segunda asa extracelular contiene aproximadamente 20 residuos, se cree que se pliega como una hélice-vuelta hélice y forma dímeros (Piontek et al., 2008). Estas proteínas tienen una masa molecular que va de 22-27 kDa. En la mayoría de los epitelios se co-expresan diferentes subtipos de claudinas, la proporción y combinación de éstos depende del tipo celular, proporcionando así la diversidad bioquímica de las UEs.

7. Patógenos que afectan la UE

La UE constituye después de la mucosa intestinal, la primer barrera de penetración paracelular de microorganismos intestinales (Leroy et al., 2000). Los agentes patógenos que alteran la UE utilizan diferentes mecanismos de entrada: por ejemplo, *Helicobacter pylori*, *Shigella flexneri* y *Escherichia coli* enterohemorrágica poseen un sistema de secreción semejante a una jeringa, a través del cual inyectan proteínas efectoras directamente desde el citosol del patógeno, hacia el citoplasma de las células del hospedero. Esto origina rearrreglos en el citoesqueleto de las células epiteliales, acortamiento de las microvellosidades y culmina en la desorganización de la UE (Goldberg & Sansonetti, 1993). Otro mecanismo para alterar la barrera epitelial es el que utiliza *Clostridium perfringens*, *Vibrio cholera*, el virus del hepatitis C y los reovirus. Protozoarios flagelados como *Trichomonas vaginalis* y *Giardia lamblia*, son capaces de alterar la UE. *Giardia lamblia*, utiliza como receptor epitelial una proteína de la UE, alterando la estabilidad molecular de la UE y permitiendo así la penetración paracelular de este patógeno hacia el epitelio (Guttman & Finlay, 2009) (Fig. 6). Estudios experimentales en monocapas del epitelio urogenital han demostrado que *T. vaginalis* altera la integridad celular afectando proteínas de la UE y UA como ocludina, ZO-1 y E-caderina. Además, estas alteraciones en la UE pueden facilitar la entrada del virus de inmunodeficiencia humana (VIH-1) (da Costa, de Souza, Benchimol, Alderete, & Morgado-Diaz, 2005).

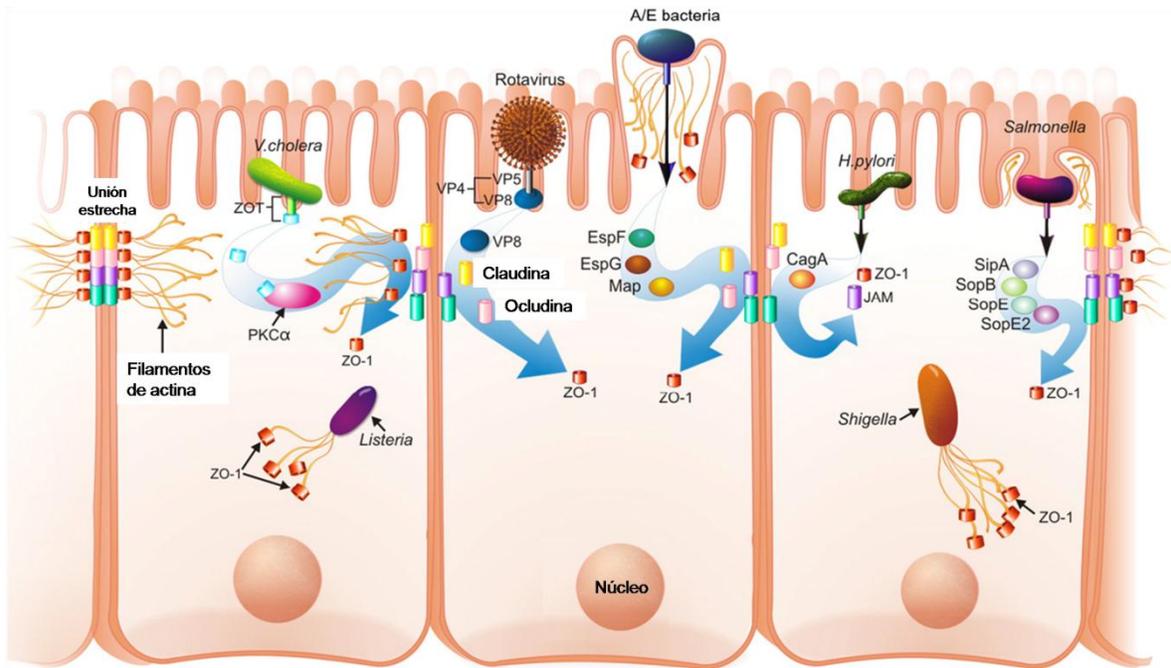


Figura 6. Estrategias que utilizan algunos patógenos para alterar la UE. *Vibrio cholera* utiliza a la proteína ZOT para alterar la UE. Esta proteína activa a la PKC α , la cual afecta a los filamentos de actina del citoesqueleto y disocia a la proteína ZO-1 de la periferia celular. El *rotavirus* usa el fragmento VP4 para alterar componentes de la UE. Las bacterias A/E usan a las proteínas EspF, EspG y Map para alterar la integridad de la UE. *Salmonella* modifica la UE mediante cuatro proteínas efectoras (SipA, SopB, SopE y SopE2). *H. pylori* mediante el efector CagA altera la localización de ZO-1 (Modificado de Guttman et al., 2009).

7.1 Efecto de *E. histolytica* sobre la UE

Martínez-Palomo et al, en 1985 observó que a tiempos tempranos de interacción entre trofozoítos y la monocapa de células MDCK, se producía una caída drástica de la resistencia eléctrica transepitelial (RET), lo que indicó daño a la UE dependiente del tiempo de interacción. Dicha medición es inversamente proporcional al daño que genera la amiba en la UE, por lo tanto mediciones bajas de la RET indican un daño en la UE. De igual manera, cuando se incubaron células epiteliales T84 (de colon humano) con trofozoítos, se observó una pérdida progresiva de la RET (Leroy et al., 2000). Estos resultados sugirieron que *E. histolytica* induce un incremento en la permeabilidad paracelular.

Betanzos y colaboradores (2013) demostraron mediante ensayos de inmunofluorescencia que en células epiteliales MDCK incubadas con extractos de proteínas totales de amiba, el complejo EhCPADH se localizaba en las UICs. Posteriormente, co-localizaron a la EhCP112 y EhADH, con el marcador de la UE, ocludina, desde tiempos tempranos de incubación. Además demostraron que EhCPADH se asocia con las proteínas de la UE, ocludina, claudina-1, ZO-1 y ZO-2. Sin embargo, dada la complejidad de las proteínas que componen la UE, no se sabe con qué proteínas de la UE interaccionan directamente las proteínas EhCP112 y EhADH, si lo hacen en forma separada o es el complejo EhCPADH el

que se une a las UIC para modificarlas, degradando o deslocalizando a las proteínas que la forman y permitiendo así la disgregación del tejido epitelial.

8. Análisis *in silico*

El reconocimiento molecular por computadora o llamado en inglés "*docking*" es un método de simulación teórico que permite el estudio de la interacción entre una proteína y su ligando o de las interacciones proteína-proteína. Esta metodología es muy útil para identificar los sitios de unión y la estereoquímica de las proteínas involucradas, de manera que la información generada se puede aplicar en el diseño de nuevos blancos terapéuticos (Moitessier et al., 2008). Actualmente el diseño y modelaje de proteínas y sus ligandos se basa en métodos computacionales. Gracias a las técnicas de modelado molecular y a su gran valor predictivo, se han generado avances importantes en el conocimiento de la estructura de las proteínas y su interacción con otras moléculas. Los avances se dieron de manera secuencial y se pueden dividir en tres etapas: en la primera, los cálculos se limitaban a determinar estructuras químicas rígidas, con la finalidad de establecer una posible interacción entre moléculas. La segunda etapa se presentó a finales de los años setenta, cuando la disponibilidad de herramientas computacionales había crecido de tal forma que era posible realizar cálculos más avanzados por medio de dinámica molecular. En la búsqueda por obtener cada vez mejores resultados, a mediados de los ochenta se inició la tercera etapa del modelado molecular,

caracterizada por la aplicación detallada de los cálculos de energías libres para cuantificar la fuerza y la calidad de las uniones que se dan entre las moléculas.

8.1. Dinámica Molecular (DM)

La DM se usa para estimar el equilibrio y las propiedades dinámicas de sistemas complejos que no pueden ser calculados analíticamente, por tanto, se considera que la DM representa la interface entre la teoría y la parte experimental. En otras palabras, la DM permite el estudio de procesos dinámicos complejos de los sistemas biológicos, por lo cual es una de las principales herramientas para el estudio de biomoléculas. Además, es una herramienta teórica de suma importancia en las predicciones necesarias para llevar a cabo el desarrollo de nuevos fármacos, así como de ayuda en la determinación estructural por rayos X y resonancia magnética nuclear (RMN). Por ejemplo, la estructura tridimensional de una proteína obtenida mediante cristalografía de rayos X es insuficiente para comprender ampliamente la actividad biológica de la molécula, ya que sólo provee una medida de la estructura del cristal de un sistema complejo. Como sabemos las moléculas son entidades dinámicas, con sus átomos interaccionando consigo mismos y con su entorno. Sin embargo, el movimiento dinámico de una molécula puede explicar ampliamente los grados de termoestabilidad y de este modo es posible conocer la relación entre la estructura y la función de la molécula. Por consiguiente, la DM de

un sistema en espacio y tiempo puede proporcionar una gran cantidad de información, concerniente a las propiedades estructurales y a la actividad biológica de la proteína. Esta información incluye geometría molecular y energías que significan interacciones atómicas, fluctuaciones locales (formación y rompimiento de puentes de hidrógeno, agua/soluto/iones, movimiento de los ángulos de torsión), cambios de configuración, unión de la enzima con su sustrato y energía libre, entre otras. La DM es un campo con gran crecimiento en sus avances tanto en los datos experimentales como en los teóricos (Arthur M Lesk, 2001).

La DM se basa en la segunda ley de Newton $\mathbf{F} = m\mathbf{a}$, donde \mathbf{F} es la fuerza ejercida sobre una partícula, m es su masa y \mathbf{a} su aceleración. Cuando se conoce la fuerza ejercida sobre cada átomo, es posible determinar la aceleración del sistema, por lo tanto la integración de las ecuaciones del movimiento producen una trayectoria que describe las posiciones, velocidades y aceleraciones de las partículas en función del tiempo. A partir de la trayectoria se pueden determinar los valores promedio de las propiedades del sistema. Una vez que se conocen las posiciones y velocidades de cada átomo, se puede predecir el estado del sistema para cualquier valor del tiempo.

8.1.1. Mecánica clásica

El método consiste en la integración de las ecuaciones diferenciales dada por la segunda ley de Newton:

$$m_i \frac{d^2 \vec{r}_i}{dt^2} = \vec{f}_i \quad \text{para} \quad i = 1, \dots, N \quad 28$$

donde m_i y r_i son la masa y las coordenadas de la partícula i y la fuerza está expresada en función del gradiente de la energía potencial $U(r^1, r^2, \dots, r^N)$:

$$\vec{f}_i = -\nabla_{r_i} \mathcal{V}$$

El resultado nos da información sobre la variación de las posiciones y velocidades de las partículas del sistema en función del tiempo, a lo cual se le denomina trayectoria (Jarosaw Meller 2001).

El esquema básico de funcionamiento de una simulación de DM consiste en:

- 1.- Establecer los parámetros de la simulación: temperatura inicial, paso del tiempo y tiempo total de la simulación.
- 2.- Ajustar el sistema, asignando las posiciones y velocidades iniciales: las posiciones iniciales de los átomos se pueden obtener a partir de estructuras experimentales determinadas por rayos X y por RMN ó bien, modeladas teóricamente.
- 3.- Calcular la fuerza de todas las partículas del sistema.
- 4.- Integrar las ecuaciones del movimiento, este paso y el anterior se van repitiendo durante el tiempo total de simulación para facilitar el cálculo de la evolución del

sistema. En cada paso se va guardando un archivo para los análisis posteriores. Este archivo contiene las posiciones, velocidades y la fuerza del tiempo total de la simulación (Jarosaw Meller 2001).

8.2. Acoplamiento molecular

El reconocimiento molecular juega un papel clave en los eventos biomoleculares, como interacciones enzima-sustrato, proteína-inhibidor, proteína-proteína y ácido nucleico-inhibidor (Bello et al., 2013). El acoplamiento molecular es un procedimiento de química *in silico* (Ekins, Mestres, & Testa, 2007), utilizado para predecir los posibles complejos ligando-receptor, siendo generalmente el receptor una proteína o un oligómero y el ligando una molécula de menor tamaño u otra proteína (Brooijmans & Kuntz, 2003). El proceso por el cual una proteína se une a su ligando está influenciado por diversos factores entrópicos y entálpicos. Además, tanto la movilidad del ligando como la del receptor, así como el efecto de la proteína sobre la distribución de cargas del ligando y sus interacciones con las moléculas de agua, complica la descripción cualitativa del proceso (Brooijmans & Kuntz, 2003).

Hay una gran variedad de métodos de acoplamiento computacional, debido a que utilizan diferentes algoritmos. El procedimiento general iterativo es generar una postura, puntuarla y compararla con las demás posturas posibles, entonces la actual posición será evaluada de acuerdo a la puntuación que se obtenga. Los

protocolos de acoplamiento se pueden describir como una combinación de dos componentes, estrategia de búsqueda y función de puntuación o *scoring*. Un algoritmo de búsqueda riguroso debe elucidar exhaustivamente todos los modos posibles de unión entre el ligando y el receptor. Se deben explorar los seis grados de libertad traslaciones y rotacionales del ligando, junto con los grados de libertad de la conformación interna, tanto del ligando como del receptor. La solución ideal sería combinar los mejores algoritmos de búsqueda con las mejores funciones de puntuación, pero en la práctica es inviable debido al tamaño del espacio de la búsqueda (Taylor & Burnett, 2000).

9. Métodos de estudio de las interacciones entre proteínas

Existe un gran número de métodos experimentales para comprobar las interacciones entre moléculas predichas por los análisis de acoplamiento molecular. Entre éstos se encuentran los ensayos que implican el uso de algún tipo de marca o etiqueta, por ejemplo: *pull-down*, inmunoprecipitación e inmunofluorescencia. Además, existen otros ensayos que no emplean ningún tipo de marca y que están basados en principios físicos como: 1) la microbalanza de cuarzo e interferometría, que es un dispositivo altamente sensible a los cambios que experimenta la frecuencia de resonancia del cristal de cuarzo; 2) La resonancia de plasmón superficiales (RPS), que son biosensores diseñados para detectar

selectivamente interacciones biomoleculares de forma directa (Daghestani & Day 2010; Kooyman 2008).

9.1 Resonancia de plasmón superficiales (RPS)

La RPS ha sido ampliamente utilizada en biología molecular debido a las ventajas que presenta, entre las que se incluyen: 1) alta sensibilidad, 2) detección de las interacciones sin necesidad de una marca, 3) independencia de las propiedades espectroscópicas, 4) monitoreo de las interacciones en tiempo real, 5) evaluación cuantitativa, 6) determinación de las constantes de asociación y disociación 7) cantidades pequeñas de la muestra y 8) alto grado de automatización y rendimiento (Nguyen et al. 2015).

La RPS se describió por primera vez en 1968 (Otto 1968), sin embargo, este método se aplicó en biosensores hasta 1983 (Liedberg et al. 1983).

La RPS son oscilaciones colectivas de electrones de la banda de conducción de un metal que pueden excitarse cuando el metal se encuentra en contacto con el medio dieléctrico y un rayo de luz polarizada incide sobre la superficie del metal (Raether and Pockrand H, 1977). En mecánica cuántica, se define como plasmón al cuanto de energía asociado con ondas propagándose en la materia a través del movimiento colectivo de un número de electrones. En la RPS el nombre de plasmón refleja el concepto de un metal como plasma de alta densidad que contiene un enorme número de electrones móviles al que se le aplica un campo

eléctrico que actúa sobre una partícula o muestra, el campo polariza la muestra con una densidad de carga eléctrica y estas cargas inducidas actúan a su vez sobre la muestra de manera colectiva para regresar al equilibrio. Cuando el campo eléctrico es suspendido, se produce un equilibrio al estado neutral lo cual le confiere a las cargas más energía cinética, con lo que se produce un punto de equilibrio sobresaturado, este proceso es reversible y es cuando se establecen las oscilaciones colectivas de carga superficial a las que se les denomina plasmones superficiales (Raether and Pockrand H 1977).

La excitación óptica de los RPS se produce en un ángulo determinado de incidencia de luz conocido como ángulo de resonancia, donde la intensidad de la luz reflejada disminuye al mínimo y se representa con una curva de resonancia. Cuando se alcanza la condición de resonancia, esto indica el acoplamiento entre la luz incidente, el vector de onda (K_p) y el vector de onda del plasmón superficial (K_{sp}), En este punto la componente paralela a la superficie del vector de ondas de luz incidente (K_{px}) es igual al vector de onda de plasmón superficial, lo cual está dado por la siguiente fórmula:

$$k_p = \frac{\omega}{c} \sqrt{\epsilon_d} \cdot \sin\theta = \frac{2\pi}{\lambda} \sqrt{\frac{\epsilon_m \cdot \epsilon_d}{\epsilon_m + \epsilon_d}}$$

Donde ω es la frecuencia angular, c es la velocidad de la luz en el vacío, λ es la longitud de onda, θ es el ángulo de incidencia, ϵ_m es la permitividad del metal y ϵ_d

es la permitividad del dieléctrico. Por lo tanto para que se produzca la propagación de RPS, las permitividades ϵ_m y ϵ_d han de tener signos opuestos y $\epsilon_m < -\epsilon_d$. Esta condición sólo se cumple al utilizar metales como oro, plata y aluminio, con frecuencias de radiación incidente en la zona entre el rango visible y el infrarrojo. El grosor de la capa de metal es crítico para el valor del mínimo de reflectancia y depende de las constantes ópticas del medio y de la longitud de onda de la luz incidente (Raether and Pockrand H, 1977).

El método de Kretschmann es ampliamente utilizado en la excitación óptica, debido a su simplicidad. En este caso, la superficie traductora está formada por una fina capa de oro de aproximadamente 45 nm de espesor, depositada mediante evaporación del metal sobre un prisma de cristal, a través de un aceite con el mismo índice de refracción. Este aceite se utiliza para igualar el índice de refracción en la interface que se forma entre el prisma y la lámina de vidrio con el oro. Al incidir sobre la capa metálica a través del prisma un haz de luz de una longitud de onda apropiada, una parte de la luz se refleja y otra parte se propaga por el metal produciendo una onda que excita los plasmones de la superficie de oro (Fig. 7). El uso de RPS facilita la inmovilización de un elemento de reconocimiento sobre la superficie de oro, ya que la interacción del bio-receptor (inmovilizado) y un determinado analito da lugar a un cambio en el índice de refracción del medio que produce un desplazamiento de la posición angular donde tiene lugar el desplazamiento de la curva de resonancia (Daghestani & Day 2010).

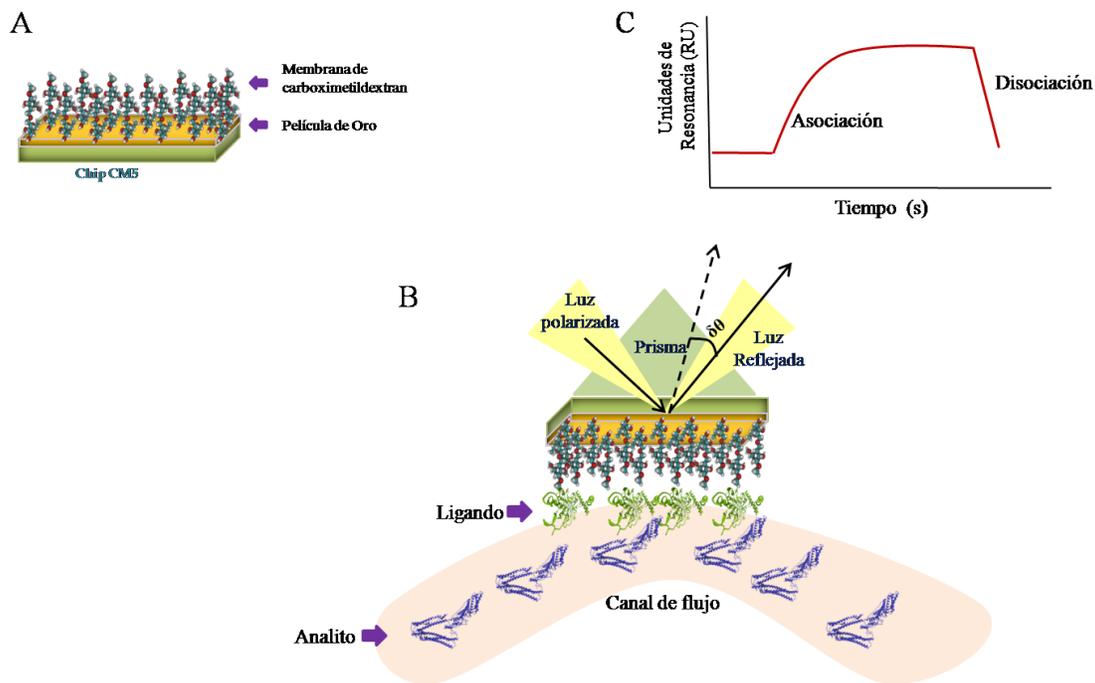


Figura 7. Inmunosensor de RPS, basado en el método de Kretschmann. A) Chip CM5 para estudios de RPS en el biosensorBiacore®. El chip tiene una superficie de oro sobre la cual se encuentra la membrana de carboxi-metil-dextran, que sirve como ancla de la proteína que se utiliza como ligando. B) La proteína "analito" se introduce al sistema con un flujo y presión constante, ésta pasa sobre la superficie del chip donde previamente es inmovilizado el ligando. C) Las interacciones proteína-proteína entre el "ligando" y el "analito" incrementan la densidad de la superficie del chip, con lo que cambia el ángulo de la luz reflejada ($\delta\theta$), generando una curva de unión en tiempo real. La fase de asociación ocurre cuando dos o más moléculas interaccionan, mientras que la fase de disociación ocurre cuando se rompe la asociación entre las moléculas que fueron previamente unidas.

10 JUSTIFICACIÓN

Se ha descrito que las proteínas EhCP112 y EhADH trabajan como un complejo proteico y participan en los principales mecanismos de patogenicidad de *E. histolytica*. Sin embargo, no se conocen las estructuras cristalizadas, la estructura 3D teórica, el tipo de interacción, ni los residuos que participan en la unión de estas proteínas. Conocer los aminoácidos involucrados en la asociación de este complejo, nos permitirá proponer nuevos blancos terapéuticos contra la amebiasis, ya que este complejo se ha propuesto como candidato para vacuna. Al respecto, se ha observado que al administrar plásmidos que contienen las secuencias que codifican para las proteínas que forman el complejo EhCPADH a hámsteres, éstos disminuyen la formación del absceso hepático amebiano. De hecho este estudio generó una patente (PCT/CU2004/000013). Por otro lado, al colocar extractos totales de trofozoítos o trofozoítos vivos a monocapas de células epiteliales, el complejo EhCPADH se localizó en la UE e interactuó con proteínas de esta estructura. Sin embargo, hasta el momento se desconocen cuáles son las proteínas de la UE que median la interacción directa con el complejo EhCPADH. Conocer las bases moleculares de la invasión inicial de la ameba, nos permitirá elucidar el mecanismo de ingreso de este parásito hacia la primera barrera del huésped (el epitelio) y proponer nuevos blancos terapéuticos contra la amebiasis.

11. HIPÓTESIS

Las proteínas EhCP112 y EhADH forman un heterodímero mediante uniones fuertes, tales como los puentes de hidrógeno. EhCP112, EhADH y el heterodímero EhCPADH utilizan a proteínas de la UE, como receptores en el epitelio del hospedero, para iniciar la invasión de *E. histolytica*.

12. OBJETIVOS

12. 1. Objetivo General

Analizar el tipo de uniones que forman al heterodímero EhCPADH, así como determinar las proteínas de la UE que interaccionan con EhCP112 y EhADH.

12.2. Objetivos específicos

1. Predecir la estructura tridimensional teórica de las proteínas pEhCP112, mEhCP112, EhADH y claudina-2.
2. Determinar *in silico* el tipo de interacción entre EhCP112 y EhADH, así como los aminoácidos involucrados y la distancia interatómica entre cada uno de ellos.
3. Determinar *in silico* la asociación de las proteínas mEhCP112 y EhADH con la proteína de la UE claudina-2.
4. Comprobar experimentalmente la asociación entre las proteínas EhCP112 y EhADH.

13. MATERIALES Y MÉTODOS

13.1. Análisis in silico

13.1.1. Modelaje tridimensional de las proteínas

La secuencia completa de las proteínas EhCP112 y EhADH de *E. histolytica* y la proteína claudina-2 de *Homo sapiens*, fueron obtenidas de la base de datos UniprotKB (<http://www.uniprot.org>) con los números de acceso: Q9U7F7, Q9U7F6, P57739, respectivamente. Debido a que no se conoce la estructura 3D de estas proteínas, se realizó su modelaje estructural teórico en el servidor I-TASSER (por sus siglas en inglés de *Iterative Threading ASSEMBly Refinement*), usando los métodos de plegado (*threading*) y “*ab-initio*” (Roy, Kucukural, & Zhang, 2010; Yang et al., 2014; Zhang, 2008). El primer método predice las estructuras de las proteínas mediante la comparación con estructuras de proteínas homólogas conocidas y anotadas en las bases de datos, por lo que también se llama modelo comparativo. En tanto que el método *ab-initio* utiliza la secuencia primaria de aminoácidos para realizar el modelado. I-TASSER es un servidor automatizado para la predicción lo más exacta posible de proteínas (<http://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER/>). Este servidor predice 5 modelos de la proteína de interés y el mejor modelo es seleccionado con base a su C-score. C-score es un valor de confiabilidad para estimar la calidad de los modelos predichos por I-TASSER. El mejor modelo suele validarse con los valores de TM y RMSD (por sus siglas en inglés *root mean square deviation*), los cuales son

estándares conocidos que miden la similitud entre dos estructuras (Roy et al., 2010).

13.1.2. Modelo teórico de la estructura 3D de EhCP112

La proteína nativa EhCP112 (446 aa) se procesa enzimáticamente, primero pierde el péptido señal (19 aa) y a esta forma inactiva se le conoce como pEhCP112; posteriormente se procesan los aminoácidos correspondientes al propéptido (116 aa) y ésta es la forma activa de la enzima o mEhCP112. Para obtener los diferentes modelos tridimensionales de ambas proteínas obtenidos del servidor I-TASSER (Roy et al., 2010), se utilizó la secuencia primaria de la proteína pEhCP112 (Q9U7F7) de la base de datos UniProtKB (Consortium, 2014). Para construir los modelos de las estructuras 3D se utilizaron los siguientes moldes de la base de datos “Protein Data Bank” (PDB): i) para pEhCP112: procatepsina K (7PCK), S (2C0Y), K (1BY8) and L (1CS8) de humano y procatepsina L2 de *Tenebrio molitor* (3QJ3);y ii) para mEhCP112: catepsina K (1AYW), fosfodiesterasa-9 (3QI3), annexina V (1SAV) y procatepsina K (1BY8) de humano, procatepsina L2 de *Tenebrio molitor* (3QJ3) y una cisteína proteasa de *Zingiber officinale*(1CQD).

13.1.3. Modelo teórico de la estructura 3D de EhADH

El modelo teórico 3D de la proteína EhADH fue construido usando el servidor I-TASSER, a partir de la secuencia de aminoácidos Q9U7F6, obtenida de la base de

datos UniProtKB. Los moldes que se utilizaron para realizar el modelo tridimensional fueron los siguientes: Alix Bro1-V (2RO2), dominio Bro-V (2XS1) y Bro1 de *Saccharomyces cerevisiae* (1ZB1).

13.1.4. Modelo teórico de la estructura 3D de claudina-2

El modelo teórico 3D de la proteína claudina-2 se generó a partir de la secuencia de aminoácidos Q95KM6, obtenida de la base de datos de UniprotKB. Los moldes para construir el modelo teórico de la estructura 3D que se utilizaron de la base de datos del PDB fueron: fosfometil-pirimidinacinasasa (1UB0), isoprenil cisteína carboximetil-transferasa (4A2N), homocisteína-metiltransferasa (1Q7M), factor de crecimiento 19 (1PWA), proteína gp32 de unión a DNA (2A1K), Tusp1 (2K3N), fosfometil-pirimidinacinasasa (1JXH), proteína de la familia de anclaje a la superficie de la pared celular (2X9W), CD4 (2K1U) y dominio Bro1 (3R9M).

13.2. Evaluación de los modelos teóricos 3D y su ubicación en la membrana

Con el fin de obtener un modelo teórico confiable, cada una de las estructuras 3D se sometieron a evaluación estereoquímica global en el servidor RAMPAGE (<http://mordred.bioc.cam.ac.uk/~rapper/rampage.php>) del grupo de bioinformática y cristalografía de la Universidad de Cambridge. RAMPAGE es un programa para visualizar y evaluar el gráfico de Ramachandran de una estructura proteica, el cual se basa en un conjunto de estructuras cristalográficas de proteínas de alta calidad

que nos indica la calidad de los ángulos de torsión de cada aminoácido de la proteína modelada. El gráfico de Ramachandran es una herramienta valiosa al momento de evaluar cada uno de nuestros modelos.

Para conocer la ubicación de las proteínas en la membrana se utilizó el servidor OPM (por sus siglas en inglés: *Orientation of protein in membranes*) (<http://opm.phar.umich.edu/>). La proteína claudina-2 es una proteína transmembranal (Furuse *et al.*, 1998);sin embargo, se sometió al servidor OPM para comprobar la correcta ubicación de sus regiones transmembranales. Posteriormente, las regiones transmembranales se sometieron a un proceso de refinamiento en el programa Modeller9v7 (Fiser & Sali, 2003; Webb & Sali, 2014).

13.3. Dinámica Molecular (DM)

Los modelos teóricos 3D de cada proteína se sometieron a un proceso de refinamiento por DM en el programa NAMD versión 2.8 (Phillips *et al.*, 2005), utilizando el campo de fuerza CHARMM27 (MacKerell & Bashford, 1998), en servidores GPU basados en CPU intel X5675 CON 2070/2075 y tarjetas Tesla GPU. Todas las DMs se realizaron en el *cluster* híbrido de la unidad de supercomputo-Xiuhcoatl del CINVESTAV-IPN(<http://clusterhibrido.cinvestav.mx/>). Las condiciones de unión periódicas usadas en la DM fueron las partículas “mesh Ewald” (PME) necesarias para las interacciones electrostáticas (Batcho, Case, & Schlick, 2001). Los parámetros de campo de fuerza de las interacciones no-unidas

fueron: corte 9 Å y 2 fs de tiempo. Los átomos de hidrógeno se añadieron usando el *psfgen* software, del programa de VMD (Humphrey, Dalke, & Schulten, 1996). El sistema fue sometido a reducción de mínima energía en 1000 pasos, seguidos por el equilibrio del sistema por 1 ns de simulación. Las simulaciones de DM se corrieron hasta 500 ns, utilizando el ensamble NTV. El tiempo de simulación para cada proteína fue: 100 ns para claudina-2 y 500 ns para las proteínas pEhCP112, mEhCP112 y EhADH.

Posterior al refinamiento por DM, se tomó la última conformación a 100 (para claudina-2) ó 500 ns (para pEhCP112, mEhCP112 y EhADH) y se sometió nuevamente al gráfico de Ramachandran, para comprobar el refinamiento de los ángulos de torsión.

13.3.1. Análisis de la trayectoria de DM

La DM se sometió a los siguientes análisis estructurales: desviación de la raíz cuadrática media (RMSD, por sus siglas en inglés *root mean square deviation*) que evalúa la convergencia del sistema durante la trayectoria de DM, radio de giro (RG) que es un parámetro geométrico que define la compactación o expansión del sistema durante la trayectoria de la DM, y las fluctuaciones raíz cuadrática media RMSF (por sus siglas en inglés *root mean square fluctuations*) que evalúa la flexibilidad de los C α (carbonos alfa) durante la trayectoria de DM. El análisis estructural se realizó con el programa Carma así como los "*snapshots*" o la captura

estructural de cierto momento en la trayectoria de DM, con los cuales se realizaron los acoplamientos de las proteínas (Glykos, 2006).

13.4. Acoplamiento molecular

El acoplamiento molecular proteína-proteína se realizó en el servidor Cluspro 2.0 (<http://cluspro.bu.edu/login.php?redir=/queue.php>). Cluspro se encuentra dentro de los mejores servidores para la predicción de uniones proteína-proteína, de acuerdo con CAPRI (por sus siglas en inglés *Critical Assessment of Predicted Interactions*) (Vajda Sandor and Kozakov Dima, 2009). Cluspro realiza el acoplamiento proteína-proteína e indica los diferentes tipos de uniones que se pueden dar, entre estos se encuentran, las uniones por puentes de hidrógeno, uniones por puentes salinos, interacciones electrostáticas y uniones hidrofóbicas. Cada una de las uniones tiene un valor de acuerdo con el número de aminoácidos que participan en la unión y la magnitud de la fuerza, de tal manera que cada conformación del heterodímero tiene un valor global conocido como energía mínima y es a partir de este valor y el número de repeticiones de la unión que se realiza el acoplamiento molecular. El algoritmo que utiliza el programa realiza el acoplamiento 100 veces y a esto se le denomina clúster de acoplamiento. Por lo tanto, se eligió el mejor modelo con la menor energía y el más repetitivo en el clúster. Para predecir la interacción entre las proteínas: pEhCP112 y EhADH, mEhCP112 y EhADH, pEhCP112 y claudina-2, mEhCP112 y claudina-2 y EhADH y claudina-2 se realizaron acoplamientos moleculares.

13.5. Estudios experimentales

13.5.1. Cultivo celular

Trofozoítos de *E. histolytica* de la clona A de la cepa HM1:IMSS se cultivaron axénicamente en medio TYI-S-33 suplementado con 15% de suero bovino a 37°C y se cosecharon durante la fase logarítmica de crecimiento. Para cosechar los trofozoítos, las botellas de cultivos en fase logarítmica de crecimiento, se incubaron en un baño de agua-hielo durante 5 a 10 min para despegarlos de las paredes del recipiente. Los trofozoítos se colectaron en tubos falcón de 50 ml para ser centrifugados a 500 x g, durante 5 min a 4°C.

13.5.2. Cultivo de la línea celular Caco-2.

Células de la línea celular Caco-2 (por sus siglas en inglés de *colorectal adenocarcinome cells*) se cultivaron en medio DMEM (por sus siglas en inglés de *Dulbeccos modified Eagle basal medium*), suplementado con 10% de suero fetal bovino, 1% de insulina de acción rápida (100 U/ml) y una mezcla de antibiótico penicilina (100 U/ml) y estreptomycin (100 µg/ml). Las células se sembraron a confluencia en botellas de cultivo de 75 cm² (Corning, EUA), se incubaron a 37°C en atmosfera de 5 % de y 95 % de aire, con una humedad relativa del 85 al 95 %.

13.5.3. Preparación de bacterias *Escherichia coli* competentes

Bacterias *E. coli* cepa M15 se sembraron en placas de agar LB (Luria Bertani) y se incubaron a 37°C toda la noche. Al día siguiente, una colonia bacteriana se inoculó en 5 ml de medio LB líquido y se incubó toda la noche a 37°C con agitación. Posteriormente, 40 ml de LB se inocularon con 400 µl de cultivo, se incubaron a 37°C en agitación hasta alcanzar una densidad óptica de 0.4 a una longitud de onda de 600 nm. El cultivo se pasó a tubos de 50 ml, los cuales se centrifugaron a 1,800 xg por 5 min a 4°C. El sobrenadante se eliminó, la pastilla se resuspendió en 2 ml de CaCl₂ 50 mM estéril frío, se incubó por 20 min en hielo y posteriormente se centrifugó a 1,800 x g. La pastilla se resuspendió en 4 ml de CaCl₂ 50 mM estéril frío, las bacterias se almacenaron en alícuotas a -70°C.

13.5.4. Clonación del gen *Ehadh* de *E. histolytica*

El DNA genómico de trofozoítos se obtuvo mediante el kit “WizardR SV Genomic DNA Purification System” (Promega). El gen completo *Ehadh* (2064 pb) con el número de acceso EHI_181220 en la base de datos AmoebaDB fue amplificado mediante PCR a partir del DNA genómico y usando los iniciadores 5´GCGCGCGGTACCATGAATAGACAATTCATTCCTG´3 y 5´GCGCGCAAGCTTTTAAAGAGATGGAAAGATAG´3, en presencia de 0.2 U DNA polimerasa High Fidelity (Fermentas). Brevemente, las condiciones para la PCR consistieron en un paso de desnaturalización inicial a 95°C durante 5 min seguido de 30 ciclos (30 s a 94°C, 30 s a 58 °C y 2 min a 72°C) y una extensión final a 72°C

por 5 min. El producto de PCR se purificó con el kit Qiaquick Gel Extraction (Qiagen), se restringió con las enzimas *HindIII* y *KpnI* (Thermo Scientific) y se volvió a purificar con el kit QIAquick PCR Purification (Qiagen). Este producto fue clonado en el vector *p-Cold1* (Takara) mediante una reacción de ligación con la enzima T4 ligasa (Thermo Scientific), a una temperatura de 16 °C toda la noche. Para comprobar la clonación del inserto en el vector se realizó una reacción de restricción con las enzimas *HindIII* y *KpnI*, liberando el inserto y linearizando el plásmido para verificar los tamaños esperados.

13.5.5. Transformación de bacterias competentes

Las construcciones *pCold1-Ehadh ypQE80L-ppEhcp112* (donada amablemente por el Doctor Jaime Ortega del Departamento de Biotecnología y Bioingeniería del CINVESTAV, contiene el gen completo *Ehcp112* de *E. histolytica*) codifican para una etiqueta de histidinas en el extremo amino terminal de las proteínas recombinantes generadas. Los plásmidos fueron transformados en bacterias M15 competentes. Para ello, 200 µl de células M15 competentes frescas se mezclaron con 1 µl del vector. La mezcla se incubó en hielo durante 30 min, posteriormente se sometió a choque térmico a 42°C por 90 s y se incubó en hielo por 2 a 3 min, se le adicionó 450 µl de medio LB líquido y se agitó por 1 h a 37°C. Los cultivos bacterianos transformados se sembraron en placas de agar conteniendo medio LB-ampicilina (100µg/ml) y se incubaron toda la noche a 37°C.

13.5.6. Expresión de las proteínas recombinantes

Para la expresión de los polipéptidos recombinantes His-ppEhCP112 e His-EhADH, se tomó una colonia de las bacterias transformadas con cada uno de los plásmidos y se inoculó en 10 ml de medio LB con ampicilina (100 µg/ml), a 37°C en agitación (1,800 xg), hasta alcanzar una densidad óptica de 0.6-0.8, a una longitud de onda de 600 nm. Posteriormente, al cultivo se le adicionó IPTG (Isopropil β-D-thiogalactopiranosido) 0.5 mM y se incubó durante 3 h a 37°C. La expresión de los polipéptidos se comprobó mediante electroforesis de geles de poliacrilamida desnaturalizantes (SDS-PAGE) al 10%.

13.5.7. Purificación de las proteínas recombinantes

Para purificar la proteína His-ppEhCP112 se utilizó la resina NiNTA (QIAGEN). El cultivo bacteriano se centrifugó a 16,000 x g, a 4 °C por 30 min y la fracción insoluble se sometió a cromatografía de afinidad, empleando 5 ml de la resina de Níquel empacada en una columna de 1 cm de diámetro por 15 cm de altura (BioRad), se procedió de acuerdo a lo reportado por Zamudio-Prieto et al., (2014).

Para purificar la proteína His-EhADH se utilizó un equipo FPLC (AKTÄ) con columnas HisTrap HP de 5 ml (GE Healthcare Life Science), se utilizó el protocolo de purificación recomendado por el fabricante.

Para la expresión de la proteína recombinante rGST, se tomó una colonia de las bacterias transformadas con el plásmido *pGEX-6P1* y se inoculó en 10 ml de medio

LB con ampicilina (100 µg/ml), a 37°C en agitación (1,800 xg), hasta alcanzar una densidad óptica de 0.6-0.8, a una longitud de onda de 600 nm. Posteriormente, al cultivo se le adicionó IPTG (Isopropil β-D-thiogalactopiranosido) 0.5 mM y se incubó durante 3 h a 37°C. La expresión de la proteína GST se comprobó mediante electroforesis de geles de poliacrilamida desnaturalizantes (SDS-PAGE) al 10%.

La purificación de la proteína rGST se realizó en un equipo FPLC (AKTÄ) con columnas GSTrap HP de 1 ml (GE Healthcare Life Science), se utilizó el protocolo de purificación recomendado por el fabricante

La concentración de las proteínas se determinó por el método de Bradford y la pureza e integridad de las proteínas se analizó por SDS-PAGE y mediante ensayos de western blot, usando los anticuerpos de ratón α-histidinas (1:5,000) (GE Healthcare Life Science) y α-GST (1:30000).

13.5.8 Ensayos de inmunofluorescencia indirecta

Trofozoítos de *E. histolytica* se adhirieron a cubreobjetos por 30 min, se lavaron dos veces con PBS, se fijaron y permeabilizaron con etanol al 96% por 30 min a -20°C. Posteriormente, las células se bloquearon con BSA al 0.05%, se incubaron toda la noche con los anticuerpos de ratón α-EhADH y de conejo α-EhCP112. Después de lavar tres veces los trofozoítos con PBS, las preparaciones se incubaron con una mezcla de anticuerpos secundarios α-ratón marcado con FITC y α-conejo marcado con TRITC, respectivamente. Para preservar la fluorescencia,

las preparaciones se montaron en portaobjetos con Vectashield (Vector Laboratories). Las preparaciones se observaron en el microscopio laser confocal Carl Zeiss LMS 700 y se analizaron en el software ZEN 2009 Light Edition (Zeiss). Para cuantificar la co-localización, se analizaron células completas o sólo el área correspondiente a la membrana plasmática en cortes de 1 μm de grosor del plano z, empleando el plugin JACoP (por sus siglas en inglés de *just another co-localization plugin*) (Bolte & Cordelieres 2006) del programa ImageJ 1.48i (Schneider et al. 2012). Cada valor representa la media y el error estándar de 12-25 células analizadas.

13.5.9 Resonancia de plasmón superficiales (RPS)

La RPS es una técnica que se utiliza para ver interacciones proteína-proteína en tiempo real, sin necesidad de una etiqueta. El análisis de RPS se realizó con la finalidad de conocer la constante de asociación (K_a) y disociación (K_d) entre las proteínas pEhCP112 Y EhADH. El estudio se realizó en el equipo Biacore T200 de la unidad de LANSE del CINVESTAV. La proteína His-ppEhCP112 se inmovilizó en el chip CM5 con el amortiguador de inmovilización (10 mM de acetato de sodio, pH 4.0). El analito, en este caso la proteína His-EhADH diluida en el amortiguador de corrida HBS-EP (0.1 M HEPES, 1.5 M NaCl, 30mM EDTA y 0.5% v/v de surfactante P20 1 x 1000 ml, pH 7.4), se inyectó a diferentes concentraciones (286, 143, 76.5, 38.25 y 19.12 nM) y se permitió la interacción durante 4min. La cinética de unión entre His-ppEhCP112 con His-EhADH se realizó por triplicado, en el mismo canal

para evitar errores en la medida de las interacciones. Al finalizar la cinética, el analito se despegó con una solución de regeneración (glicina-HCl 10 mM, pH 1.5). Las gráficas de las cinéticas se analizaron en el programa SigmaPlot 12.0.

14. RESULTADOS

El complejo EhCPADH participa en diversos mecanismos patogénicos de *E. histolytica* e incluso se ha propuesto como un candidato de vacuna contra la amibiasis. Este complejo está formado por dos proteínas: EhCP112 y EhADH, las cuales además participan de manera independiente en la virulencia de este parásito (García-Rivera et al., 1999). Los estudios realizados hasta el momento indican la presencia de EhCPADH en los trofozoítos; sin embargo, se desconoce de qué manera se forma el complejo, así como los aminoácidos que participan en la unión entre las proteínas EhCP112 y EhADH.

Por lo tanto, en la primera parte de esta tesis se llevó a cabo un análisis bioinformático para predecir el tipo de unión entre las proteínas que conforman el complejo EhCPADH. Debido a que no se cuenta con el cristal de las proteínas EhCP112 y EhADH, en primer lugar generamos un modelo teórico tridimensional (3D) de cada una de ellas y posteriormente evaluamos si estos modelos cumplían con los parámetros biológicos y estructurales apropiados, mediante un refinamiento por DM. Con estos modelos teóricos 3D se llevó a cabo un acoplamiento molecular para obtener las diferentes conformaciones del complejo y así proponer los probables sitios de interacción entre ambas proteínas.

Estudios previos en nuestro grupo de trabajo han demostrado que durante la invasión de los trofozoítos hacia el epitelio intestinal, el complejo EhCPADH se asocia con proteínas de la UE. Sin embargo, se desconoce con que proteína(s) de la UE, el complejo EhCPADH interacciona de manera directa. Las claudinas son

proteínas integrales de la UE que regulan el paso de iones por la ruta paracelular y sus asas extracelulares están expuestas en el espacio intercelular, lo cual les confiere una alta probabilidad de ser blancos de *E. histolytica*. De hecho algunas claudinas sirven como receptores para patógenos, como la bacteria *Clostridium perfringens* (Saitoh et al., 2015). Por lo tanto, para estudiar si existe asociación directa de EhCPADH con alguna claudina, como primera instancia modelamos a la proteína claudina-2 y realizamos un acoplamiento molecular con las proteínas mEhCP112 y EhADH. Seleccionamos a la claudina-2 debido a que se ha demostrado que su expresión se incrementa durante procesos inflamatorios (Weber et al. 2008), como el que generan los trofozoítos al invadir la mucosa intestinal.

La segunda parte de esta tesis, incluye la demostración experimental de la asociación entre las proteínas EhCP112 y EhADH, mediante diferentes estrategias metodológicas.

14.1. Resultados bioinformáticos

14.1.1. Generación del modelo teórico de las estructuras terciarias

La EhCP112 se puede encontrar en al menos tres formas dentro de los trofozoítos, como: i) proteína completa (ppEhCP112, 446 aa): incluyendo el péptido señal y el propéptido; ii) forma precursora o inactiva (pEhCP112): sin el péptido señal, pero todavía con el propéptido; y iii) forma madura o activa (mEhCP112): sin el péptido

señal, sin el propéptido y catalíticamente activa. La proteína completa probablemente se encuentra en el retículo endoplásmico rudimentario que posee *E. histolytica* y pierde su péptido señal en su traslado al aparato de Golgi, así que quizá las formas precursora y madura de la EhCP112 sean las que se asocien con la EhADH. Por lo tanto, solo modelamos la pEhCP112 y la mEhCP112.

Para modelar las estructuras 3D de pEhCP112, mEhCP112, EhADH y claudina-2, se utilizó el servidor I-TASSER, el cuál toma como molde las proteínas de la base de datos del PDB (por sus siglas en inglés de *protein data bank*). Las moléculas que se utilizaron como moldes para cada una de las proteínas se mencionan en la sección de Materiales y Métodos y las estructuras tridimensionales modeladas por I-TASSER se muestran en las figuras 8-11. El modelo de la pEhCP112 muestra que es una proteína globular con diez α -hélices y ocho β -plegadas (Fig. 8 y tabla 1). El sitio activo, compuesto por los aminoácidos C167, H329 y N348, se encuentra por debajo del propéptido y el motivo RGD (250-252 aa) se encuentra expuesto.

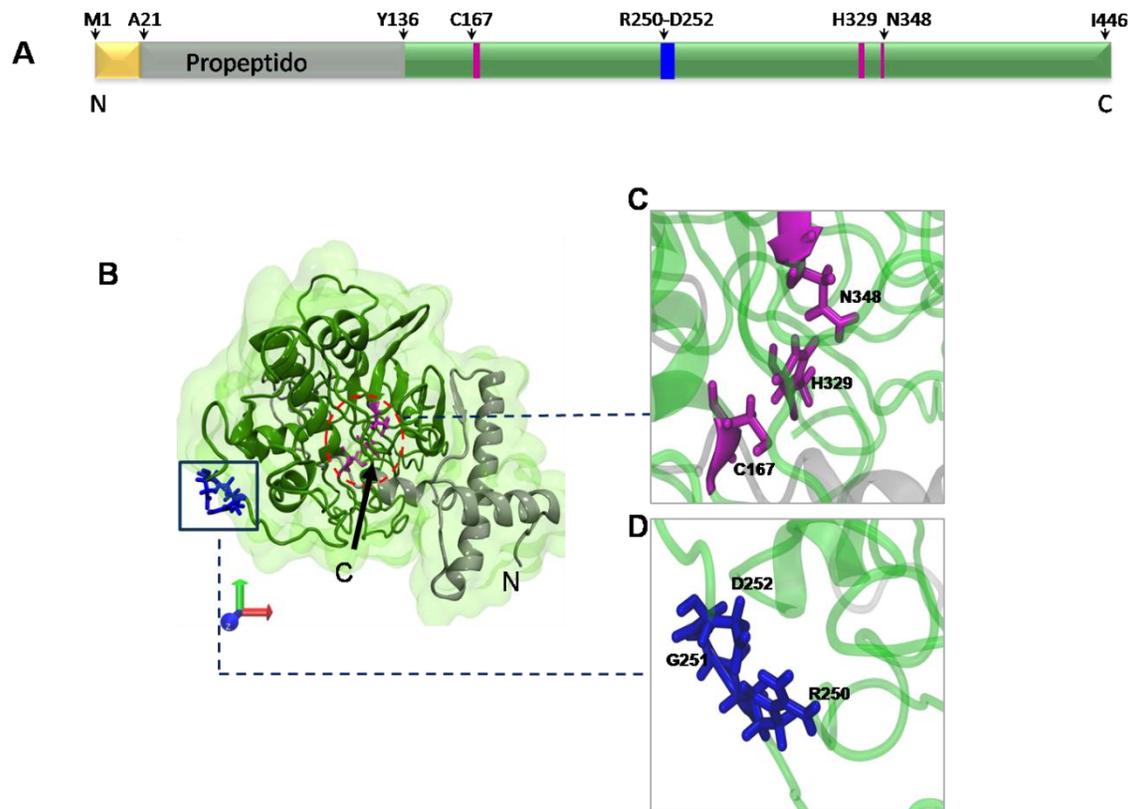


Figura 8. Modelo teórico de la estructura 3D de la proteína pEhCP112 de *E. histolytica*. A) Estructura lineal de la secuencia proteica, donde se muestran los dominios reportados para esta molécula. B) Modelo teórico 3D obtenido con el servidor I-TASSER. N: amino terminal. C: carboxilo terminal. C) Amplificación del sitio catalítico. D) Amplificación del motivo RGD. Amarillo: pre-propéptido. Gris: propéptido. Magenta: tríada catalítica (C167, N318 y H329). Azul: motivo RGD (R250, G251 y D252). Letras y números indican la posición de los aminoácidos. Ejes: X, rojo; Y, verde; Z, azul.

Tabla 1. Estructuras α y β del modelo 3D de la proteína pEhCP112 obtenido con el servidor I-TASSER

Estructura	pEhCP112
α 1	L26-K38
α 2	T46-T70
β 1	A75-H77
α 3	E88-G95
α 4	R149-V152
α 5	C167-T184
α 6	A199-T206
α 7	S220-A226
β 2	F230-L232
β 3	I259-M261
α 8	D274-Y288
α 9	T300-S304
β 4	Y305-G308
α 10	C318-T320
β 5	V332-M334
β 6	Y337-G339
β 7	V341-R347
β 8	Y360-K364

Por su parte, el modelo teórico 3D de la proteína mEhCP112 indica que esta forma de la proteasa presenta solo 5 α -hélices y 6 β -plegadas (Fig. 9 y tabla 2). A diferencia de la pEhCP112, en esta forma tanto el motivo RGD como el sitio catalítico están expuestos.

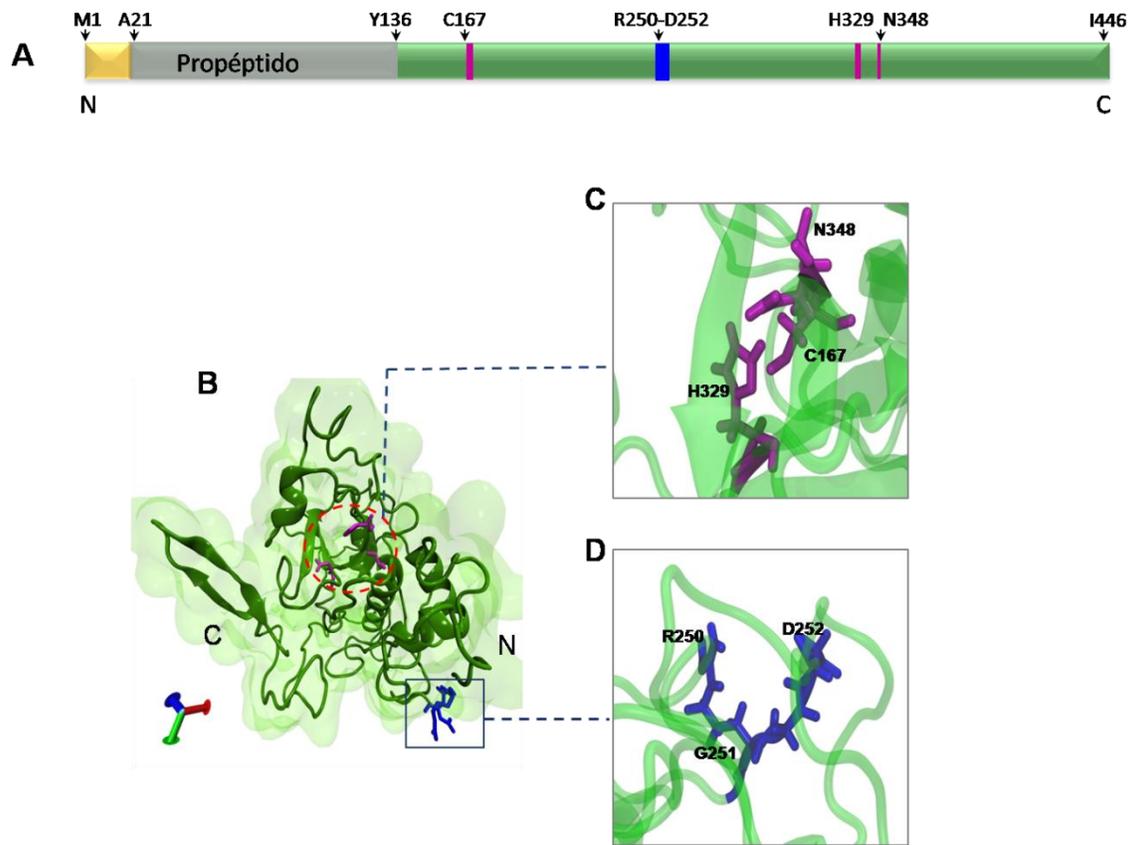


Figura 9. Modelo teórico de la estructura 3D de la proteína mEhCP112 de *E. histolytica*. A) Estructura lineal de la secuencia proteica, donde se muestran los dominios reportados para esta molécula. B) Modelo 3D obtenido con el servidor I-TASSER. N: amino terminal. C: carboxilo terminal. C) Amplificación del sitio catalítico. D) Amplificación del motivo RGD. Amarillo: pre-propéptido. Gris: propéptido. Magenta: tríada catalítica (C167, N318 y H329). Azul: motivo RGD (R250, G251 y D252). Letras y números indican la posición de los aminoácidos. Ejes: X, rojo; Y, verde; Z, azul.

Tabla 2. Estructuras α y β del modelo 3D de la proteína mEhCP112 obtenido con el servidor I-TASSER

Estructura	mEhCP112
α 1	C167-T184
α 2	A199-D204
α 3	W217-V227
α 4	L279-H287
β 1	F291-S294
α 5	T300-S304
β 2	E330-D335
β 3	E342-R347
β 4	Y360-K364
β 5	K431-S434
β 6	V439-N443

El modelo teórico 3D de la proteína EhADH muestra que esta adhesina es una molécula extendida y con estructura similar a otras proteínas ALIX (Cecilia Bañuelos et al., 2012). Presenta 20 α -hélices y 2 β -plegadas (Fig. 10 y tabla 3). En el extremo amino terminal contiene el dominio Bro1 (F9-L349 aa) y el carboxilo terminal (A350-L687aa) posee el sitio de adhesión (A480-N600 aa). Además, algunos residuos del amino y carboxilo terminal forman una región con forma de V.

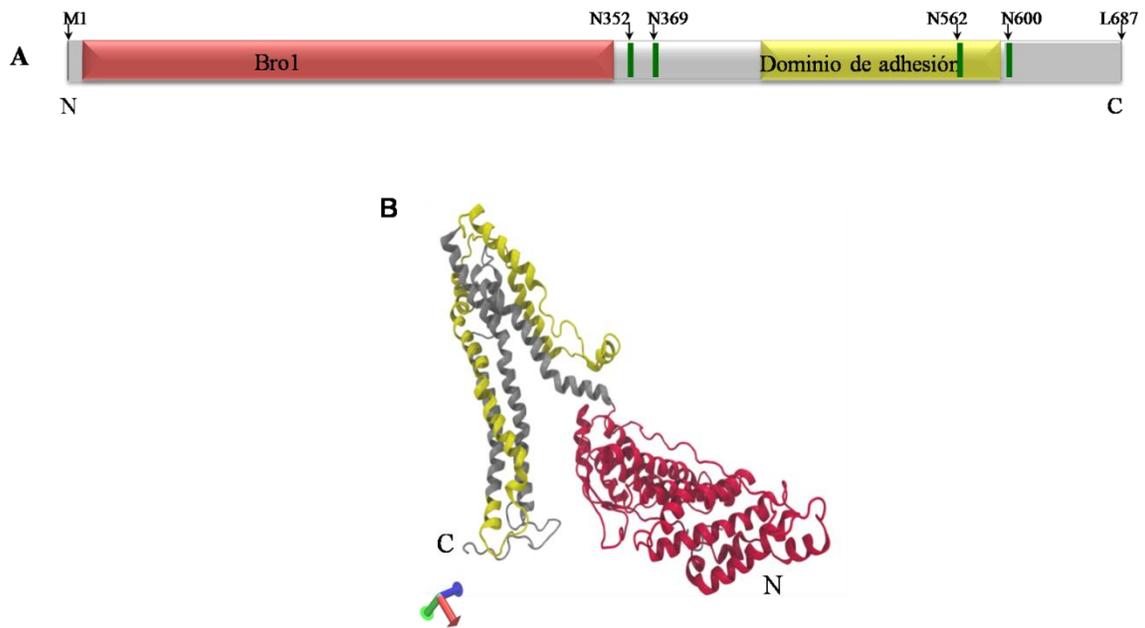


Figura 10. Modelo teórico de la estructura 3D de la proteína EhADH de *E. histolytica*. A) Estructura lineal de la secuencia proteica, donde se muestran los dominios reportados para esta molécula. B) Modelo teórico 3D obtenido con el servidor I-TASSER. N: amino terminal. C: carboxilo terminal. Rojo: dominio Bro1. Amarillo: dominio de adhesión. Letras y números indican la posición de los aminoácidos. Ejes: X, rojo; Y, verde; Z, azul.

Tabla 3. Estructuras α y β del modelo teórico de la proteína EhADH obtenido en el servidor I-TASSER.

Estructura	EhADH
α 1	V22- Y24
α 2	L43- S55
α 3	C59-S 77
α 4	T106- F129
α 5	A135- C158
α 6	S166- Q196
α 7	S199- T223
α 8	F231- E258
α 9	E261- Y284
α 10	D290- N311
α 11	R320- L324
α 12	P350-K390
α 13	P397- L410
α 14	T412- Q454
α 15	A467- E508
α 16	Q524-I533
α 17	E535- E541
α 18	N550- K559
α 19	S564- G599
α 20	A603- G667
β 1	Q85- Y89
β 2	K100 -Y104

Como miembro de la familia de las claudinas, se predice que la claudina-2 es un proteína integral de membrana que presenta cuatro regiones transmembranales (8-28, 82-102, 117-137 y 163-183aa), dos asas extracelulares (9-81 y 138-162 aa) y

tres regiones citoplásmicas (1-7, 103-116 y 184-230 aa). Sin embargo, no ha sido cristalizada, por lo que al obtener el modelo teórico 3D con el servidor I-TASSER, encontramos que su estructura es similar a la de otras claudinas y presenta 4 α -hélices y el resto de la estructura está formada por giros al azar (Fig. 11).

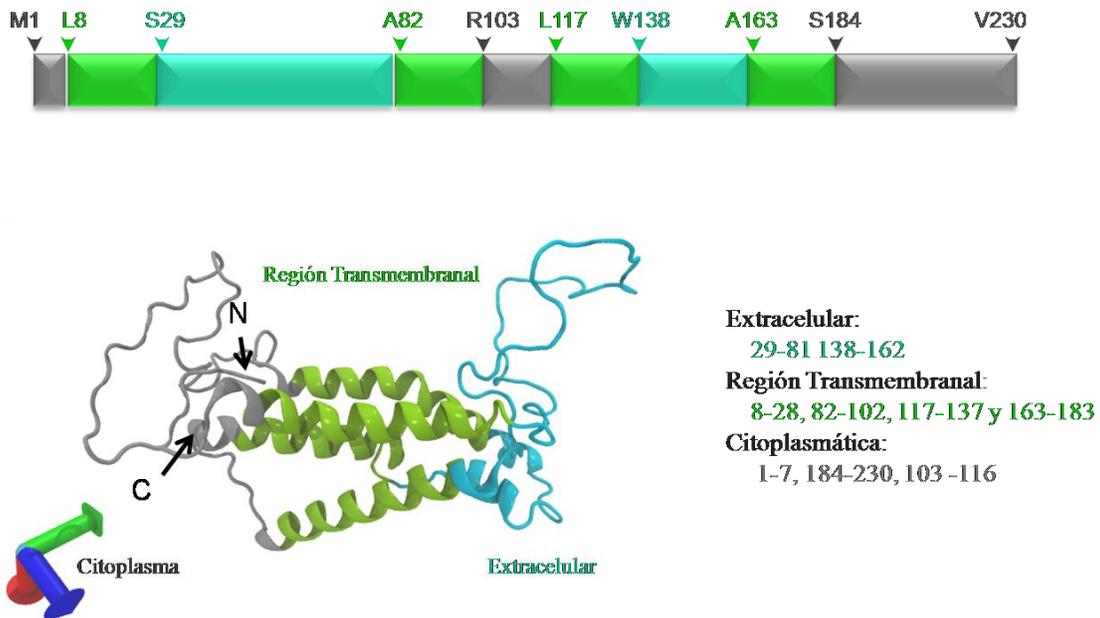


Figura 11. Modelo teórico de la estructura 3D de la proteína claudina-2 de *Homo sapiens*. A) Estructura lineal de la secuencia proteica, donde se muestran los dominios reportados para esta molécula. B) Modelo teórico 3D obtenido del servidor I-TASSER. N: amino terminal. C: carboxilo terminal. Gris: región citoplásmica. Verde: segmentos transmembranales. Azul: asas extracelulares. Ejes: X, rojo; Y, verde; Z, azul.

14.1.2. Evaluación de los modelos teóricos 3D

Los modelos teóricos 3D de las proteínas pEhCP112, mEhCP112, EhADH y claudina-2 se sometieron a un análisis de evaluación de la calidad estereoquímica global en el servidor RAMPAGE. Los resultados obtenidos son representados en la gráfica de Ramachandran, donde se evalúan los ángulos de torsión de cada uno de los aminoácidos y la flexibilidad requerida de la cadena polipeptídica para adoptar el plegamiento correcto de una proteína.

La gráfica de Ramachandran para el modelo pEhCP112 mostró 68.9% de los residuos en la región favorecida, 23.4% en la región permitida y 7.7% fuera de la región permitida (Fig. 12A). En el caso de la proteína mEhCP112 los valores fueron: 74.9% residuos dentro de la región favorable, 15.3% en la región permitida y 9.8% fuera de la región permitida (Fig. 12B). Para la proteína EhADH, los resultados fueron: 79.8% residuos ubicados en la región favorecida, 17% dentro de la región permitida y 3.3% fuera de la región permitida (Fig. 12C). La proteína claudina-2 los presentó: 85.5 % de los residuos ubicados en la región favorecida, 10 % dentro de la región permitida y 4.5 % fuera de la región permitida (Fig. 12D). Cabe mencionar que en todos los modelos teóricos 3D, la mayoría de los aminoácidos se encontraron en la región favorecida de las gráficas, sugiriendo que las estructuras predichas tienen un correcto plegamiento.

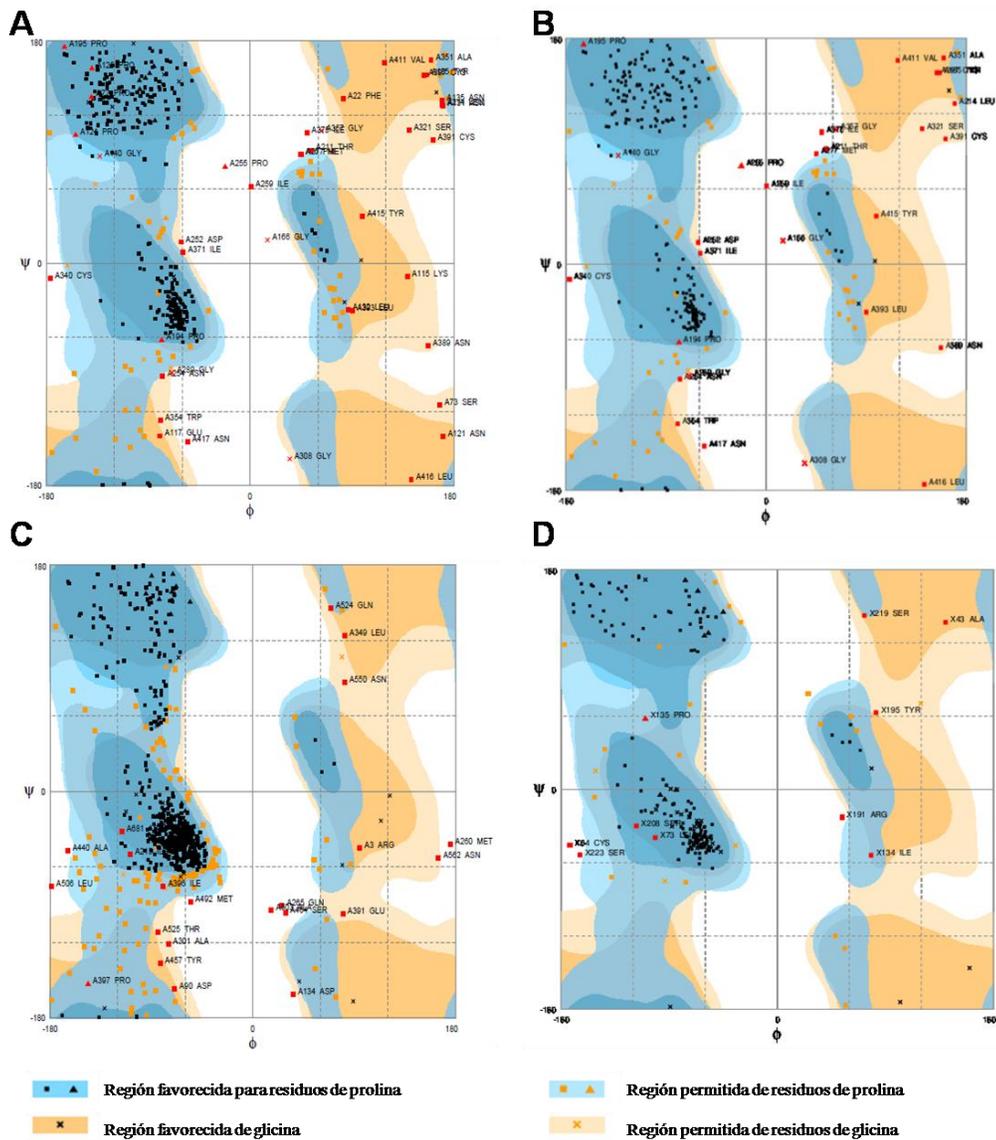


Figura 12. Gráfica de Ramachandran de los modelos teóricos 3D obtenidos con el servidor I-TASSER. A) pEhCP12. B) mEhCP12. C) EhADH. D) Claudina-2. Los puntos rojos señalan aminoácidos en las regiones no permitidas.

14.1.3 Orientación de las proteínas en membranas

Antes de proceder a realizar la DM de los modelos, es importante determinar si las proteínas son solubles o son integrales de la membrana, ya que el procedimiento para la simulación de la DM es diferente. En reportes previos y mediante ensayos de inmunofluorescencia y microscopía confocal se han localizado a las proteínas EhCP112 y EhADH en la membrana plasmática y en la periferia de vesículas de los trofozoítos (García-Rivera et al 2009; Bañuelos et al 2011). Por su parte, la claudina-2 se ha reportado en los contactos intercelulares, a la altura de la UE. Por lo tanto, se analizó si los modelos 3D de las proteínas pEhCP112, mEhCP112, EhADH y claudina-2 se ubicaban en la membrana, para lo cual se utilizó la base de datos OPM. En el caso de la claudina-2, aunque ya se sabe que es una proteína integral de membrana, también se sometió al mismo procedimiento, para comprobar la correcta ubicación de sus regiones transmembranales. Posteriormente, las regiones transmembranales se sometieron a un proceso de refinamiento de asas en el programa Modeller9v7.

De acuerdo a los resultados del servidor OPM, pEhCP112 es una proteína periférica de membrana y la cadena lateral de los aminoácidos V123, P124, P125, P127 (localizados en el propéptido) y A137, F138, I271, K273 y L279 interacciona con la membrana (Fig. 13A). mEhCP112 también es una proteína periférica de membrana y la cadena lateral de los residuos C190, P237, F238, P255, V257, I259, A262, M384, I385 y Y387 se asocia con la membrana (Fig. 13B). Ninguno de estos residuos coincidió en posición con los detectados en pEhCP112, sugiriendo que los

cambios estructurales que sufre la proteína EhCP112 durante su proceso de maduración, afectan los sitios de asociación con la membrana. Sin embargo, pEhCP112 y mEhCP112 presentaron 6 de los 10 residuos embebidos en la membrana (P, P, F, V, I y A), aunque en diferente posición.

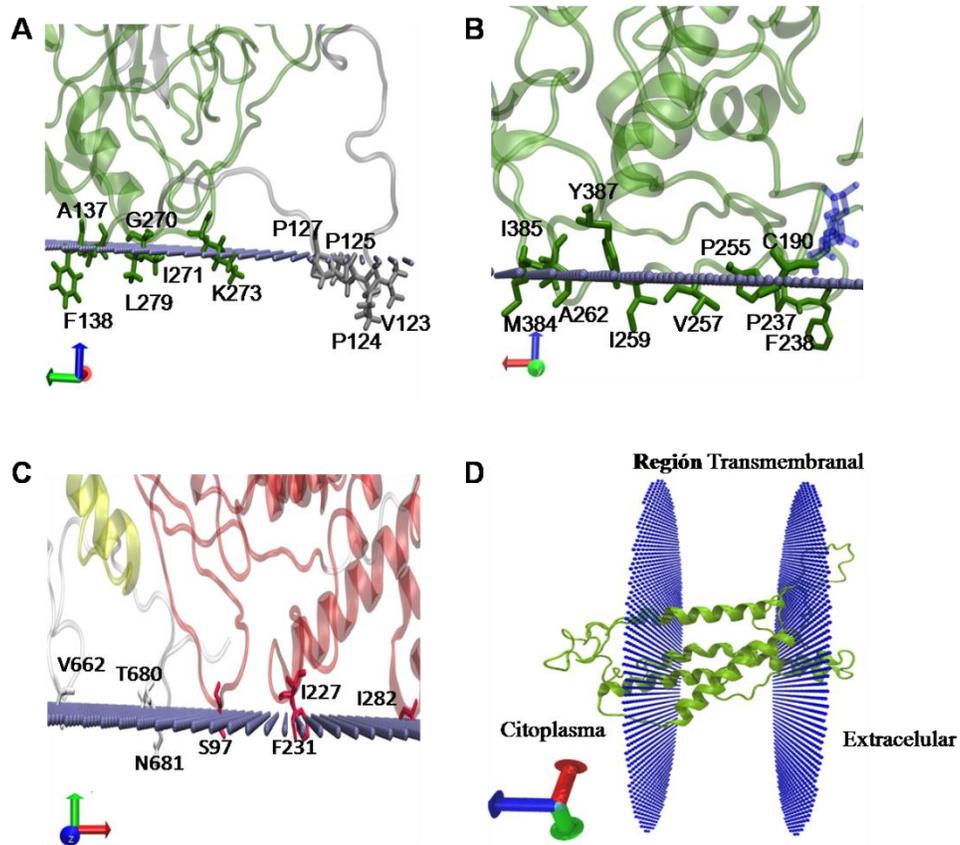


Figura 13. Orientación en la membrana de los modelos teóricos 3D. Los modelos teóricos 3D de las proteínas pEhCP112 (A), mEhCP112 (B), EhADH (C) y claudina-2 (D) se orientaron en la membrana con el servidor OPM. Números y letras en negritas: aminoácidos embebidos en la membrana. Ejes: X, rojo; Y, verde; Z, azul.

Se ha reportado que EhADH posee 3 regiones hidrofóbica dentro del dominio Bro1 (V114-S130, T176-A195 y F224-C247 aa), lo que había sugerido que se trataba de una proteína transmembranal (Garcia-Rivera et al., 1999). Sin embargo, nuestros resultados en la base de datos OPM predicen que EhADH también es una proteína periférica, con 7 residuos embebidos en la membrana: S97, F231, I227, I282, V662, T680, N681 (Fig. 13C).

Con respecto a la proteína claudina-2, de acuerdo a la base de datos OPM, se predice como una molécula integral de membrana con cuatro regiones transmembranales (8-28, 82-102, 117-137 y 163- 183 aa), dos regiones extracelulares (9-81 y 138-162 aa) y tres regiones citoplásmicas (1-7, 103- 116 y 184-230 aa) (Fig.13D), lo cual correlaciona con lo reportado en la base de datos UniprotKB.

14.1.4. Dinámica molecular (DM)

Los modelos teóricos 3D de las proteínas pEhCP112, mEhCP112 y EhADH se refinaron mediante DM durante una trayectoria de 500 ns, mientras que la proteína claudina-2 se refinó durante 100 ns. La trayectoria de la DM, así como la conformación de las estructuras que adoptan las proteínas en un momento en particular de la DM (del inglés *snapshot*), se obtuvieron en el programa Carma. Después de 500 ns de DM, la proteína pEhCP112 aún conservó su forma globular (Fig. 14A), presentó 8 α -hélices, 8 β -plegadas y el resto de la estructura está

constituida de espirales al azar (Tabla 4). Durante la trayectoria de 500 ns se observaron diferentes cambios estructurales en cada aminoácido (Fig. 15), siendo las regiones que presentan mayores modificaciones los residuos 73-145, 205-253 y 373-397. Todas estas regiones son grandes y presentan estructuras con giros, sin una estructura 3D estable, dándole a la proteína EhCP112 características de una proteína desordenada. Por su parte, el gráfico de Ramachandran después de 500 ns de DM, indicó que pEhCP112 contiene 73.4% residuos en la región favorecida, 21.1% dentro de la región permitida y 5.5% fuera de la región permitida (Fig. 16A).

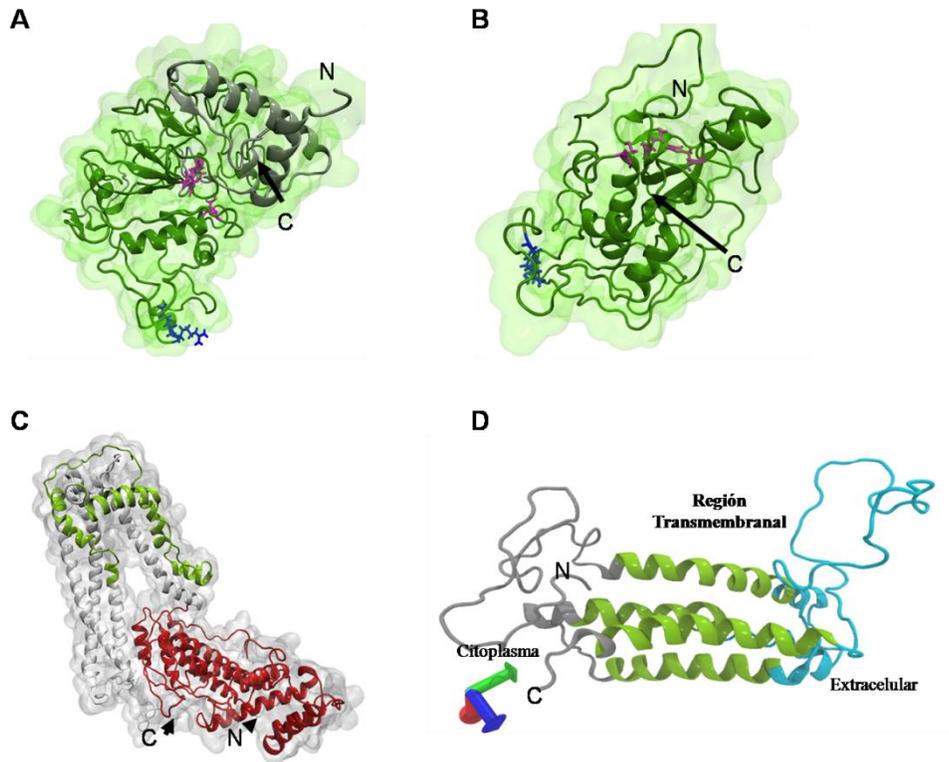


Figura 14. Modelos teóricos de la estructura 3D de las proteínas después de la trayectoria de DM. A) Modelos teóricos 3D de las proteínas pEhCP112 (A), mEhCP112 (B) y EhADH (C) después de 500 ns de DM usando el programa NAMD. Gris: propéptido. Magenta: tríada catalítica(C167, N318 y H329). Azul: motivo RGD (R250, G251 y D252). D) Modelo teórico 3D de la claudina-2 después de 100 ns de DM usando el programa NAMD. N: amino terminal. C: carboxilo terminal. Ejes: X, rojo; Y, verde; Z, azul.

Tabla 4. Estructuras α y β del modelo teórico 3D de la proteína pEhCP112 después de 500 ns de DM

Estructura	pEhCP112
α 1	L6-K18
α 2	T26-K48
β 1	A55-F56
α 3	E69-S73
β 2	A77-I78
β 3	G120-E121
α 4	C147-N162
α 5	A179-T188
α 6	S200-R202
α 7	P222-T228
β 4	Y246-T248
α 8	L260-Y268
β 5	S287-G288
β 6	T307-H309
β 7	V312-M314
β 8	F324-N328
β 9	I341-I343



Figura 15. Predicción de la estructura secundaria durante 500 ns de DM de la proteína pEhCP112. A la izquierda se observa el código de colores de las diferentes estructuras. T: giros. E: conformación extendida. B: puentes aislados. H: α -hélices. G: 3-10 hélices. I: pi-hélices. C:espirales.

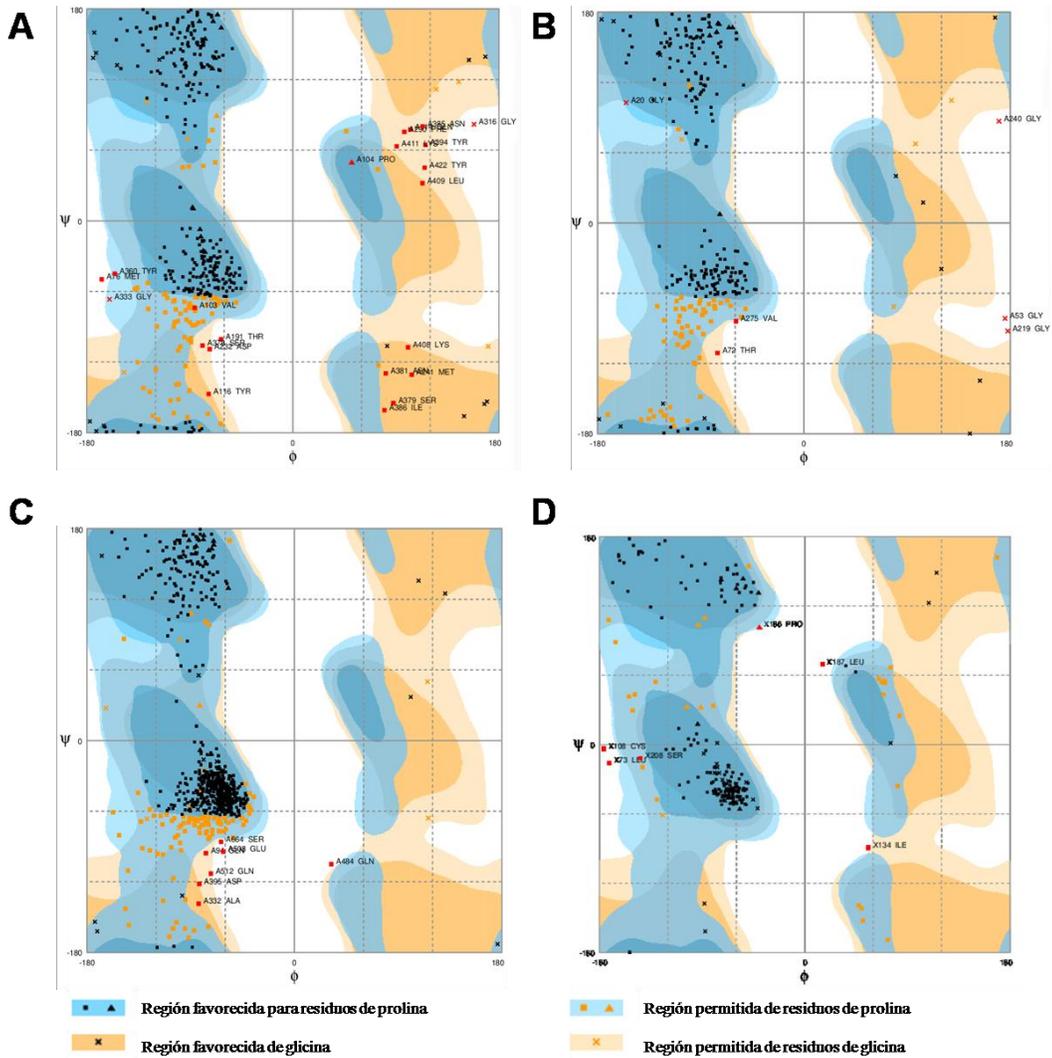


Figura 16. Gráfica de Ramachandran de los modelos teóricos 3D obtenidos después de la trayectoria de DM. A) pEhCP112 después de 500 ns de DM. B) mEhCP112 después de 500 ns de DM. C) EhADH después de 500 ns de DM. D) Claudina-2 después de 100 ns de DM. Los puntos rojos corresponden a aminoácidos en las regiones no permitidas.

La proteína mEhCP112 después de 500 ns de DM también se consideró como una proteína globular con 5 α -hélices, 7 β -plegadas y el resto de la estructura 3D consta de espirales al azar (Fig. 14B y tabla 5). En la figura 17 se observan los cambios en la estructura secundaria de esta proteína durante 500 ns de DM, siendo las zonas con mayor fluctuación los residuos 137-155, 273-272, 320-324 y 440-446. Después de la DM, en la gráfica de Ramachandran se encontraron 77.6% de los residuos en la región favorecida, 20.3% dentro de la región permitida y 2.0% fuera de la región permitida (Figura 16B).

Tabla 5. Estructuras α y β del modelo teórico 3D de la proteína mEhCP112 después de 500 ns de DM

Estructura	mEhCP112
α 1	S160 -Y185
α 2	S198 - T206
β 1	P290 - V297
α 3	W216 - V227
β 2	T327 -R338
β 3	V341 - R347
α 4	M277 - G289
α 5	S316 - S324
β 4	G355 - G357
β 5	I361 -I363
β 6	T390 - C391
β 7	C397 - S398

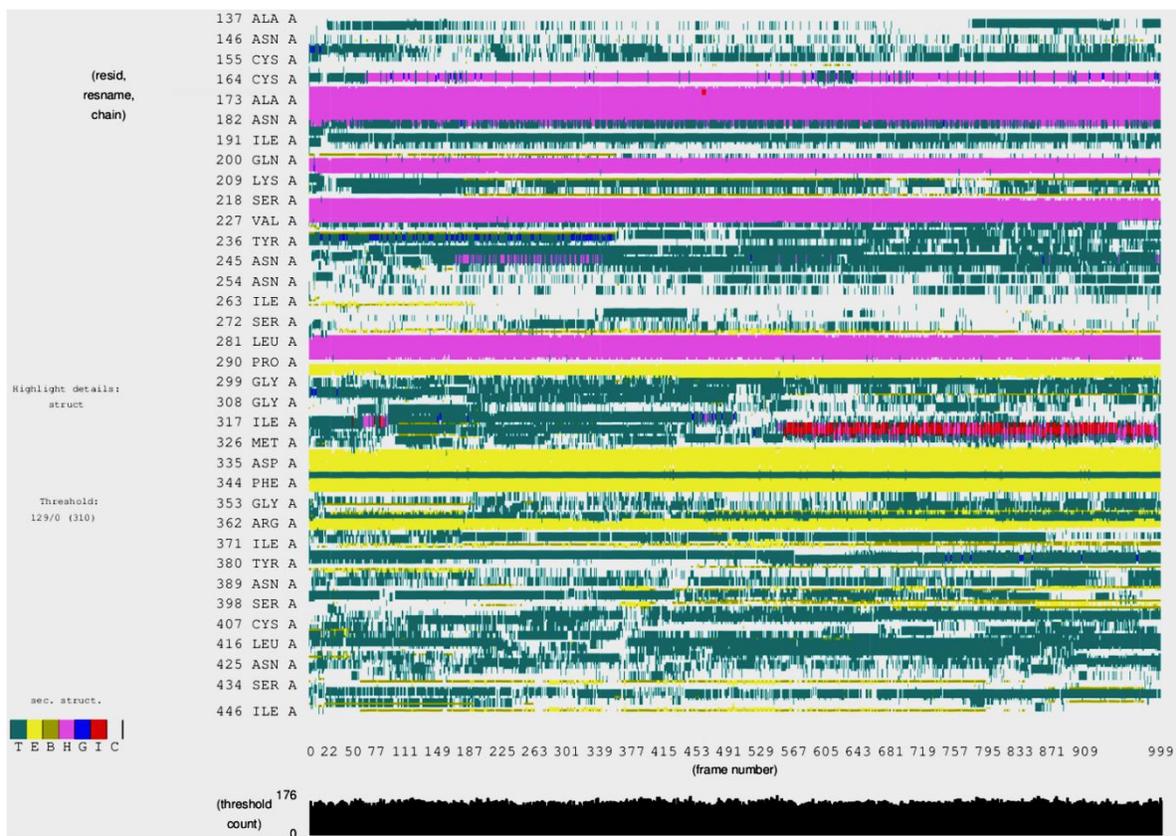


Figura 17. Predicción de la estructura secundaria durante 500 ns de DM de la proteína mEhCP112. A la izquierda se observa el código de colores de las diferentes estructuras. T: giros. E: conformación extendida. B: puentes aislados. H: α -hélices. G: 3-10 hélices. I: pi-hélices. C: espirales.

La trayectoria de la EhADH durante 500 ns de DM exhibió cambio significativos (Fig. 14C). Por ejemplo, 2 β -plegadas (K16-D18 y W88-D90 aa) aparecieron a 100 ns, desaparecieron a 200 ns, aparecieron nuevamente a 300 ns y desaparecieron a 400 ns (Fig. 18). La proteína EhADH a 500 ns presentó 19 α -hélices (Tabla 6). La gráfica de Ramachandran obtenida a 500 ns mostró 83.3% residuos dentro de la zona permitida, 15.6% en la región permitida y 1% fuera de la zona permitida (Fig. 16C).

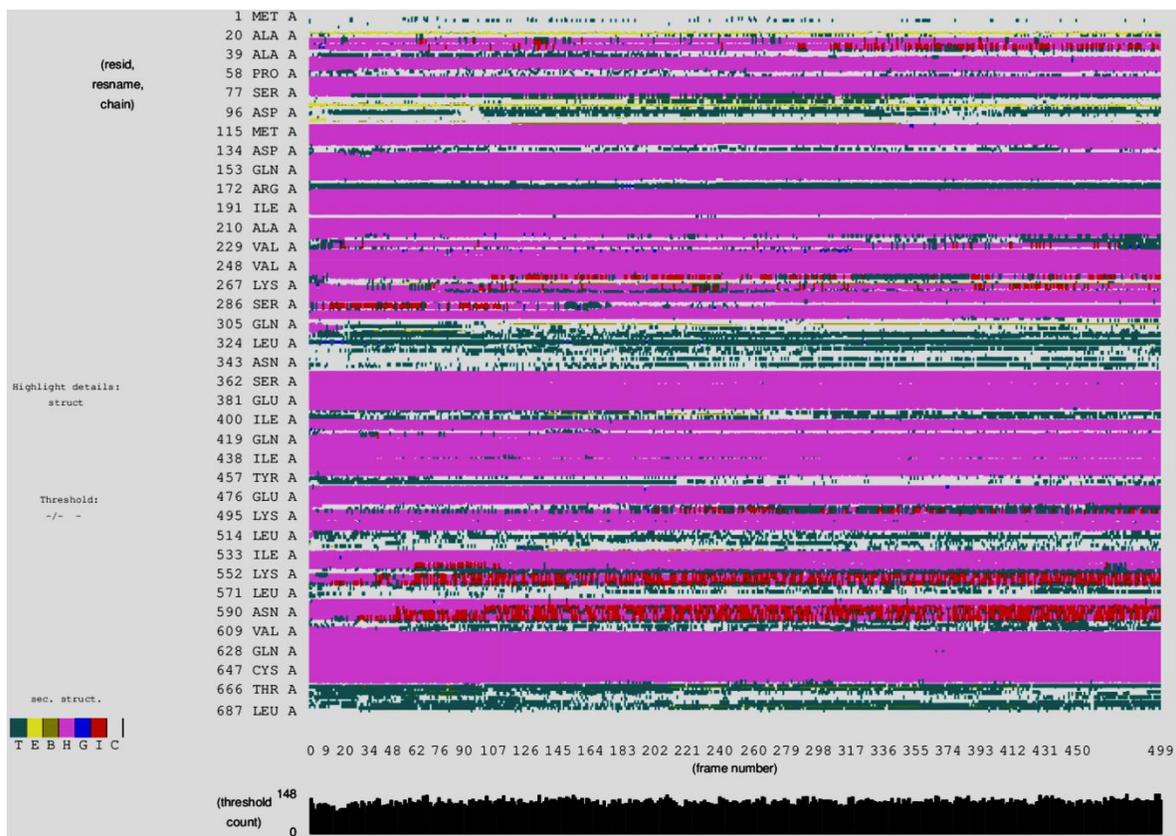


Figura 18. Predicción de la estructura secundaria durante 500 ns de DM de la proteína EhADH. A la izquierda se observa el código de colores de las diferentes estructuras. T: giros. E: conformación extendida. B: puentes aislados. H: α -hélices. G: 3-10 hélices. I: pi-hélices. C: espirales.

Tabla 6. Estructuras α del modelo 3D de la proteína EhADH después de 500 ns de DM

Estructura	EhADH
α 1	V22-N32
α 2	I40-S55
α 3	Q60-L76
α 4	L107-K131
α 5	A135-C162
α 6	P171-Q196
α 7	E200-I215
α 8	F231-M260
α 9	Q265-A283
α 10	S286-T297
α 11	A351-S388
α 12	Q398-Q409
α 13	Y413-Q454
α 14	S464-K483
α 15	M492-E508
α 16	W529-I546
α 17	N550-N562
α 18	D576-N597
α 19	M608-E657

En las gráficas de Ramachandran a 500 ns de DM de las proteínas pEhCP112, mEhCP112 y EhADH, se pudo observar que la distribución de los residuos incrementó en la región favorecida y permitida, indicando que los ángulos de torsión de ciertos aminoácidos se refinaron, en comparación con los modelos obtenidos antes de la DM.

Con respecto a la claudina-2, la DM a 100 ns se llevó a cabo con la proteína embebida en la membrana plasmática (Fig. 14D). Las proteínas transmembranales, son muy estables ya que al estar ancladas en la membrana la libertad de movimiento es menor en comparación con las proteínas citosólicas. Por lo tanto, en la claudina-2 las regiones transmembranales no presentaron cambios en la estructura; sin embargo, la primera asa extracelular presentó la mayor zona de movimiento, como se observa en la gráfica de RMSF (Fig. 21). Las regiones ancladas a la membrana están constituidas de α -hélices y el resto de la proteína se conforma de giros y espirales. La gráfica de Ramachandran presentó 84.6% residuos dentro de la zona permitida, 12.7 % en la región permitida y 2.7 % fuera de la zona permitida (Fig. 16D), lo que indica que el modelo después de 100 ns de DM se refinó, en comparación con el obtenido con el servidor I-TASSER.

14.1.5. Evaluación de la trayectoria de DM

La evaluación de la trayectoria de DM se realiza principalmente con tres gráficos: i) RMSD, que evalúa la convergencia del sistema durante la trayectoria de DM; ii) radio de giro (RG), que es un parámetro geométrico que define la compactación o expansión del sistema durante la trayectoria de la DM; y iii) RMSF, que evalúa la flexibilidad de los C α durante la trayectoria de DM.

Los valores de RMSD en la trayectoria de la proteína pEhCP112 muestran cuatro fases: la primera de 0 a 80 ns, donde la proteína muestra una pendiente que indica

la búsqueda del equilibrio; la segunda va de 80-170 ns, donde el sistema aparenta estar en equilibrio; sin embargo, de 185 a 225 el gráfico muestra un incremento; y es hasta los 230-500 ns que el sistema se estabiliza (Fig. 19A). Los valores de RG de la proteína pEhCP112 muestran dos expansiones: una en los primeros 75 ns y otra en los 100-225 ns; finalmente en los últimos 50 ns, se observa una compactación de la trayectoria de DM (Fig. 19B). Las regiones flexibles de los C α de la proteína se analizaron con la medición de los valores de RMSF (Fig. 19C), donde las cinco principales regiones flexibles se ubican en los aminoácidos: E25 a K60, con un desplazamiento de 12-8 Å; un segundo pico se ubica entre los aminoácidos N80 a S220 con un desplazamiento de 10-20 Å; uno más está localizado en la región R222 a G270, esta es la región que presenta el principal desplazamiento con valores de 12-24 Å; la cuarta región se ubica entre los aminoácidos T320 a G370, con un desplazamiento de 9-14 Å; y el último pico se localiza del residuo T390 a I446, con un desplazamiento de 10 a 20 Å.

Los valores de RMSD de mEhCP112 presentan dos fases en la trayectoria de DM: la primera va de 0 a 250 ns, donde la proteína busca el equilibrio; y la segunda fase de 250 a 500 ns, donde el sistema muestra un proceso de equilibrio (Fig. 19D). El RG presenta una expansión de esta proteína durante los primeros 100 ns de la DM, posterior a esto se observa una disminución moderada de 150 a 200 ns, a 250ns se detecta una fase de meseta que se mantiene hasta los 400 ns y finalmente de 450 a 500 ns se muestra una disminución de los valores (Fig. 19E). En cuanto a los valores de RMSF, sugieren diferentes zonas flexibles: en la región A137-P150,

donde el desplazamiento va de 14 a 22 Å; entre los residuos R250- H287, hay un desplazamiento de 15 a 22 Å; el pico principal de fluctuación se localiza entre los residuos P290-E330, con un desplazamiento de 15-24 Å; se observa otro pico entre los residuos Y337-W350, con un desplazamiento de 15-20 Å; y la última zona de fluctuación importante se localiza entre los residuos Y360-C410, con un desplazamiento de 15-22 Å (Fig. 19F).

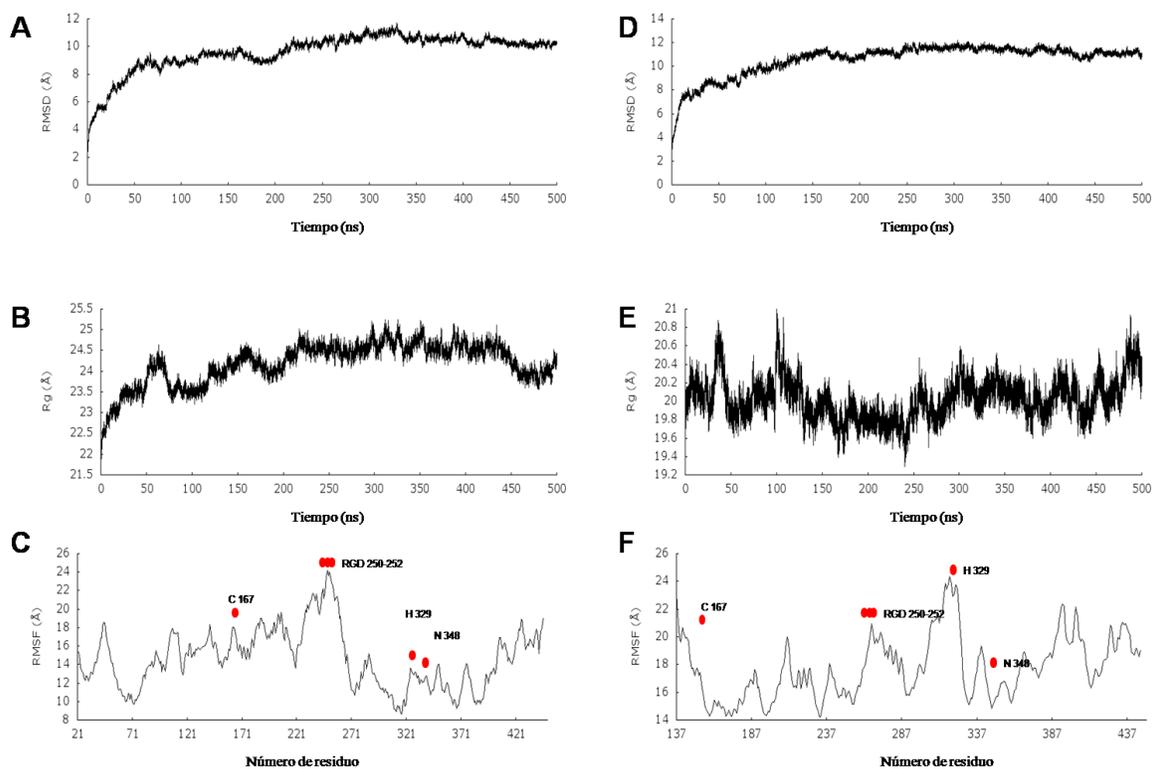


Figura 19. Análisis *in silico* de la estructural de la proteína EhCP112. La trayectoria de la DM se llevó a cabo en el programa Carma y se evaluaron los parámetros RMSD, RG y RMSF en las proteínas pEhCP112 (A-C) y mEhCP112 (D-F). El dominio RGD y la triada catalítica están marcados con puntos rojos en las gráficas de RMSF.

En el caso de EhADH, los valores de RMSD muestran que esta proteína alcanza el equilibrio a los 150 ns de la trayectoria de DM (Fig. 20A). Por su parte, el RG indica una compactación de 200 a 500 ns (Fig. 20B). En tanto que el RMSF muestra 2 regiones altamente flexibles: la primera se ubica en la región de 50 a 350 aminoácidos, la cual contiene el dominio Bro1; y la segunda región se localiza de 400 a 600aa y aquí se ubica el dominio de adhesión (Fig. 20 C).

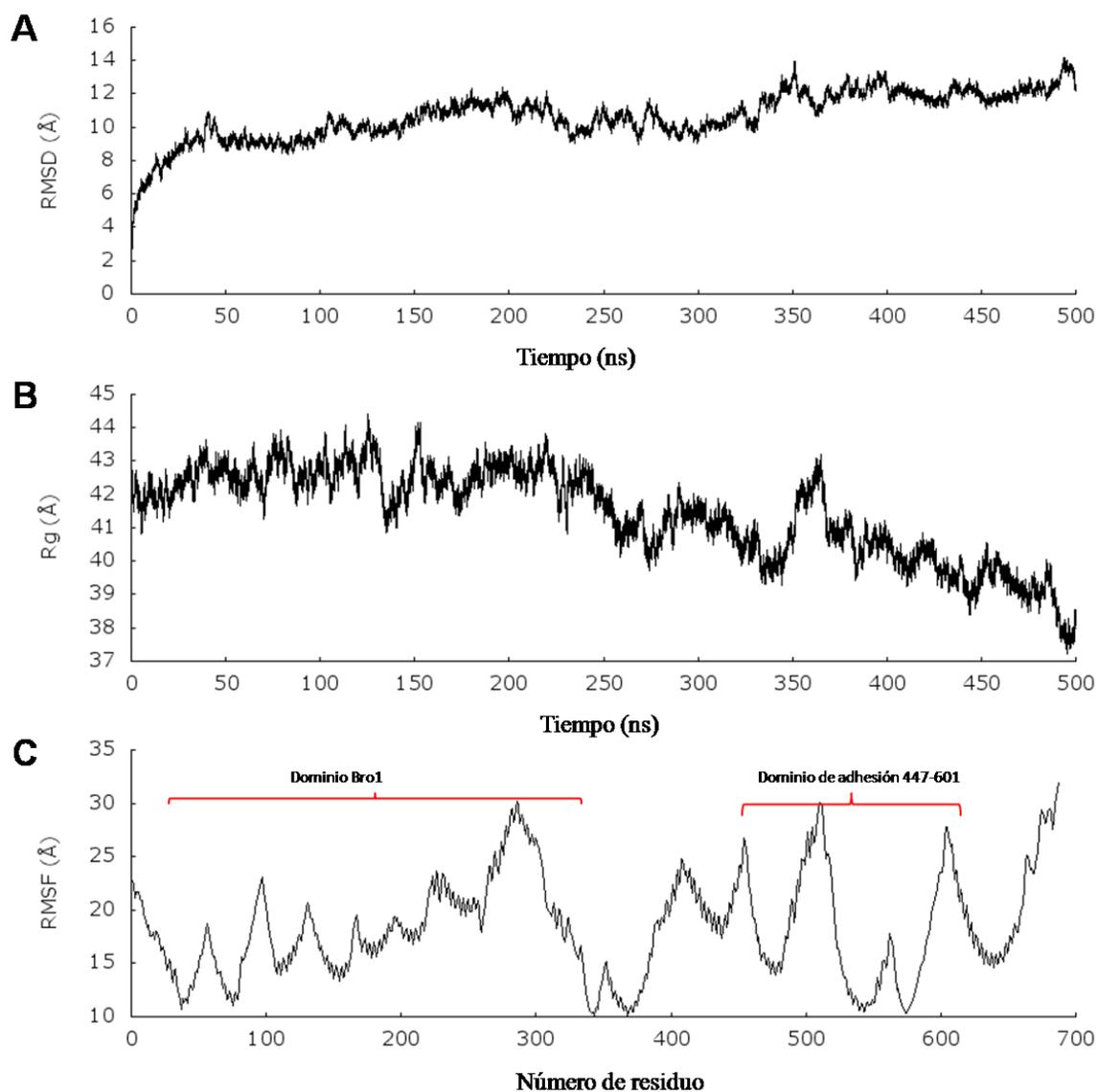


Figura 20. Análisis estructural *in silico* de la proteína EhADH. La trayectoria de la DM se llevó a cabo en el programa Carma y se evaluaron los parámetros RMSD(A), RG (B) y RMSF (C).

El RMSD de la claudina-2 muestra que esta proteína alcanza el equilibrio después de los 20 ns de DM (Fig. 21A). El RMSF señala principalmente un área de fluctuación correspondientes a la primer asa extracelular (29-81aa) que es la de mayor extensión en comparación con la segunda asa extracelular (24 aa) (Fig. 21B). En cuanto al RG no se analizó pues esta proteína es integral de la membrana y los valores de RG no son significativos.

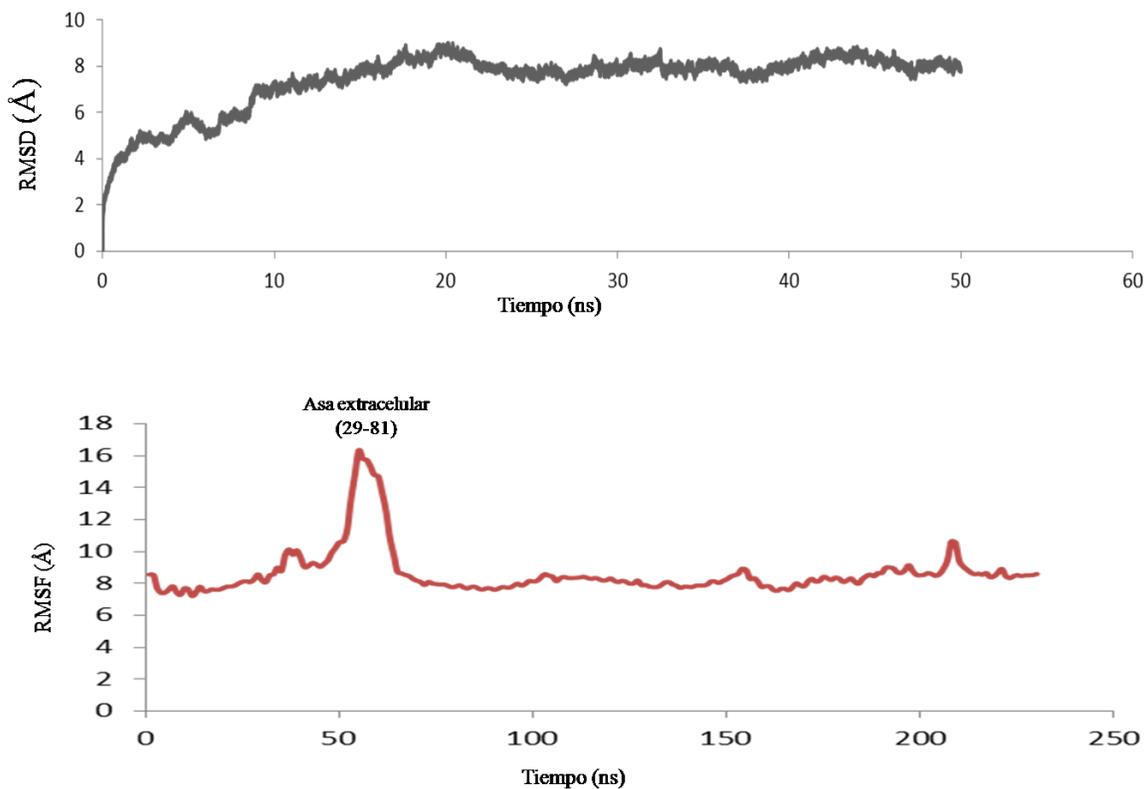


Figura 21. Análisis estructural *in silico* de la proteína claudina-2. La trayectoria de la DM se llevó a cabo en el programa Carma y se evaluaron los siguientes parámetros: RMSD (A) y RMSF (B).

14.1.6 Distancia entre los residuos catalíticos de la proteína EhCP112

Los cambios conformacionales sufridos por la proteína pEhCP112 durante el proceso de maduración podrían afectar la distancia entre los residuos que forman el sitio catalítico, afectando eventualmente la actividad enzimática. Por lo tanto, medimos la distancia entre estos aminoácidos y observamos que en pEhCP112, a 500 ns de la DM, C167 y H329 están separados por 8.52 Å, mientras que H329 y N348 presentan 6.25 Å de distancia y C167 y N348, 11.88 Å (Fig. 22A). Por su parte, en mEhCP112 estos residuos se encuentran separados por 9.20, 1.86 y 8.54 Å, respectivamente (Fig. 22B). Además se realizó la medición de las distancias en toda la trayectoria de 500 ns de DM (Fig. 23), donde se pudo observar los residuos del sitio catalítico de esta proteasa son, en general, más cercanos en la enzima madura que en la proteína que contiene el propéptido.

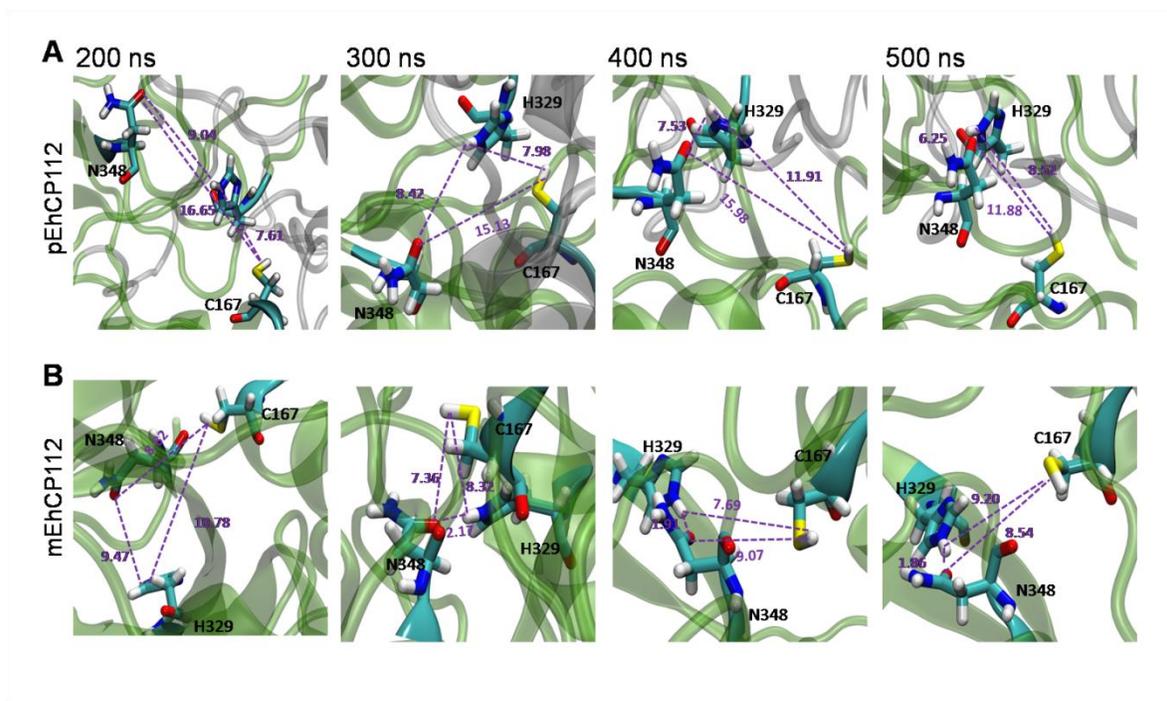


Figura 22. Distancia entre los residuos catalíticos de la proteína EhCP112. Vista estereoscópica de las distancias interatómicas entre los residuos C167, H329 y N348 de las proteínas pEhCP112 (A) y mEhCP112 (B) a 200, 300, 400 y 500 ns de DM.

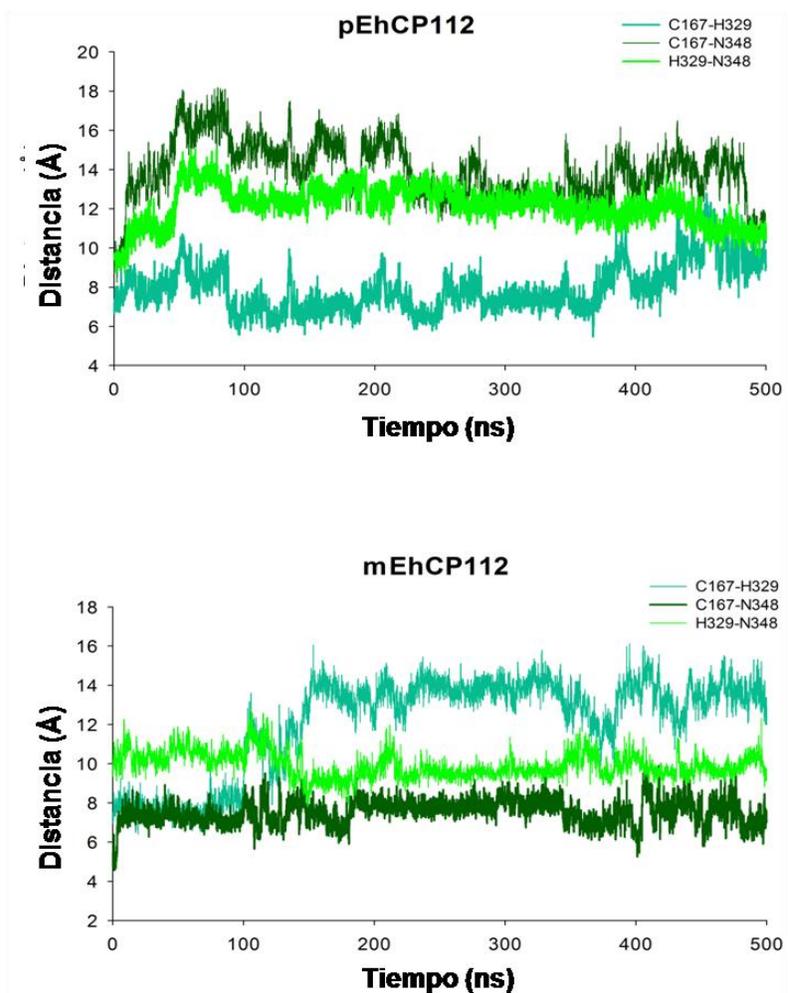


Figura 23. Distancia entre los residuos catalíticos de la proteína EhCP112. Medición de la distancia entre los residuos C167 y H329, C167 y N348 y H329 y N348 en toda la trayectoria de DM de las proteínas pEhCP112 y mEhCP112.

14.1.7. Acoplamiento molecular

Con la finalidad de conocer los sitios de unión entre las proteínas que forman los complejos pEhCPADH y mEhCPADH, una vez refinada la estructura tridimensional de pEhCP112, mEhCP112 y EhADH, se realizó un acoplamiento molecular entre las proteínas en diferentes momentos de la DM y usando el servidor ClusPro.

14.1.8. Acoplamiento molecular entre pEhCP112 y EhADH

El acoplamiento molecular de las proteínas pEhCP112 y EhADH se realizó empleando las estructuras correspondientes a 200, 300, 400 y 500 ns de la DM (Fig. 24). Los resultados muestran que a 200 ns, el complejo pEhCPADH se estabiliza por 18 puentes de hidrógeno, las distancias interatómicas oscilan entre 2.51-3.24 Å y los aminoácidos implicados en el acoplamiento se muestran en la tabla 7. A 300 ns, la unión entre estas proteínas está dada por 13 puentes de hidrógeno, en tanto que a 400 y 500 ns, se debe a 21 y 12 puentes de hidrógeno, respectivamente (Fig. 24 y tablas 8-10).

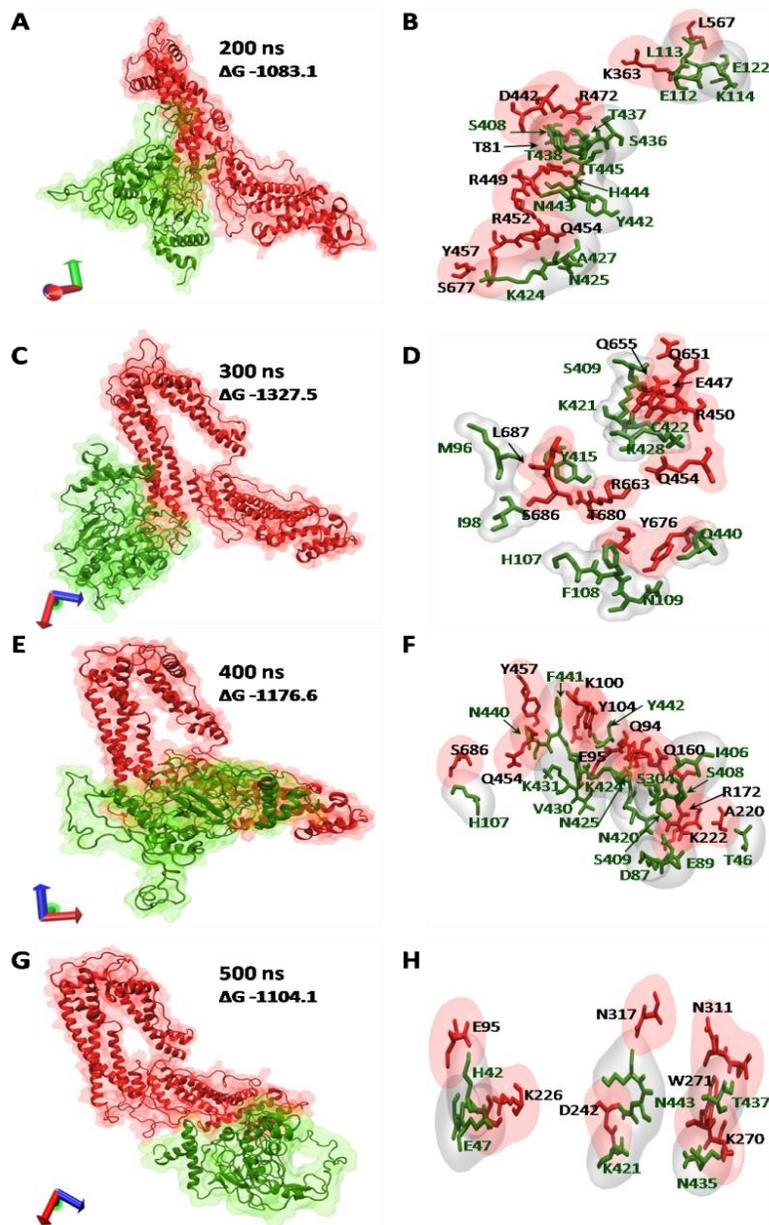


Figura 24. Acoplamiento entre las proteínas pEhCP112 y EhADH. Después de la simulación por DM, los acoplamientos entre pEhCP112 y EhADH se obtuvieron en el servidor Cluspro. (A, C, E y G) Acoplamiento proteína-proteína a 200, 300, 400 y 500 ns. pEhCP112: verde. EhADH: rojo. ΔG : energía de unión. (B, D, F y H) Residuos involucrados en la unión a 200, 300, 400 y 500 ns de la DM. Los aminoácidos en letras verdes pertenecen a pEhCP112 y en letras negras corresponden a la proteína EhADH. Ejes: X, rojo; Y, verde; Z, azul.

Tabla 7. Residuos de pEhCP112 y EhADH que participan en la formación del complejo pEhCPADH a 200 ns de DM

EhADH	pEhCP112	Distancia Å	EhADH	pEhCP112	Distancia Å
T81	S408	3.24	R452	N443	2.73
T81	N405	2.65	Q454	N425	2.72
K363	E112	2.54	Q454	A427	2.71
K363	L113	2.61	Y457	K424	2.64
K363	K114	2.64	E465	H444	2.92
D442	Y438	2.87	R472	S436	2.77
R449	Y438	3.07	R472	T437	2.67
R449	Y442	2.78	C567	E122	3.12
R449	H444	2.68	S677	K424	2.51
R449	T445				

Tabla 8. Residuos de pEhCP112 y EhADH que participan en la formación del complejo pEhCPADH a 300 ns de DM

EhADH	pEhCP112	Distancia Å	EhADH	pEhCP112	Distancia Å
E447	C422	3.06	Y676	Q440	2.81
R450	C422	2.69	Y676	F108	2.90
Q454	K428	2.61	Y676	N109	2.81
Q651	S409	2.80	T680	H107	3.30
Q655	K421	2.67	S686	I98	2.82
Q655	S409	2.97	L687	M96	2.84
R663	Y415	2.73			

Tabla 9. Residuos de pEhCP112 y EhADH que participan en la formación del complejo pEhCPADH a 400 ns de DM.

EhADH	pEhCP112	Distancia Å	EhADH	pEhCP112	Distancia Å
Q94	A427	2.80	Q160	I406	2.82
Q94	K424	3.09	S166	K424	2.67
Q94	N425	2.85	R172	D87	2.68
E95	V430	2.88	R172	N420	2.76
E95	K431	2.94	R172	E89	2.77
E95	Y442	2.85	A220	T46	2.75
K100	F441	2.78	K222	S93	3.10
Y104	I446	2.73	N454	N440	2.80
Q160	S404	3.06	Y457	F441	2.97
Q160	S408	2.75	S686	H107	2.73
Q160	S409	2.92			

Tabla 10. Residuos de pEhCP112 y EhADH que participan en la formación del complejo pEhCPADH a 500 ns de DM

EhADH	pEhCP112	Distancia Å	EhADH	pEhCP112	Distancia Å
E95	H42	2.92	K270	S436	2.64
K226	E47	2.58	W271	S436	2.67
T228	T46	2.68	W271	V439	2.74
D242	K421	2.60	N310	T437	2.68
D242	N443	2.84	N311	V439	3.14
K270	N435	2.53	N317	H444	2.94

14.1.9. Acoplamiento molecular entre mEhCP112 y EhADH

El acoplamiento molecular de las proteínas mEhCP112 y EhADH se realizó empleando las estructuras correspondientes a 200, 300, 400 y 500 ns de la DM (Fig. 25). Los resultados muestran que a 200 ns, el complejo mEhCPADH se estabiliza por 18 puentes de hidrógeno, las distancias interatómicas oscilan entre 2.51-3.16 Å y los aminoácidos implicados en el acoplamiento se muestran en la tabla 11. A 300 ns, la unión entre estas proteínas está dada por 13 puentes de hidrógeno, en tanto que a 400 y 500 ns, se debe a 21 y 12 puentes de hidrógeno, respectivamente (Fig. 25 y tablas 11-14).

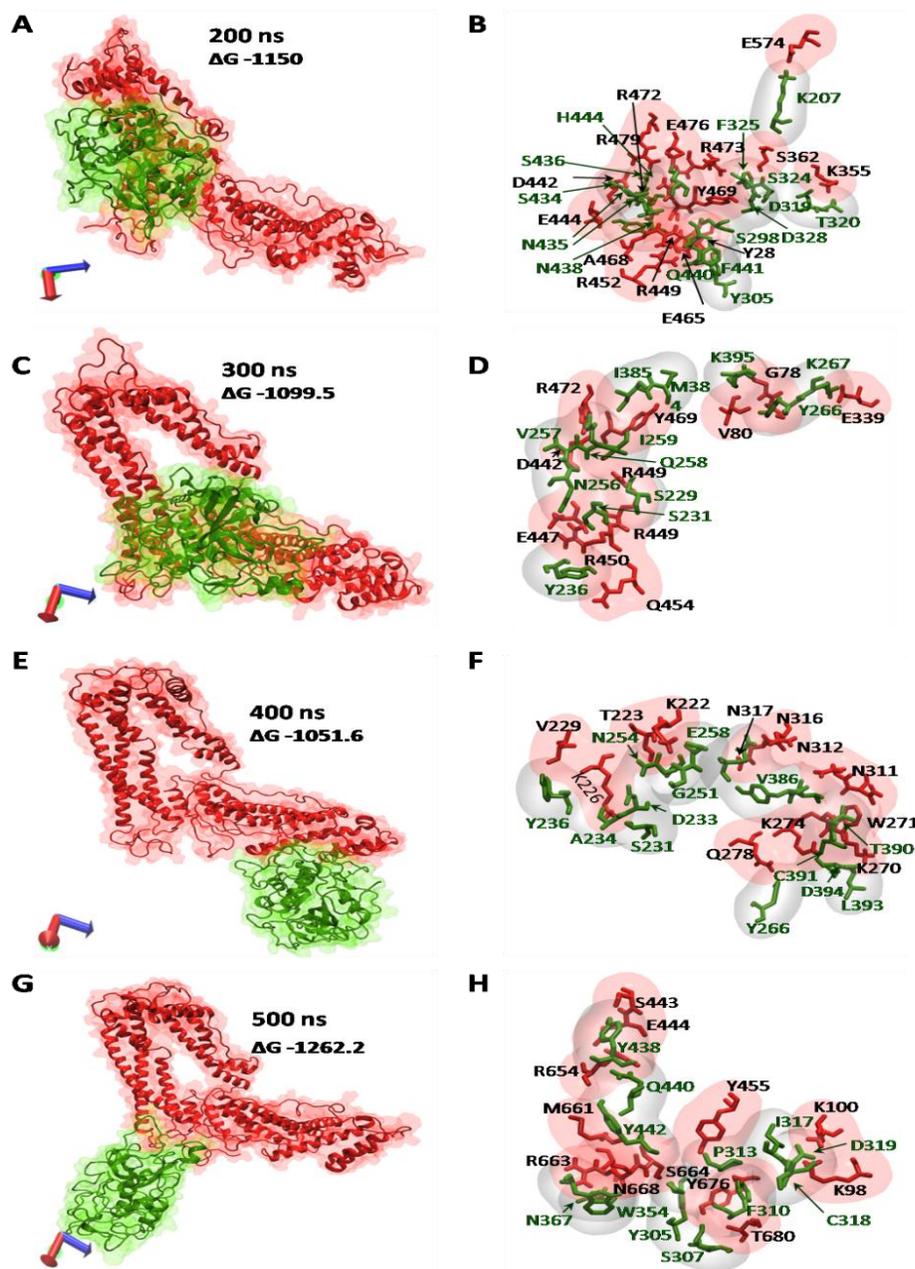


Figura 25. Acoplamiento entre las proteínas mEhCP112 y EhADH. Después de la simulación por DM, los acoplamientos entre mEhCP112 y EhADH se obtuvieron en el servidor Cluspro. (A, C, E y G) Acoplamiento proteína-proteína a 200, 300, 400 y 500 ns. mEhCP112: verde. EhADH: rojo. ΔG : energía de unión. (B, D, F y H) Residuos involucrados en la unión a 200, 300, 400 y 500 ns de la DM. Los aminoácidos en letras verdes pertenecen a mEhCP112 y en letras negras corresponden a la proteína EhADH. Ejes: X, rojo; Y, verde; Z, azul.

Tabla 11. Residuos de mEhCP112 y EhADH que participan en la formación del complejo a 200 ns de DM

EhADH	mEhCP112	Distancia Å	EhADH	mEhCP112	Distancia Å
Y28	Y305	2.74	E465	Q440	2.87
K355	D319	2.51	A468	T437	2.61
K355	T320	2.64	Y469	D328	2.87
S362	S324	2.80	R472	N435	2.69
D442	N435	2.76	R472	S434	2.67
E444	Y438	2.87	R472	H444	2.63
R449	Q440	2.75	R473	F325	2.76
R449	F441	2.61	E476	H444	3.16
R452	Q440	2.64	R479	S436	2.74
S464	Y438	2.92	E574	K207	2.55
E465	S298	2.76			

Tabla 12. Residuos de mEhCP112 y EhADH que participan en la formación del complejo a 300 ns de DM

EhADH	mEhCP112	Distancia Å	EhADH	mEhCP112	Distancia Å
S77	Y266	2.71	R449	S229	2.67
G78	Y266	2.95	R450	S231	2.77
G78	K395	2.56	Q454	Y236	2.81
V80	Y266	2.78	Y469	M384	2.93
E339	K267	2.56	Y469	I385	3.21
D442	I259	3.32	R472	V257	2.71
E447	N256	2.82	R472	Q258	2.72

Tabla 13. Residuos de mEhCP112 y EhADH que participan en la formación del complejo a 400 ns de DM

EhADH	mEhCP112	Distancia Å	EhADH	mEhCP112	Distancia Å
K222	G251	2.70	W271	C391	2.78
K222	D252	2.57	K274	D394	2.57
T223	N254	3.30	Q278	Y266	2.87
K226	S231	2.70	N311	T390	2.84
K226	D233	2.74	N312	V386	2.98
K226	A234	2.58	N312	Y387	3.21
K226	D235	2.79	N316	Q258	2.76
V229	Y236	2.79	N317	Q258	2.86
K270	L393	2.56			

Tabla 14. Residuos de mEhCP112 y EhADH que participan en la formación del complejo a 500 ns de DM

EhADH	mEhCP112	Distancia Å	EhADH	mEhCP112	Distancia Å
K98	I317	2.66	M661	Y442	2.74
K98	C318	2.87	R663	W354	2.61
K100	D319	2.60	S664	G299	2.65
S443	Y438	2.88	N668	N367	2.89
E444	Y438	3.23	Q674	Y305	3.05
R654	Y438	2.62	Y676	G308	2.92
Y455	P313	2.75	T680	F310	3.24
R654	Q440	2.79	T680	S307	2.88

14.1.10. Complementariedad entre EhCP112 y EhADH

En los complejos pEhCPADH, las distancias entre los residuos fue <3.15 Å, en tanto que en mEhCPADH fue <3.32 Å. De manera interesante, a 500 ns en la proteína

mEhCP112 se formó una cavidad en los residuos de K296 a F302, S311 a T320, W350 a G357 y Y432 a H444, en tanto que los residuos de S660 a G667 de la EhADH embonan en la proteasa (Fig. 26). Esta cavidad no se detectó en los complejos pEhCPADH. El tipo de interacciones y las distancias entre los residuos involucrados sugirió una unión complementaria entre las proteínas pEhCP112 o mEhCP112 con la EhADH; aunque, probablemente la interacción es más fuerte con la mEhCP112 debido a la formación de la cavidad.

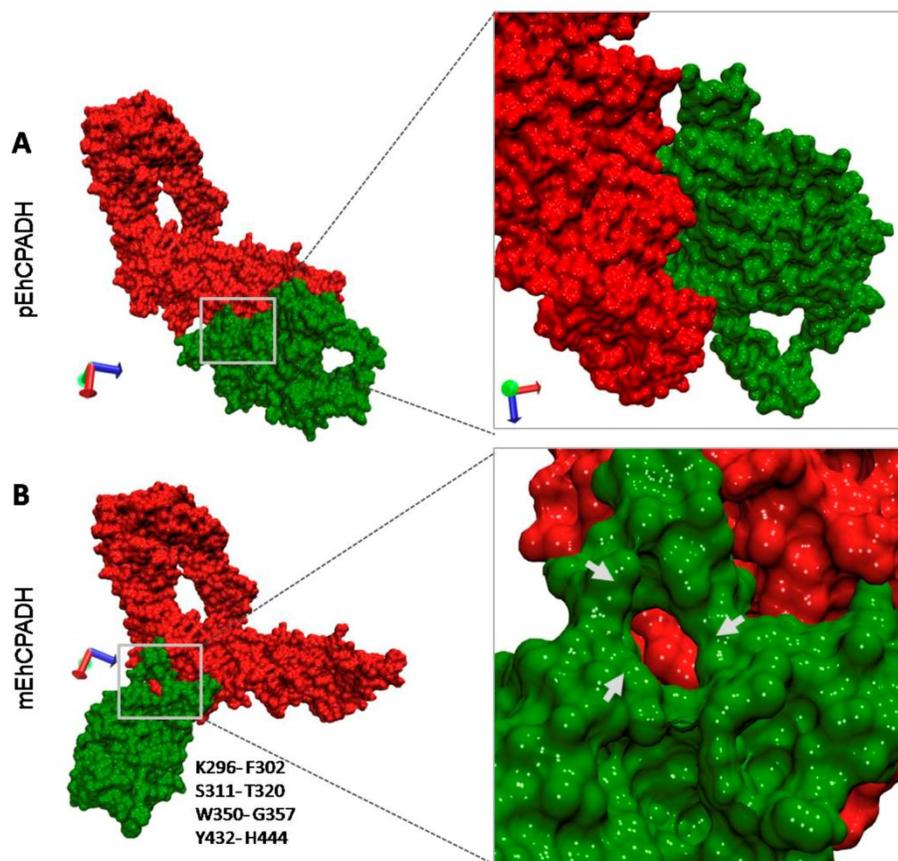


Figura 26. Modelos de superficie de los complejos pEhCPADH y mEhCPADH. Acoplamiento proteína-proteína entre pEhCP112 o mEhCP112 con EhADH a 500 ns de DM, utilizando el servidor ClusPro. (A) Unión complementaria entre pEhCP112 y EhADH. (B) Unión complementaria entre mEhCP112 y EhADH. Paneles derechos: magnificación de las áreas de interés. pEhCP112 y mEhCP112: verde. EhADH: rojo. Flechas: cavidad formada por mEhCP112 donde embona EhADH. Los residuos de mEhCP112 que forman la cavidad se indican en B. Ejes: X, rojo; Y, verde; Z, azul.

pEhCP112 se une a EhADH principalmente por dos regiones localizadas en los residuos H42 a E122 y de S404 a I446 (Fig. 27A), una de ellas está dentro del propéptido y otra está en el carboxilo terminal. Además, en dos de las conformaciones estructurales de mEhCP112, el RGD o los residuos adyacentes están involucrados en la unión con EhADH. Los residuos que forman la región catalítica en ambas formas de EhCP112 no participan en la interacción con la EhADH (Fig. 27A), sino que parecen estar cubiertos por el propéptido o por un asa que abarca los aminoácidos del A220 al I361 (Fig. 27A).

Las regiones de interacción de la proteína EhADH con pEhCP112 se localizaron en los residuos de T81 a R172, A220 a N317, D442 a Y457 y Q651 a L687 (Fig. 27B); y con mEhCP112 se localizaron principalmente de las regiones A222 a K355, D442 a R479 y Q654 a T680 (Fig. 27B). En general, ambas formas de EhCP112 se unen al dominio Bro1 (77-355aa), a residuos adyacentes al dominio de adhesión (442-472 aa) y al extremo carboxilo terminal (651-687 aa) de la EhADH (Fig. 27B).

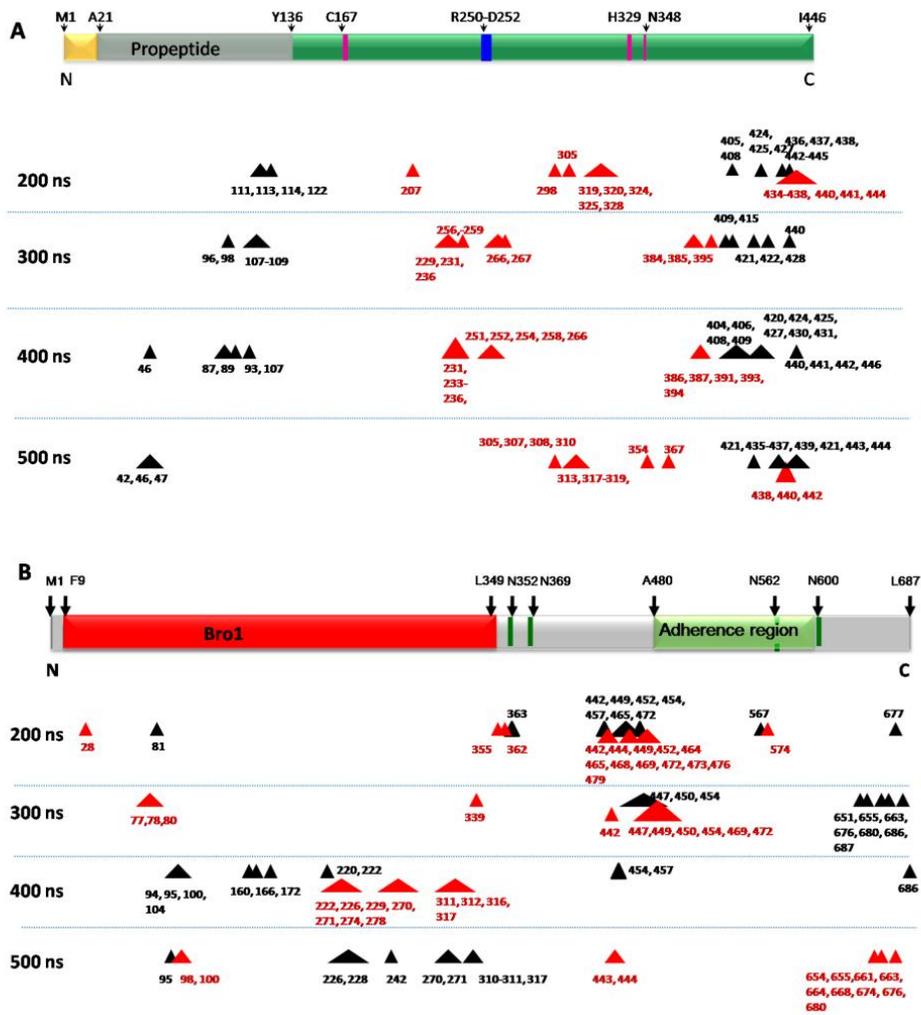


Figura 27. Representación esquemática de las regiones de interacción en los complejos pEhCPADH y mEhCPADH. (A) Representación esquemática de la estructura primaria de la proteína pEhCP112. Después de la DM, los modelos del acoplamiento molecular a 200, 300, 400 y 500 ns se analizaron para revelar los residuos de pEhCP112 y mEhCP112 involucrados en la asociación con EhADH. Números y triángulos en negro o rojo: residuos de pEhCP112 o mEhCP112, respectivamente, que interactúan con EhADH. (B) Representación esquemática de la estructura primaria de la proteína EhADH. Después de la DM, los modelos del acoplamiento molecular a 200, 300, 400 y 500 ns se analizaron para revelar los residuos de EhADH involucrados en la asociación con pEhCP112 y mEhCP112. Números y triángulos en negro: residuos de EhADH que interactúan con pEhCP112. Números y triángulos en rojo: residuos de EhADH que interactúan con mEhCP112. Ejes: X, rojo; Y, verde; Z, azul.

Los modelos obtenidos sobre los acoplamientos moleculares entre pEhCP112 o mEhCP112 con EhADH predicen diferentes conformaciones del complejo heterodimérico y la asociación entre estas proteínas por distintas regiones.

14.1.11. Acoplamiento molecular entre las proteínas mEhCP112 y claudina-2

Con la finalidad de conocer si las proteínas EhCP112 y EhADH se pueden unir de manera directa con la proteína epitelial de la UE claudina-2, se realizó un acoplamiento molecular en el servidor ClusPro. Una vez que la DM mostró que estabilidad en las proteínas, se analizaron los acoplamientos a 500 ns para mEhCP112 y EhADH y a 100 ns para la claudina-2.

Se sabe que las claudinas se homo- y heterodimerizan con ellas mismas o con otros miembros de la familia de la claudinas en las UE de células adyacentes. Por lo tanto, antes de realizar el acoplamiento molecular de la claudina-2 con las proteínas amibianas, se realizó un acoplamiento molecular entre dos moléculas de claudina-2 para tratar de simular las condiciones estructurales a las que se enfrentarían EhCP112 y EhADH en el epitelio intestinal.

La interacción claudina-2-claudina-2 se lleva a cabo por sus dos asas extracelulares, mediante 16 puentes de hidrógeno, con una distancia menor a 6.0\AA (Tabla 15). Cuando se añaden las proteínas amibianas, los resultados sugieren que las proteínas mEhCP112 y EhADH se unen con las asas extracelulares de la claudina-2 (Fig. 28). En el caso de la asociación entre mEhCP112 y claudina-2, la

proteasa mediante su región carboxilo terminal se une a la primer asa extracelular de la claudina-2, a través de 21 puentes de hidrógeno con una distancia menor a 6.22 Å (Fig. 28 y tabla 16).

Tabla 15. Residuos de la claudina-2 (CI-2) que participan en la formación del homodímero a 100 ns de DM.

CI-2	CI-2	Distancia Å	CI-2	CI-2	Distancia Å
L151	S29	3.04	K157	T62	2.57
S33	R31	2.83	K157	D76	2.97
D76	R31	3.13	R31	D76	2.69
A55	T42	3.00	G60	K157	2.59
E53	A43	3.03	I61	K157	2.55
L50	G45	3.32	T56	Y165	2.66
S47	L50	2.64	H57	Y165	2.81
V44	E53	2.87	F46	E53	3.21

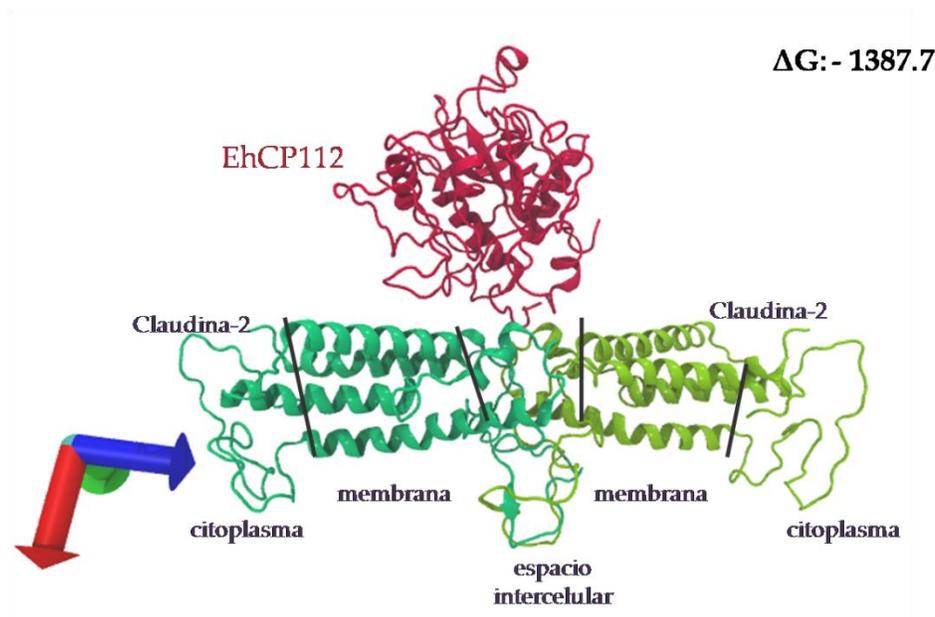


Figura 28. Acoplamiento molecular de las proteínas mEhCP112 y claudina-2. Después de la DM, los acoplamientos entre mEhCP112 (500 ns) y claudina-2-claudina-2 (100 ns) se obtuvieron en el servidor Cluspro. ΔG : energía de unión. Claudina-2: verde y azul. mEhCP112: rojo. Ejes: X, rojo; Y, verde; Z, azul.

Tabla 16. Residuos de la claudina-2 (CI-2) que participan en la asociación con mEhCP112.

mEhCP112	CI-2	Distancia Å	mEhCP112	CI-2	Distancia Å
Y148	I 310	4.30	T 301	Y 148	4.42
N 253	A 79	6.22	Q 304	F 147	4.41
T 254	F 147	4.0	Q 304	F 147	4.49
T 301	Y 48	4.52	Y 306	Q 78	3.44
T 309	L 151	5.03	Y 306	F 147	3.43
N 307	P 150	5.65	Y 306	W 30	3.59
N 307	F 147	3.84	Y 306	W 30	4.14
N 307	F 147	3.59	N 307	R 31	4.07
T 309	S 149	2.73	N 307	R 31	5.90
I 310	S149	2.23	S 308	Y 148	5.47
I 310	Y 148	3.93	T 301	Y 148	4.42
Y 148	I 310	4.30			

14.1.12 Acoplamiento molecular entre las proteínas EhADH y claudina-2

En el caso de la asociación entre EhADH y claudina-2, la adhesina mediante el dominio Bro1 se une a la región extracelular de la claudina-2 (30-150), a través de 24 puentes de hidrógeno con una distancia menor a 6.8 Å (Fig. 29 y tabla 17).

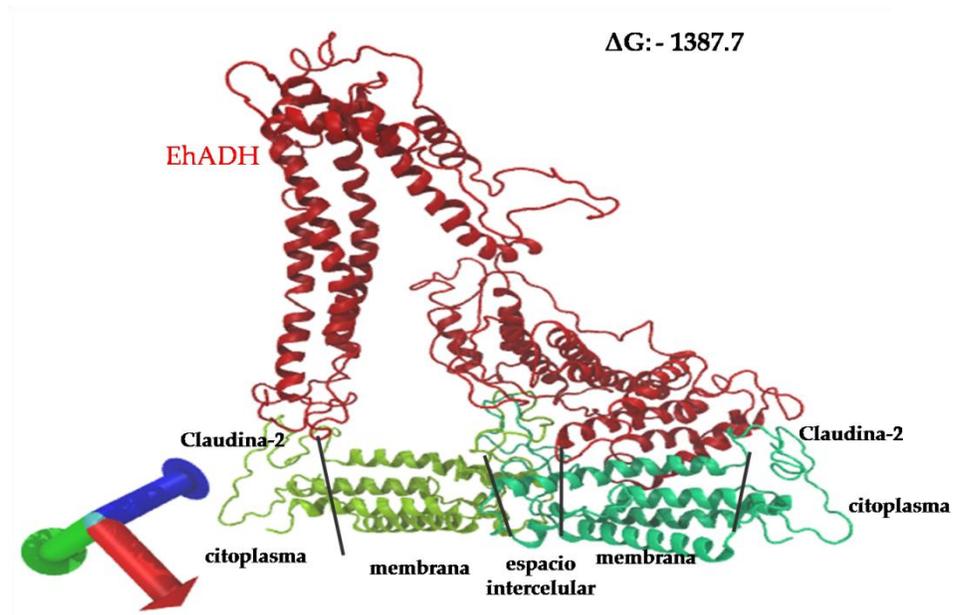


Figura 29. Acoplamiento molecular entre las proteínas EhADH y claudina-2. Después de la DM, los acoplamientos entre EhADH (500 ns) y claudina-2-claudina-2 (100 ns) se obtuvieron en el servidor Cluspro. ΔG : energía de unión. Claudina-2: verde y azul. EhADH: rojo. Ejes: X, rojo; Y, verde; Z, azul.

Tabla 17. Residuos de la claudina-2 (CI-2) que interaccionan con la EhADH

EhADH	CI-2	Distancia Å	EhADH	CI-2	Distancia Å
P10	C 54	5.63	P 13	G 45	4.05
P10	L 50	5.98	P13	E 13	4.77
V11	E 53	4.41	F 46	M14	5.51
Q 60	F46	3.71	S47	G49	3.73
Q 57	F 46	6.8	E 57	K 48	3.73
C 59	S47	4.56	P58	S47	5.85
Q 60	K 48	3.50	C59	S47	5.24
L 62	K 48	5.46	Y91	V44	6.73
Y 92	T 56	3.52	S128	W 51	4.37
L93	T59	6.3	N232	V41	4.21
S 127	G49	3.59	S235	L 71	5.7
F129	K 48	3.46	K 289	L70	5.52

14.2. Resultados experimentales

14.2.1. Localización de las proteínas EhCP112 y EhADH en trofozoítos de *E.*

histolytica

Previamente en nuestro grupo de trabajo demostramos la expresión del complejo EhCPADH en trofozoítos de *E. histolytica*, usando anticuerpos que reconocen este complejo (García-Rivera et al., 1999). Sin embargo, este anticuerpo no discrimina entre las dos proteínas que forman el complejo. Por lo tanto, para conocer la localización de las proteínas EhCP112 y EhADH en los trofozoítos, realizamos ensayos de inmunofluorescencia empleando anticuerpos específicos para cada una de las proteínas. Las imágenes de microscopía confocal revelaron que ambas proteínas co-localizaron tanto en el citoplasma como en la membrana de los

trofozoítos (Fig. 30A). Al cuantificar estas co-localizaciones, el coeficiente de Pearson (PC) indica un valor de co-localización de 0.4 y 0.6 de EhCP112 y EhADH, en la célula completa y en la membrana plasmática, respectivamente (Fig. 30B). Estos resultados sugieren que ambas proteínas comparten la misma localización, principalmente en la membrana plasmática de los trofozoítos. Estas proteínas también se encuentran separadas, es decir no formando parte del complejo. Estos resultados sugieren que las proteínas EhCP112 y EhADH tienen funciones de manera independiente y formando parte del complejo EhCPADH.

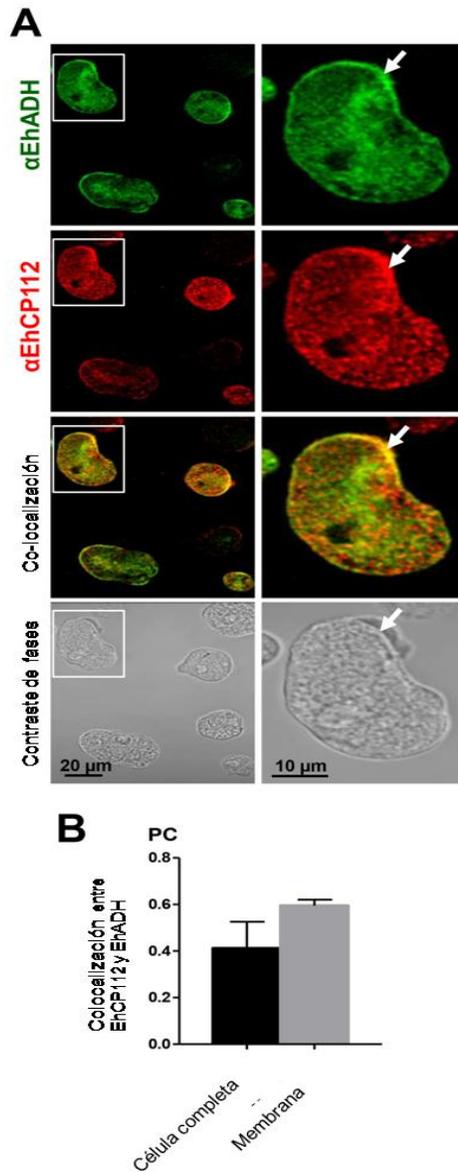


Figura 30. Localización de EhADH y EhCP112 en trofozoítos de *E. histolytica*, mediante microscopía confocal. Los trofozoítos se fijaron, permeabilizaron e incubaron con los anticuerpos de ratón α -EhADH y de conejo α -EhCP112, seguido por la incubación con los anticuerpos secundarios α -ratón acoplado a FITC y α -conejo acoplado a TRITC, respectivamente. (A) Paneles derechos: ampliación de los insertos de los paneles izquierdos. Flechas: co-localización en la membrana plasmática. (B) Coeficiente de Pearson (PC) que cuantifica la co-localización de ambas proteínas. Los valores representan la media \pm el error estándar de 12-25 células analizadas.

Para corroborar la localización de EhCP112 y EhADH, utilizamos otra estrategia experimental. A través de MET, usando anticuerpos secundarios acoplados a oro coloidal, se observaron ambas proteínas por separado y formando parte del complejo EhCPADH en la membrana plasmática, en el citoplasma, en la membrana y dentro de vesículas (Fig. 31B-F). Además, ambas proteínas se detectaron fuera de los trofozoítos, sugiriendo que fueron secretadas, como se ha reportado anteriormente (Ocadiz et al., 2005). La proporción entre las partículas de EhCP112 y EhADH fue de 18:1; y una de cada seis partículas de EhADH pareció interactuar con una partícula de EhCP112 para formar el complejo EhCPADH. Ambas proteínas presentaron una distribución similar aproximadamente 12-18% de las moléculas totales se localizaron en la membrana plasmática, 15-25% en la membrana de las vesículas, 34-40% en el citoplasma, 15% dentro de las vesículas y 12-15% en el espacio extracelular. En contraste, 24% del complejo EhCPADH se localizó en la membrana plasmática, 17% en la membrana de las vesículas, 10% en el citoplasma, 4% dentro de las vesículas y 12% en el espacio extracelular (Fig. 31G-I). La detección de EhCP112, EhADH y EhCPADH en las membranas usando anticuerpos independientes, confirmó los modelos obtenidos con la base de datos OPM, la cual predice que estas proteínas son moléculas periféricas de membrana.

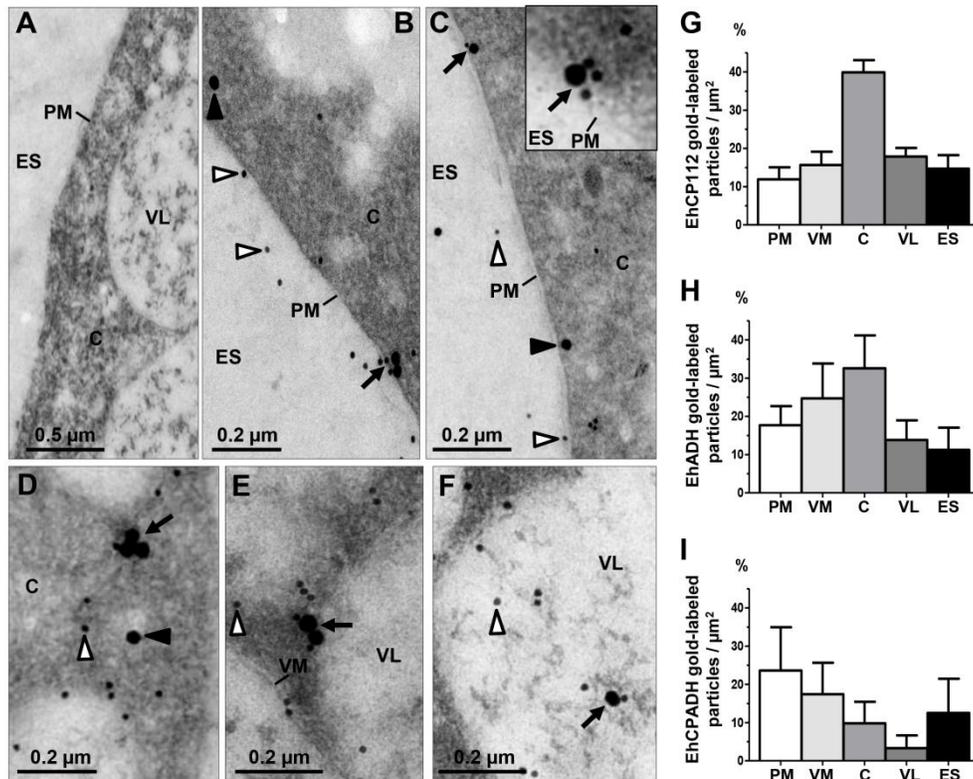


Figura 31. Localización de EhADH, EhCP112 y EhCPADH en trofozoítos de *E. histolytica*, mediante MET. Secciones finas de trofozoítos se incubaron con los anticuerpos α -EhCP112 y α -EhADH, seguido por la incubación con los anticuerpos secundarios acoplados a oro de 15 y 30 nm, respectivamente. (A) Trofozoítos control incubados únicamente con los anticuerpos secundarios. (B-F) Localización de EhCP112, EhADH y EhCPADH en la membrana plasmática (MP), citoplasma (C), membrana de las vesículas (MV), lumen de las vesículas (LV) y en el espacio extracelular (EE). Flechas: complejo EhCPADH. Cabezas de flechas blancas: EhCP112. Cabezas de flechas negras: EhADH. (G-I) Cuantificación de partículas de oro que marcan a las proteínas EhCP112 (G), EhADH (H) y EhCPADH (I) en $180 \mu\text{m}^2$ de 30 imágenes de MET. En cada imagen se tomó como 100%, el total de partículas para cada proteína.

14.2.2. Asociación entre EhCP112 y EhADH

Ensayos de inmunoprecipitación

La presencia del complejo EhCPADH en trofozoítos sugiere la asociación entre las proteínas EhCP112 y EhADH. Para demostrar experimentalmente esta interacción, en lisados de trofozoítos realizamos ensayos de inmunoprecipitación usando el anticuerpo α -EhADH y mediante western blot con el mismo anticuerpo, encontramos una banda de 124 kDa, que corresponde al peso molecular reportado para el complejo EhCPADH y otra banda de 75 kDa que es el peso de EhADH (Fig. 32A). Como control utilizamos suero pre-inmune de conejo para realizar los inmunoprecipitados, pero no se observó la detección de bandas en el peso del complejo o de las proteínas EhADH o EhCP112. Por otra parte, en el inmunoprecipitado con el anticuerpo α -EhADH, pero no con el suero pre-inmune, el anticuerpo α -EhCP112 reconoció a la proteína pEhCP112 libre, pero no al complejo (Fig. 32B). Esto se puede deber a que el anticuerpo α -EhCP112 está dirigido contra un epítipo que quizá está inaccesible cuando pEhCP112 interacciona con EhADH para formar el complejo pEhCPADH, como se puede observar en el acoplamiento molecular entre pEhCP112 y EhADH, realizado a 500 ns (Fig. 32C-F).

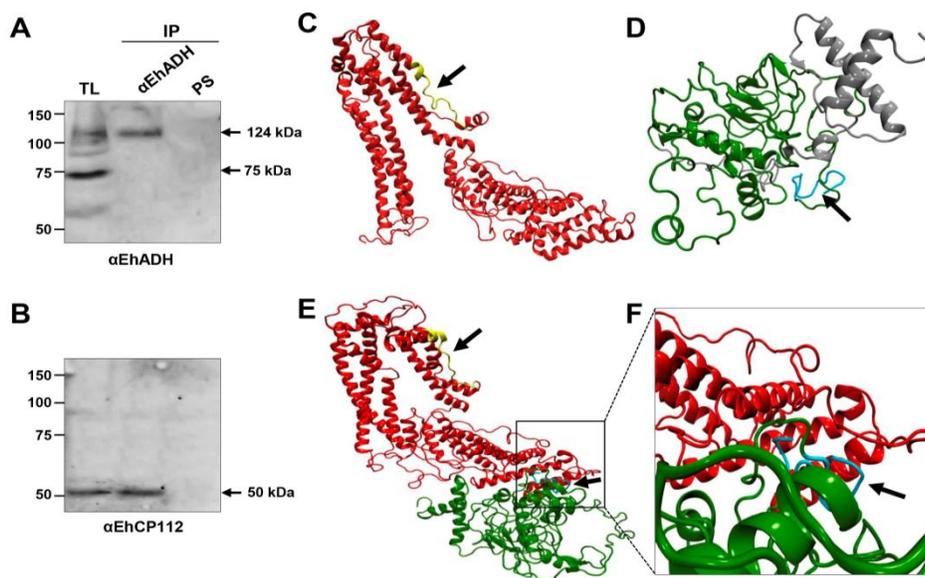


Figura 32. Inmunoprecipitación de EhCP112, EhADH y EhCPADH, en trofozoítos de *E. histolytica*. A) Ensayos de inmunoprecipitación (IP) realizados en lisados de trofozoítos (LT), usando el anticuerpo α -EhADH o suero pre-inmune (SP) se sometieron a experimentos de western blot empleando los anticuerpos α -EhADH (A) α EhCP112 (B). (C, D) Modelos 3D obtenidos con el servidor I-TASSER de las proteínas EhADH (C) y pEhCP112 (D), donde se muestra la localización de los péptidos usados para producir los anticuerpos de conejo α -EhADH y α -EhCP112, respectivamente. (E) Acoplamiento molecular entre las proteínas EhADH y pEhCP112 a 500 ns de DM. Flechas: péptido en amarillo de EhADH y péptido en azul de pEhCP112. (F) Amplificación de la zona de interacción entre ambas proteínas, donde se observa escondido el péptido de pEhCP112.

14.2.3. Estudios de RPS

Otra manera de demostrar la asociación entre las proteínas EhCP112 y EhADH es mediante la técnica de resonancia de plasmón superficial (RPS), para lo cual se requirió de la purificación de las proteínas recombinantes pEhCP112 y EhADH.

14.2.4. Purificación de la proteína recombinante His-pEhCP112

La proteína His-pEhCP112 se produjo en bacterias *E. coli* transformadas con el plásmido *pQE80L-ppEhcp112* (Quintas-Granado et al., 2009). En la figura 33 se puede observar la purificación de esta proteína, mediante una columna de Níquel (Fig. 33A), su reconocimiento con el anticuerpo contra la etiqueta de histidinas (Fig. 33B) y la demostración de que esta proteína cuando se activa con 10 mM de DTT, presenta actividad enzimática al digerir un sustrato de gelatina (Fig. 33C).

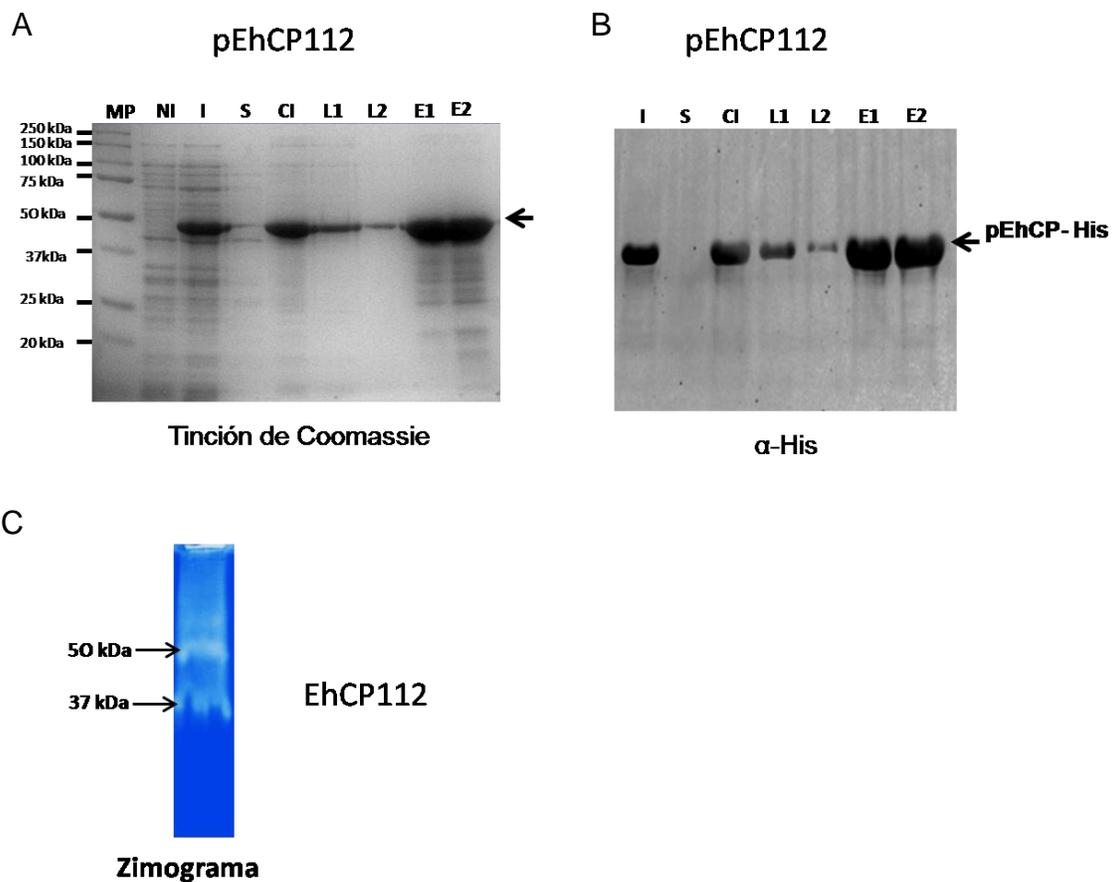


Figura 33. Purificación y actividad enzimática de la proteína EhCP112. Bacterias *E. coli* C43 se transformaron con el plásmido *pQE80L-ppEhcp112* y la producción de la proteína recombinante His-pEhCP112 se indujo con 0.5 mM de IPTG por 18 h. (A) Durante el proceso de purificación de la proteína recombinante mediante columnas de Níquel, las diferentes fracciones se analizaron mediante SDS-PAGE y el gel se tiñió con Azul de Coomassie. (B) Las mismas fracciones se analizaron mediante western blot usando el anticuerpo α -His. (C) La proteína purificada His-pEhCP112 se activó con 10 mM de DTT y se corrió en geles de sustrato o zimogramas. MP: marcadores de peso molecular. NI: bacterias no inducidas. I: bacterias inducidas. S: fracción soluble. CI: cuerpos de inclusión. L1, L2: lavados de los cuerpos de inclusión. E1, E2: eluciones.

14.2.5. Generación y purificación de la proteína recombinante His-EhADH

En el caso de la proteína recombinante His-EhADH, en primer lugar se generó la construcción *pCold-1-Ehadh* como se mencionó en la sección de Materiales y Métodos. El gen completo *Ehadh* se clonó en el vector *pCold-1* (Fig. 33A) en los sitios de restricción *HindIII* y *KpnI*. La comprobación de la inserción correcta del gen se llevó a cabo mediante análisis por digestión enzimática del plásmido *pCold-1-Ehadh* y los resultados muestran la liberación de un inserto de ~2000 pb, correspondiente al gen completo *Ehadh* (Fig. 34B). Además, mediante PCR y con iniciadores específicos se amplificó el gen completo *Ehadh* de este plásmido (Fig. 34B). Posteriormente, el plásmido *pCold-1-Ehadh* se transformó en bacterias *E. coli* C43 y la expresión de la proteína recombinante His-EhADH se indujo con IPTG. La purificación de la proteína se verificó en geles teñidos con azul de Coomassie (Fig. 34C y D) y mediante análisis por western blot, usando el anticuerpo α -histidinas (Fig. 34E). Para corroborar la identidad de la proteína recombinante His-EhADH, se llevó a cabo un análisis peptídico por LCM-SMS (Fig. 35).

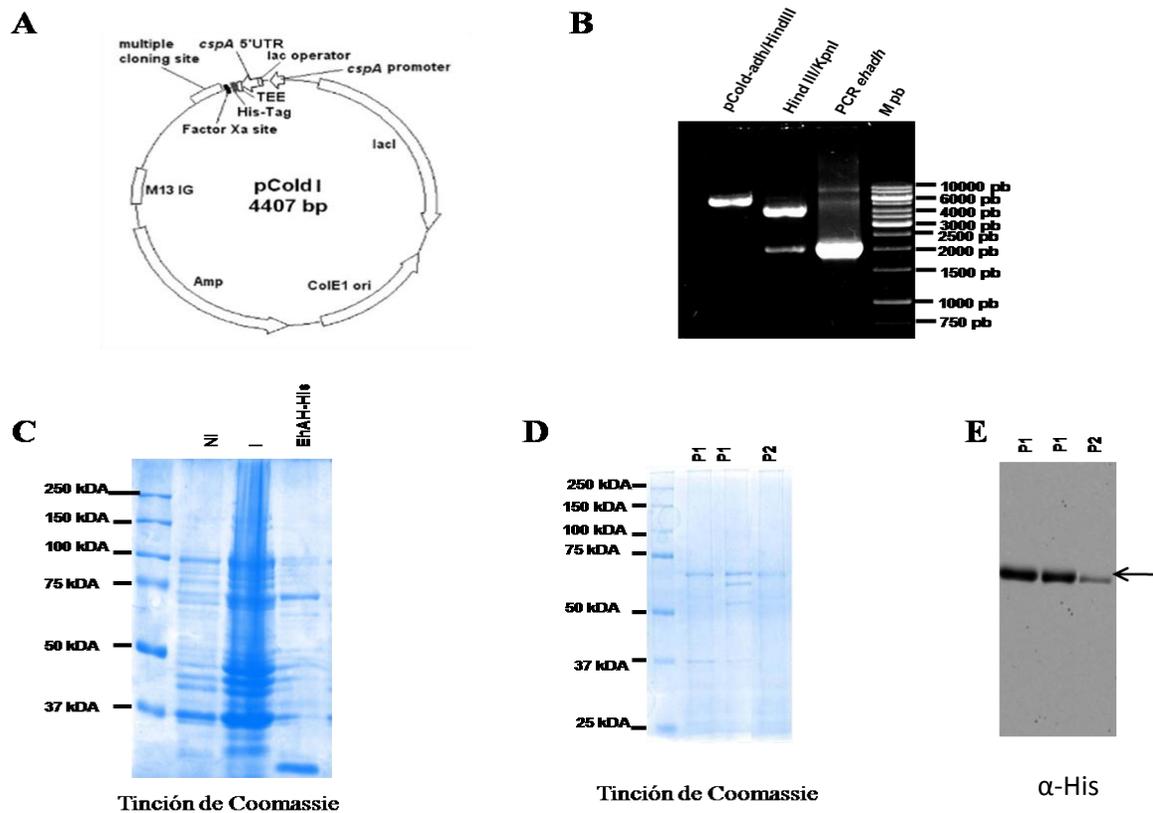


Figura 34. Generación de la construcción *pCold-1-Ehadh* y purificación de la proteína His-EhADH. A) Mapa del vector. B) El gen completo *Ehadh* se clonó en el plásmido *pCOLD-1* y la construcción *pCold-1-Ehadh* se digirió con la enzima *HindIII* o con *HindIII* y *KpnI*. Adicionalmente, el gen *Ehadh* (2064pb) se amplificó de este plásmido usando iniciadores específicos. Estos productos se corrieron en un gel de agarosa al 1%. Mpb: marcadores moleculares de pares de bases. C) El plásmido *pCold-1-Ehadh* se transformó en bacterias *E. coli* DH5 α y la expresión de la proteína recombinante His-EhADH se indujo con 0.5mM de IPTG. Las bacterias lisadas se analizaron por SDS-PAGE y los geles se tiñieron con Azul de Coomassie. D) La proteína His-EhADH fue concentrada en columnas de centricon de 50 kDa para eliminar las bandas de menor peso molecular. E) Análisis de la identidad de la expresión y purificación de la proteína recombinante mediante ensayos de western blot utilizando el anticuerpo α -histidinas. NI: bacterias no inducidas. I: bacterias inducidas. P: His-EhADH purificada.

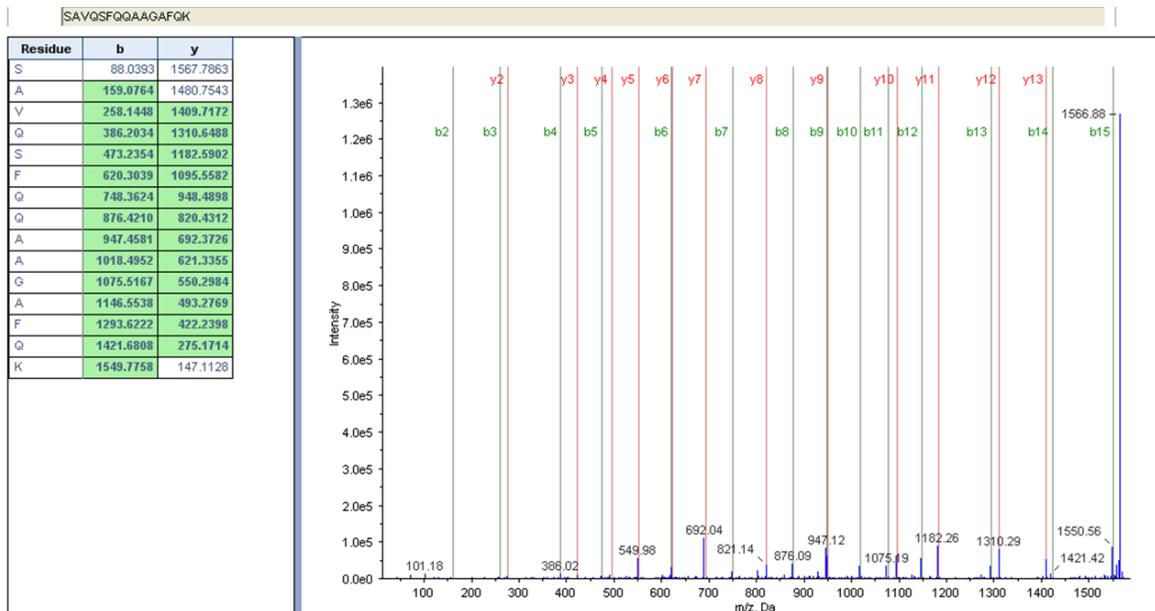


Figura 35. Espectro de masas correspondiente al péptido SAVQSFQQAAGAFQK de la proteína EhADH.

14.2.6. Cinética de unión entre las proteínas pEhCP112 y EhADH

La proteína His-pEhCP112 se unió al sensor CM5 y se optimizó el tipo de amortiguador de unión y la cantidad mínima de proteína necesaria para realizar la cinética de unión (Fig. 36). El amortiguador de unión que probamos fue el acetato de sodio 10 mM a diferentes pHs, a 4.0, 4.5, 5.0 y 5.5. Decidimos emplear el acetato de sodio 10 mM pH 4, por que fue el que mostró mejor respuesta de unión y al despegar la muestra el sistema regresó a la línea basal, indicando que no quedaron residuos de impurezas en el sensor.

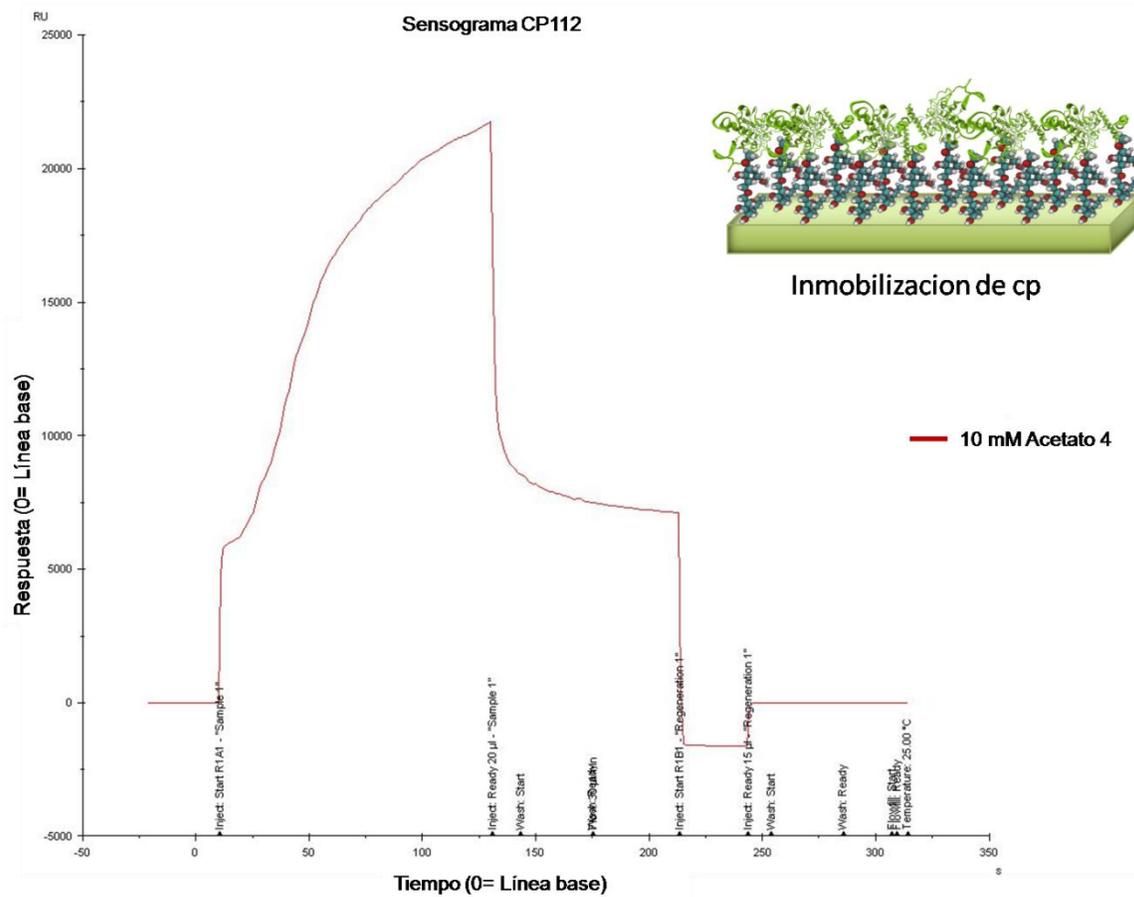


Figura 36. Inmovilización de la proteína His-pEhCP112 al sensor CM5. El amortiguador de unión empleado fue acetato de sodio 10mMpH 4.0 y la concentración de la proteína recombinante usada fue de 0.5 mg/ml.

Una vez inmovilizada la proteína His-pEhCP112 al sensor CM5, se realizó el análisis de unión del analito, que en este caso fue la proteína His-EhADH. Las concentraciones de His-EhADH que se adicionaron durante 4 min fueron de 19.12, 38.25, 76.5, 143 y 286 nM. Los resultados muestran que His-EhADH, en todas las concentraciones empleadas, se une a His-pEhCP112 (Fig. 37). Este tipo de ensayos se llevó a cabo por triplicado. Estas cinética de unión arrojaron una constante de asociación (K_a) de 6.7×10^{-3} y una constante de disociación (K_d) de 4.24×10^{-7} entre ambas proteínas.

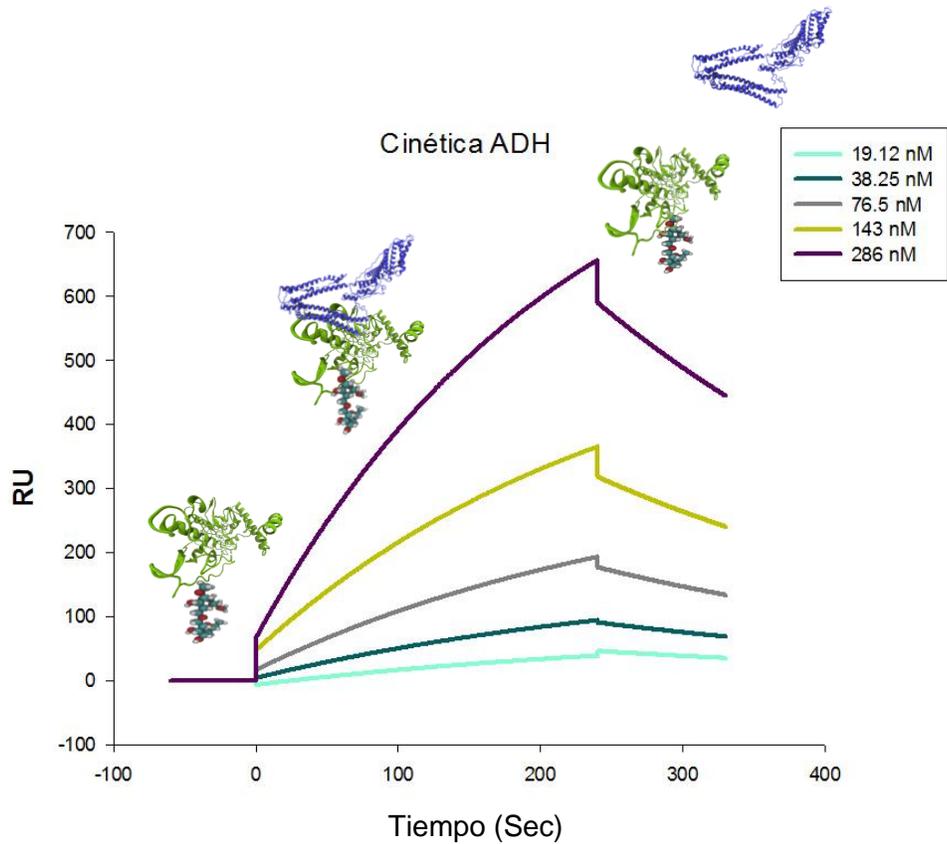


Figura 37. Cinética de unión entre His-EhCP112 y His-EhADH. A la proteína His-EhCP112 inmovilizada en el sensor CM5 se le añadió la proteína His-EhADH (286 nM) durante 3 min. RU: unidades de resonancia. Ensayo representativo de 3 experimentos independientes.

Como control negativo de unión se utilizó una proteína no relacionada, en este caso la enzima glutatión acetil S-transferasa (GST). La proteína GST es codificada por el plásmido *pGEX* (Fig. 38A) y se sabe que esta enzima es soluble, por lo tanto el proceso de purificación se realizó fácilmente con la metodología recomendada por el fabricante, como se describió en Materiales y Métodos. La proteína GST expresada y purificada, se identificó por western blot empleando el anticuerpo α -GST (Fig. 38B, C).

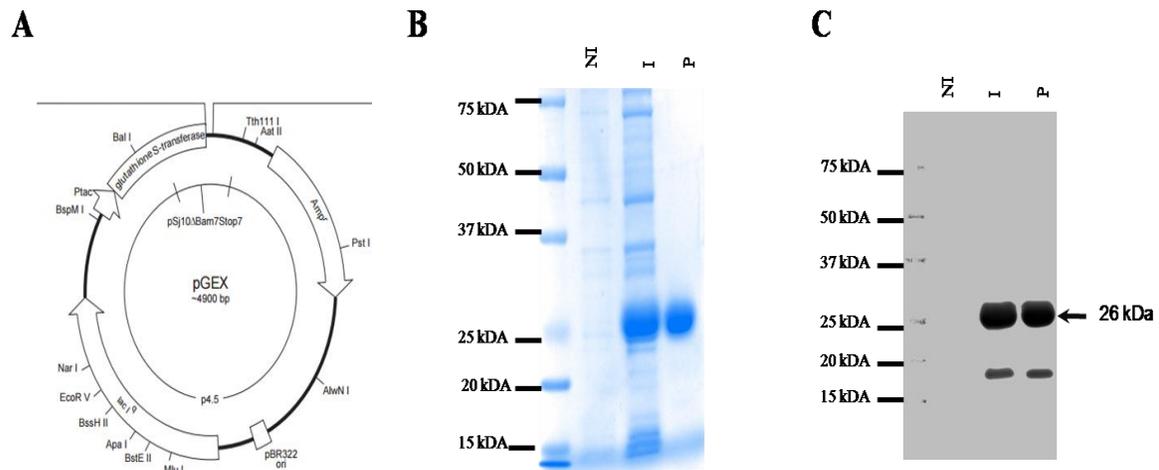


Figura 38. Purificación de la proteína GST. A) Mapa del plásmido *pGEX* que contiene la secuencia que codifica para la proteína GST. B) El plásmido *pGEX* se transformó en bacterias *E. coli* DH5 α y se indujo la expresión de la proteína GST con 0.5 mM de IPTG. La proteína GST se purificó en el equipo FPLC. Las bacterias se lisaron y la proteína purificada se analizaron por SDS-PAGE y el gel se tiñó con azul de Coomassie. C) La identidad de la proteína purificada GST se analizó en ensayos de western blot empleando el anticuerpo α -GST. NI: bacterias no inducidas. I: bacterias inducidas. P: GST purificada.

Entonces a la proteína His-pEhCP112 inmovilizada en el sensor CM5, se le añadió el analito GST (560 nM) a una concentración del doble que el analito EhADH (Fig. 39). El análisis de RPS para las proteínas His-pEhCP112 y GST dio una respuesta negativa de unión, ya que solo se observó un pico durante el tiempo de interacción, que pudo ser causado por el cambio de pH durante el proceso de regeneración del sensor.

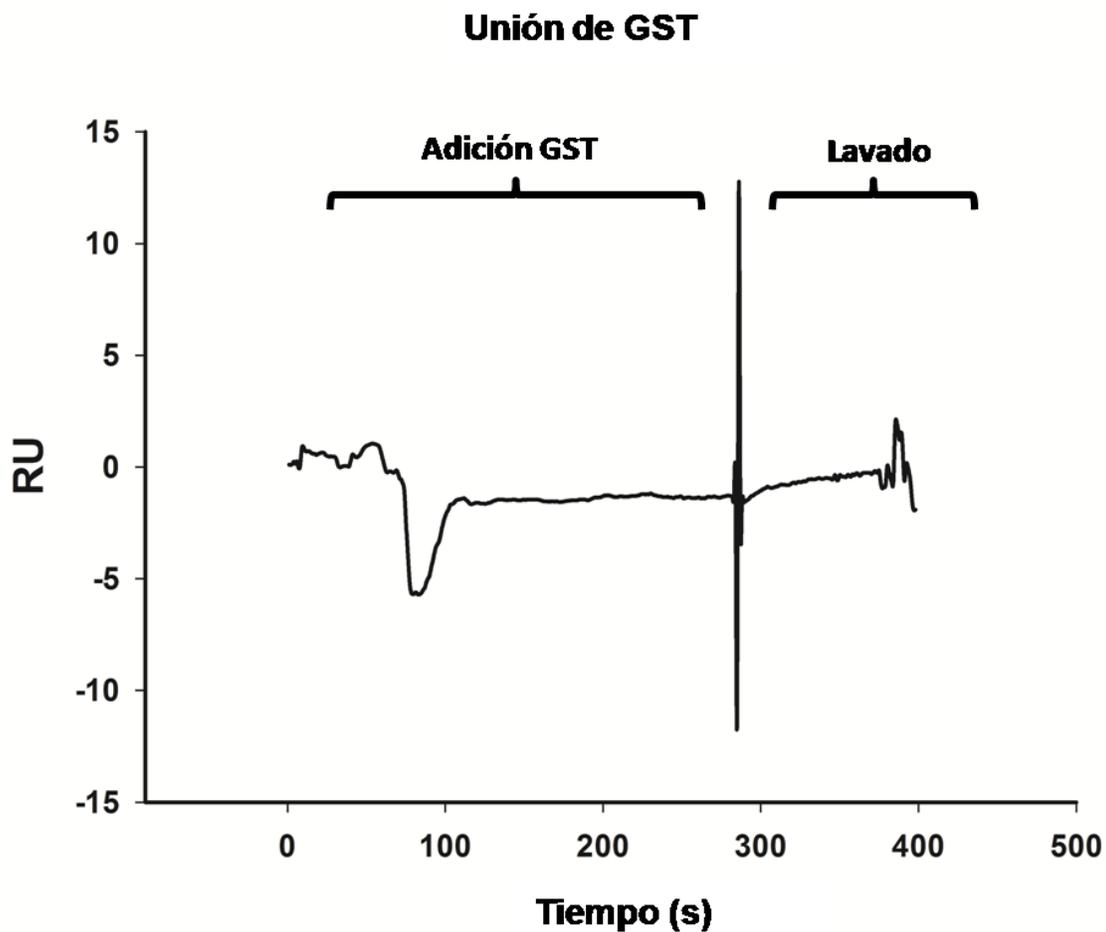


Figura 39. Cinética de unión entre las proteínas His-pEhCP112 y GST. A la proteína His-EhCP112 inmovilizada en el sensor se le añadió la proteína GST (560 nM) durante 4 min. RU: unidades de resonancia. Ensayo representativo de 3 experimentos independientes.

En resumen, las diferentes estrategias experimentales confirmaron las predicciones de los acoplamientos moleculares *in silico*, evidenciando que las proteínas EhCP112 y EhADH forman el complejo EhCPADH dentro de los trofozoítos. Además, sugieren la presencia de diferentes conformaciones de este complejo heterodimérico con funciones variables y posibles sitios de unión entre ambas proteínas.

15. DISCUSIÓN

Trabajos anteriores de nuestro grupo y empleando diferentes estrategias han sugerido que las proteínas EhCP112 y EhADH forman un complejo heterodimérico de 124 kDa (García-Rivera et al., 1999). Este complejo juega un papel muy importante en los diferentes mecanismos de virulencia del parásito *E. histolytica*, como son la adhesión, la fagocitosis y la citólisis de las células huésped (García-Rivera, 1999). Sin embargo, se desconocen los residuos que participan en la formación de este heterodímero, así como las regiones o dominios que participan en esta unión.

Debido a la falta de la estructura cristalizada de las proteínas EhCP112 y EhADH, como primera aproximación es fundamental conocer la estructura 3D de cada proteína para posteriormente realizar estudios de acoplamiento molecular. Hasta la fecha no existen trabajos donde se reporte algún modelo tridimensional de la proteasa EhCP112. En cambio, Bañuelos et al 2011 construyeron un modelo 3D rudimentario de la proteína EhADH; sin embargo, esta estructura no fue refinada por DM y por lo tanto no puede ser usada para un análisis serio de acoplamiento molecular. Así que en esta tesis se obtuvieron modelos 3D con el servidor I-TASSER de las proteínas EhCP112 y EhADH, los cuales fueron refinados por DM durante una trayectoria larga de 500 ns. Una vez que contábamos con modelos refinados para ambas proteínas, se prosiguió a realizar el acoplamiento molecular para definir los dominios y residuos que participan en esta interacción.

Cabe aclarar que en el caso de la proteasa EhCP112, se modelaron dos formas de la enzima, la forma precursora o pEhCP112 y la forma madura o mEhCP112. La primera forma corresponde a la proteína con el propéptido y es catalíticamente inactiva; por su parte, la forma mEhCP112 carece del propéptido y tiene actividad enzimática. Se desconoce cuál de esas formas se une a la EhADH para formar el heterodímero. De ahí la importancia de contar con los modelos 3D de las dos proteasas.

Los mejores modelos 3D obtenidos del servidor I-TASSER se seleccionaron de acuerdo al parámetro C y mostraron los mejores valores en las gráficas de Ramachandran. Los modelos 3D de pEhCP112 y mEhCP112 mostraron que ambas son proteínas globulares y que en pEhCP112 el sitio catalítico está escondido por el propéptido y el dominio RGD aparece expuesto; mientras que en mEhCP112 ambos sitios están expuestos. Ambos modelos exhibieron áreas sin estructuras, por lo que para saber si se trataban de proteínas desordenadas, la secuencia primaria completa de EhCP112 se analizó en el servidor DisProt y los resultados indicaron que EhCP112 no es una proteína desordenada. Las áreas sin estructura han sido validadas experimentalmente en estudios previos, usando fluorescencia y espectroscopía de dicroísmo circular, demostrando que la proteína recombinante pEhCP112 presenta estructuras α -hélices and hojas β . Sin embargo, durante el re-plegamiento, la mayoría de la proteína no tiene mucha estructura y aun así conserva su actividad proteolítica (Zamudio et al., 2014).

Por su parte, los resultados estructurales evidenciaron que la EhADH es una proteína extendida, con estructura similar a otros miembros de la familia ALIX (Zhai et al., 2008). Algunos residuos del amino y carboxilo terminal forman una región con forma de V que le da gran movilidad a la proteína y donde se encuentra el dominio de adhesión.

Antes de llevar a cabo el refinamiento de los modelos 3D mediante DM, fue importante determinar si las proteínas eran solubles o integrales de la membrana, ya que el procedimiento para la simulación de la DM es diferente. Evidencias previas demostraron que el complejo EhCPADH se localizaba en la membrana de los trofozoítos y de algunas vacuolas (Garcia-Rivera et al., 1999; Ocadiz et al., 2005). Adicionalmente, la proteína EhCP112 tiene una región hidrofóbica (K395-L416 aa) y la EhADH tiene 3 regiones hidrofóbicas dentro del dominio Bro1 (V114-S130, T176-A195 y F224-C247 aa), sugiriendo que éstas podrían ser proteínas integrales de membrana (Garcia-Rivera et al., 1999). Sin embargo, nuestros resultados obtenidos con la base de datos OPM sugieren que ambas son proteínas periféricas, solo con las cadenas laterales de algunos aminoácidos embebidas en la membrana. Esta propiedad podría conferirles a EhCP112 y EhADH la capacidad de ser transportadas desde la membrana plasmática hacia los endosomas y a otros organelos, donde probablemente tengan distintas funciones, como la reportada para otros miembros de la familia ALIX durante la endocitosis (Odorizzi, 2006).

Al realizar el análisis de DM durante 500 ns de los modelos 3D de las proteínas pEhCP112, mEhCP112 y EhADH, se observó en las gráficas de Ramachandran que los ángulos de torsión de los aminoácidos se corrigieron, comparados con las estructuras obtenidas del servidor I-TASSER. El parámetro geométrico RG que define la expansión y compactación de una proteína, demostró que la trayectoria de la mEhCP112 fue más uniforme y presentó mayor estabilidad que la de pEhCP112, probablemente debido a la ausencia del propéptido; mientras que la EhADH se compactó desde los 200 hasta los 500 ns. Por su parte para explorar la flexibilidad de las proteínas se evaluó el RMSF de los C α se observó que la proteína mEhCP112 exhibió mayor movilidad que pEhCP112. De manera interesante, la región R221-D274 aa que contiene el motivo RGD, presentó mayor fluctuación en pEhCP112. Esta forma de la proteasa, no tiene actividad catalítica y su principal función podría ser la unión a otras proteínas a través de su sitio de unión a integrinas, antes de la activación, así la fluctuación en el dominio RGD podría facilitar la asociación con otras moléculas. En contraste a pEhCP112, los residuos catalíticos (C167, H329 y N348) de mEhCP112 exhibieron la mayor fluctuación; probablemente esta flexibilidad podría facilitar el contacto con los sustratos de esta enzima. Para la proteína EhADH, los valores de RMSF presentaron una alta flexibilidad en los residuos 50-350, que se encuentran dentro del dominio Bro1 y en los aminoácidos 400-600 de la región con forma de V que incluye el dominio de adhesión, sugiriendo que estas regiones podrían interactuar con otras moléculas, como se ha reportado para otras proteínas andamiaje de la familia ALIX (Odorizzi, 2006). El análisis de RMSD evalúa la convergencia del sistema durante la DM y su normalización indicó que las proteínas pEhCP112, mEhCP112 y

EhADH siguieron una distribución normal y alcanzaron el equilibrio después de 50 ns (para EhADH) y 200 ns (para EhCP112) de DM y no se observaron cambios significativos después de este tiempo. Otras proteínas de *E. histolytica* tales como la D-fosfoglicerato deshidrogenasa (223 aa) y la β -tubulina (458 aa), se han modelado y sometido a DM hasta 10 ns (Aguayo-Ortiz et al., 2013; Mishra et al., 2012); y otras proteínas de membrana, tales como el receptor 1 de estrógenos acoplado a la proteína G de humano (375 aa) y la proteína de rata 2A de la vesícula sináptica (742 aa) se han modelado y simulado hasta 120 y 50 ns, respectivamente (Correa-Basurto et al., 2015; Méndez-Luna et al., 2015). Por lo tanto, consideramos que nuestro análisis de DM de 500 ns es suficientemente razonable para predecir modelos confiables de pEhCP112, mEhCP112 y EhADH, las cuales son proteínas grandes y periféricas de membrana.

Los cambios conformacionales sufridos por la proteína pEhCP112 durante el proceso de maduración podrían afectar las distancias entre los residuos que forman el sitio catalítico y por lo tanto la actividad catalítica de esta proteasa. Así que, medimos las distancias entre los aminoácidos que forman la triada catalítica de EhCP112, a lo largo de toda la trayectoria de DM. Estos resultados mostraron que los aminoácidos que integran la triada catalítica se encuentran más cerca en la forma catalítica de la enzima, que en la forma que contiene el propéptido, sugiriendo que la actividad proteolítica podría regularse por este medio. En las proteasas de la familia cathepsina, el propéptido tiene al menos tres funciones principales: (i) ser un andamio para el plegamiento del dominio catalítico

(Yamamoto, Watabe, Kageyama, & Takahashi, 1999); (ii) dirigir a la proteasa al sitio donde realiza su función, actuando como acarreador (Yamamoto et al., 1999); e (iii) inhibir la activación de la proteasa de una manera altamente específica, hasta que la enzima alcance a su sustrato y esté lista para llevar a cabo su actividad (Carmona et al., 1996; Lecaille, Kaleta, & Bromme, 2002). Estas funciones también podrían presentarlas el propéptido en la forma pEhCP112.

Una vez que los modelos 3D de las proteínas pEhCP112, mEhCP112 and EhADH fueron refinados por DM y alcanzaron el equilibrio, se usaron las conformaciones a 200, 300, 400 y 500 ns para realizarlos acoplamiento proteína-proteína. El acoplamiento entre pEhCP112 o mEhCP112 con EhADH evidenció interacciones mediadas por 12-21 puentes de hidrógeno, en ambos casos. El enlace de hidrógeno es una fuerza electrostática dipolo-dipolo fija y muy fuerte cuando muchas moléculas están unidas, ya que proporciona una gran estabilidad; aunque es más débil que el enlace covalente o el enlace iónico. El enlace de hidrógeno está en algún lugar intermedio entre el enlace covalente y las fuerzas de van der Waals. En los complejos pEhCPADH y mEhCPADH, las distancias entre los residuos que interactúan en ambas proteínas fueron muy similares y menores a 3.15 Å. De manera interesante se observó que a 500 ns, en la proteína mEhCP112 se formó una cavidad donde se inserta la EhADH. En cambio, en los complejos pEhCPADH no se detectó esta cavidad. El tipo de interacciones y las distancias entre los residuos involucrados sugirieron una unión complementaria entre las proteínas pEhCP112 o mEhCP112 con EhADH, aunque probablemente la

interacción es más fuerte con mEhCP112 debido a la formación de esa cavidad. Las diferentes conformaciones encontradas representan distintas estructuras de las proteínas y de los complejos y probablemente correspondan a diferentes estados dentro de los trofozoítos.

En general, los sitios de interacción entre pEhCP112 o mEhCP112 con EhADH se resumen en la Figura 27. pEhCP112 se unió a EhADH por dos regiones, una de ellas está dentro del propéptido y la otra está en el carboxilo terminal. Por su parte, en la proteína mEhCP112, el dominio RGD o residuos adyacentes están involucrados en su unión con la EhADH. En ambas formas de EhCP112, los residuos que forman el sitio catalítico no participan en la unión con la EhADH, sino que están cubiertos por el propéptido o por un asa que abarca los aminoácidos A220-I361. Este hallazgo resulta muy interesante porque sugiere que las proteínas pEhCP112 y mEhCP112 están inactivas cuando se encuentran unidas a la EhADH, mientras que el sitio catalítico de la mEhCP112 se expone cuando la proteína se separa del complejo. Sin embargo, se requiere de estrategias experimentales para probar esta teoría, ya que se ha demostrado actividad proteolítica del complejo EhCPADH (García-Rivera et. al., 1999).

Por su parte, las regiones de la EhADH que interaccionaron con ambas formas de la EhCP112 se localizaron en el dominio Bro1, en residuos adyacentes al dominio de adhesión y en el carboxilo terminal. Con estos resultados, podemos hipotetizar que la EhADH actúa como un acarreador de la EhCP112 a los endosomas o a otros sitios donde lleve a cabo sus funciones. Una vez ahí, el complejo EhCPADH podría

separarse y entonces, ambas proteínas realizarían su función de manera independiente. Por ejemplo, en levadura, Rim20, una proteína que contiene el dominio Bro1 se asocia con Snf7 en los endosomas y entonces recluta a la cisteína proteasa Rim13 (Weiss, Huppert, & Kolling, 2009). Otro ejemplo es la proteína humana Alix, la cual se une al ácido lisobisfosfatídico (LBPA) en los endosomas (Bissig & Gruenberg, 2014; Chevallier et al., 2008), y recientemente se ha reportado por nuestro grupo que EhADH interacciona con LBPA (Castellanos-Castro et al., 2016). Estos ejemplos ponen en evidencia la versatilidad de las proteínas ALIX para funcionar como moléculas andamios, interactuando por diferentes regiones con las mismas o diferentes moléculas y así participar en diferentes eventos celulares.

Previamente se ha demostrado experimentalmente que el complejo EhCPADH se asocia a la membrana plasmática y a la membrana de los fagosomas (Garcia-Rivera et al., 1999). Nuestros resultados arrojados por la base de datos OPM predijeron que los complejos pEhCPADH y mEhCPADH a 500 ns se anclan a la membrana a través de la EhCP112. Además, cuando pEhCP112 o mEhCP112 forman parte del complejo, presentaron más residuos embebidos en la membrana que cuando están solas. Es de notar que ninguno de los residuos embebidos en la membrana participa en la asociación con la EhADH, indicando que los aminoácidos implicados en la interacción con la membrana y con la adhesina, son diferentes. Además, los resultados presentados aquí coinciden con las diferentes localizaciones celulares que el complejo presenta en trofozoítos vivos o fijados. En condiciones basales, el complejo EhCPADH se ha localizado en la membrana plasmática, en el citoplasma y en

vesículas; y durante la fagocitosis, éste se ha localizado en la membrana de los fagosomas y en vacuolas citoplásmicas (Garcia-Rivera et al., 1999; Ocadiz et al., 2005). De manera que, la re-localización subcelular de una proteína periférica de membrana podría ser más fácil que la de una proteína integral de membrana. Sin embargo, no se han llevado a cabo experimentos para distinguir que complejo, si pEhCPADH o mEhCPADH o ambos se presentan en los trofozoítos.

En este trabajo, los estudios bioinformáticos predijeron la estructura tridimensional de las proteínas pEhCP112, mEhCP112, EhADH, pEhCPADH y mEhCPADH, así como los residuos involucrados en las asociaciones moleculares. Por lo que para probar experimentalmente la asociación entre las proteínas EhCP112 y EhADH llevamos a cabo ensayos de inmunofluorescencia acoplada a microscopía confocal, inmunomarcaje con oro coloidal acoplado a microscopía electrónica de transmisión, inmunoprecipitación y ensayos por resonancia de plasmón superficiales.

Las imágenes de microscopía confocal mostraron co-localización entre EhCP112 y EhADH en la membrana plasmática y en algunos puntos en el citoplasma. Aunque ambas proteínas también aparecieron separadas, de acuerdo a las predicciones *in silico*. La co-localización de ambas proteínas es mayor en la membrana plasmática que en toda la célula, sugiriendo que la asociación entre EhCP112 y EhADH podría ser mayor en esta región, en condiciones basales. Por MET encontramos a las proteínas EhCP112 y EhADH separadas y formando parte del complejo, en la membrana plasmática, en el citoplasma, en la membrana de las vesículas y dentro de ellas. Además, ambas proteínas se detectaron afuera de los trofozoítos, sugiriendo

que se secretaron, como ya ha sido reportado para EhCP112 y EhCPADH (Ocadiz et al., 2005). La presencia de EhADH en el citoplasma y en las vesículas, sin formar parte del complejo, podría sugerir que la adhesina acarrea otras moléculas diferentes a EhCP112, como la EhVpS32 (Avalos-Padilla et al., 2015) o el LBPA (Castellanos-Castro et al., 2016).

La detección de EhCP112, EhADH y del complejo EhCPADH en la membrana plasmática usando dos estrategias experimentales diferentes, coincide con los resultados obtenidos con la base de datos OPM, los cuales predicen que éstas son proteínas periféricas de membrana.

Adicionalmente, se demostró la asociación *in vitro* entre EhCP112 y EhADH mediante experimentos de inmunoprecipitación y de RPS. En los ensayos de inmunoprecipitación se observó la asociación entre las proteínas EhADH y EhCP112, ya que se detectó el complejo EhCPADH dentro de los trofozoítos. Es interesante mencionar que en el inmunoprecipitado con el anticuerpo α -EhADH, el anticuerpo α -EhCP112 reconoció a la proteína pEhCP112 libre, pero no a la que se encuentra en el complejo. Esto se puede deber a que el anticuerpo α -EhCP112 está dirigido contra un epítipo que quizá está inaccesible cuando pEhCP112 interacciona con EhADH para formar el complejo pEhCPADH, como se pudo observar en el acoplamiento molecular entre pEhCP112 y EhADH, realizado a 500 ns. Aunque, los modelos 3D predicen diversas conformaciones del complejo heterodimérico y la unión entre EhADH con pEhCP112 o mEhCP112 se lleva a cabo por distintas regiones. En algunas de estas conformaciones, el epítipo reconocido por el anticuerpo α -EhCP112 está expuesto,

mientras que en otras está escondido. Por estas razones, el número de complejos detectados en los ensayos de MET podrían estar subestimados.

En tanto que los ensayos de RPS con las proteínas recombinantes purificadas, evidenciaron que pEhCP112 se une a EhADH aproximadamente a los dos minutos de contacto, presentando buenas constantes de asociación y disociación, que sugieren una fuerte asociación entre estas proteínas, como podrían ser los puentes de hidrógeno predichos en el análisis bioinformático. En este caso usamos la proteína recombinante His-pEhCP112 en lugar de la His-mEhCP112, ya que la capacidad autoproteolítica de esta proteasa podría impedir la detección de su asociación con EhADH. La especificidad de la unión se verificó al realizar ensayos de asociación con la proteína pEhCP112 y como analito a la proteína no relacionada GST, donde no se detectó ninguna unión, incluso empleando el doble de la concentración del analito. Por lo tanto, podemos decir que la unión entre pEhCP112 y EhADH es específica.

Previamente, nuestro grupo de trabajo demostró que durante la invasión de los trofozoítos hacia el epitelio intestinal, el complejo EhCPADH se asoció con proteínas de la UE. Aunque hasta el momento, no sabemos cuál(es) proteína(s) de la UE se asocia(n) de manera directa con el complejo EhCPADH. Los primeros candidatos moleculares de la UE, serían las proteínas integrales de membrana cuyas regiones extracelulares estarían fácilmente accesibles para las moléculas de los trofozoítos. Las claudinas son proteínas integrales de la UE que regulan el paso de iones por la ruta paracelular a través de sus dos asas extracelulares, lo cual les

confiere una alta probabilidad de ser los receptores de *E. histolytica*. De hecho algunas claudinas sirven como receptores para patógenos, tal es el caso de la enterotoxina de *Clostridium perfringens* (C-CPE), que a través de su extremo carboxilo terminal se une específicamente a dos segmentos extracelulares de la claudina-19, resultando en la desintegración de la UE y en un incremento de la permeabilidad paracelular de células epiteliales (Saitoh et al., 2015). De manera que para estudiar si existe asociación directa de EhCPADH con alguna claudina, como primera instancia modelamos a la proteína claudina-2 y posteriormente llevamos a cabo el acoplamiento molecular con las proteínas mEhCP112 y EhADH. Seleccionamos a la claudina-2 porque es una de las 27 claudinas que regula la función de barrera epitelial, forma canales paracelulares para cationes pequeños y agua y se ha demostrado que su expresión se incrementa durante procesos inflamatorios, como en las enfermedades inflamatorias del colon (enfermedad de Crohn's y colitis ulcerativa) contribuyendo a la inducción de la diarrea (Weber, et al, 2008). El incremento de la claudina-2 se ha asociado con una disminución y/o redistribución de las claudinas 1, 3, 4, 5 y/o 8 (Luettig, Rosenthal, Barmeyer, & Schulzke, 2015). Por su parte, la infección causada por *E. histolytica* en el colon intestinal también causa diarrea, debido al daño en el epitelio de la mucosa y a una fuerte respuesta inflamatoria caracterizada por un incremento en las citosinas pro-inflamatorias, quimosinas, interferones y factores de crecimiento (Seydel, Zhang, & Stanley, 1997; Yu & Chadee, 1997; Z. Zhang & Stanley, 2004).

El modelo 3D de la claudina-2 obtenido del servidor I-TASSER, mostró los dominios característicos de las claudinas y sus aminoácidos mayoritariamente se encontraron en la región favorecida en la gráfica de Ramachandran, sugiriendo que la estructura predicha tuvo un correcto plegamiento. Aunque se sabe que claudina-2 es una proteína integral de membrana, se orientó en la membrana usando la base de datos OPM para comprobar la correcta ubicación de sus regiones transmembranales. Los resultados corroboraron que las 4 regiones hidrofóbicas se encuentran insertadas en la membrana y este modelo de la claudina-2 se refinó por DM durante 100 ns. El tiempo de la DM fue menor que para EhCP112 y EhADH, ya que se trata de una proteína transmembranal, la cuales muy estable, ya que presentan poca libertad de movimiento al estar anclada en la membrana, en comparación con proteínas periféricas o citosólicas. El refinamiento del modelo 3D de la claudina-2 señala que esta proteína alcanzó el equilibrio a los 20 ns de DM y no presentó grandes cambios en la estructura, solo la primera asa extracelular exhibió la mayor zona de fluctuación, según los valores de RMSF. Estos resultados pueden explicar los hallazgos de estudios previos, donde usando espectroscopía de fuerza molecular se ha observado una asociación homotípica de las claudina-2 de células adyacentes, mediada por la primera asa extracelular (Lim, Vedula, Hunziker, & Lim, 2008). Debido a esta propiedad de homo- y heterodimerización de la claudina-2 con ella misma o con otros miembros de la familia de la claudinas, en primer lugar se llevó a cabo un acoplamiento molecular entre dos moléculas de claudina-2, para tratar de simular las condiciones estructurales a las que se enfrentarían EhCP112 y EhADH en el epitelio intestinal. Nuestros resultados

indicaron que la interacción claudina-2-claudina-2 se llevó a cabo por sus dos asas extracelulares. Posteriormente, cuando a este complejo claudina-2-claudina-2 se le acopló molecularmente las proteínas mEhCP112 y EhADH, observamos que las claudinas se unen a través de la primera asa extracelular con el extremo carboxilo terminal y el dominio Bro1 de la proteasa y adhesina, respectivamente. Estos resultados nos sugieren fuertemente que la claudina-2, a través de su primera asa extracelular, no solo forma asociaciones con otras claudinas, sino también podría ser el receptor para *E. histolytica*. Sin embargo, esta hipótesis debe ser comprobada experimentalmente.

En conclusión, las diferentes estrategias experimentales confirmaron los resultados obtenidos en el análisis *in silico*, evidenciando que EhCP112 y EhADH forman el complejo EhCPADH dentro de los trofozoítos. El acoplamiento molecular y el análisis de DM predijeron diversas conformaciones de este complejo, sugiriendo diferentes funciones biológicas en varias localizaciones subcelulares, como en la membrana plasmática, el citoplasma y los fagosomas y durante los diferentes mecanismos de virulencia, tales como la fagocitosis y la citólisis. Además, las proteínas por separado podrían adoptar diferentes conformaciones que les permitan interactuar con otras proteínas o lípidos dentro de la célula o con sus receptores epiteliales, como la claudina-2, o con otras células blanco.

Tampoco sabemos que forma de la proteasa está presente en el complejo EhCPADH. Los análisis *in silico* nos permitieron predecir que la EhADH se asocia con mayor afinidad a la forma activa de la proteasa, sugiriendo que el complejo

podría estar formado principalmente por la mEhCP112, aunque hasta ahora no lo hemos podido demostrar experimentalmente. Sin embargo, las dos estrategias (*in silico* y experimentales) usadas en este trabajo proveen información complementaria sobre la formación del complejo EhCPADH, que podría ser empleada para entender la presencia de EhCP112, EhADH y EhCPADH durante diferentes eventos de patogenicidad de este parásito. La relevancia de obtener los modelos de estas proteínas y descifrar la formación del heterodímero y su asociación con los posibles receptores epiteliales, podría ser aplicada para el diseño de compuestos prometedores que representen una futura solución para combatir a la amibiasis.

16. CONCLUSIONES

Los modelos 3D de las proteínas pEhCP112 y mEhCP112 presentan una forma globular y predicen que ambas proteínas son periféricas de membrana.

La región de mayor fluctuación en pEhCP112 contiene al motivo RGD, sugiriendo que la principal función de esta proteína es unirse a otras proteínas, como las del tipo integrina.

La región de mayor fluctuación en mEhCP112 contiene al sitio catalítico, sugiriendo que la principal función de esta proteína es ejercer su actividad catalítica.

Los aminoácidos que integran la triada catalítica de la proteína mEhCP112 se encuentran a distancias cercanas comparados con los aminoácidos de la triada catalítica de la proteína pEhCP112.

El modelo 3D de la proteína EhADH muestra una estructura similar a la de proteínas de la familia ALIX y también se predice como una proteína periférica de membrana.

Las principales zonas de fluctuación de EhADH comprenden el dominio Bro1 y el dominio V.

Los heterodímeros pEhCPADH y mEhCPADH se asocian principalmente por el dominio Bro1 y el dominio de adhesión de la EhADH, mientras que en la pEhCP112, las regiones involucradas son el propéptido y el extremo carboxilo

terminal. En el caso de la mEhCP112, solo el extremo carboxilo terminal se asocia con la EhADH.

En los trofozoítos la EhCP112 y EhADH co-localizan en la membrana plasmática, en las membranas de las vesículas y dentro de ellas.

EhCP112 se asocia a EhADH formando el complejo EhCPADH, dentro de los trofozoítos.

EhCP112 se une a la EhADH con una constante de asociación de $K_a=6.7 \times 10^{-3}$ y una constante de disociación de $K_d=4.24 \times 10^{-7}$.

La claudina-2, mediante su primera asa extracelular, se asocia con la EhCP112 y EhADH a través del extremo carboxilo terminal y el dominio Bro1, respectivamente.

17. BIBLIOGRAFÍA

- A. Martínez Palomo and D. Erlij. (1973). The Distribution of Lanthanum in Tight Junctions of the Kidney Tubule. *Pflugers Arch.*, 272(343), 267–272.
- Aguayo-Ortiz, R., Mendez-Lucio, O., Romo-Mancillas, A., Castillo, R., Yopez-Mulia, L., Medina-Franco, J. L., & Hernandez-Campos, A. (2013). Molecular basis for benzimidazole resistance from a novel beta-tubulin binding site model. *Journal of Molecular Graphics & Modelling*, 45, 26–37. <http://doi.org/10.1016/j.jmglm.2013.07.008>
- Aktories, K., & Barbieri, J. T. (2005). Bacterial cytotoxins: targeting eukaryotic switches. *Nature Reviews Microbiology*, 3(5), 397–410. <http://doi.org/10.1038/nrmicro1150>
- Arroyo, R., & Orozco, E. (1987). Entamoeba histolytica adhesin, 23, 151–158.
- Azuara-Liceaga, E., Flores-Soto, E., López-Camarillo, C., & Orozco, E. (2005). Entamoeba histolytica: Structural and functional analysis of the Ehadh112 gene promoter. *Experimental Parasitology*, 110, 280–285. <http://doi.org/10.1016/j.exppara.2005.03.004>
- Bañuelos, C., García-Rivera, G., López-Reyes, I., Mendoza, L., González-Robles, A., Herranz, S., ... Orozco, E. (2012). EhADH112 Is a Bro1 domain-containing protein involved in the entamoeba histolytica multivesicular bodies pathway. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2012. <http://doi.org/10.1155/2012/657942>
- Batcho, P. F., Case, D. a., & Schlick, T. (2001). Optimized particle-mesh Ewald/multiple-time step integration for molecular dynamics simulations. *Journal of Chemical Physics*, 115(9), 4003–4018. <http://doi.org/10.1063/1.1389854>
- Bello, M., Martínez-Archundia, M., & Correa-Basurto, J. (2013). Automated docking for novel drug discovery. *Expert Opinion on Drug Discovery*, 8(7), 821–34. <http://doi.org/10.1517/17460441.2013.794780>
- Bleischwitz, M., Albert, M., Fuchsbaauer, H.-L., & Kaldenhoff, R. (2010). Significance of Cuscutain, a cysteine protease from Cuscuta reflexa, in host-parasite interactions. *BMC Plant Biology*, 10(1), 227. <http://doi.org/10.1186/1471-2229-10-227>
- Brooijmans, N., & Kuntz, I. D. (2003). Molecular Recognition and Docking Algorithms. *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure*, 32(1), 335–373. <http://doi.org/10.1146/annurev.biophys.32.110601.142532>
- Claude, P., & Goodenough, D. a. (1973). Fracture faces of zonulae occludentes from “tight” and “leaky” epithelia. *Journal of Cell Biology*, 58, 390–400. <http://doi.org/10.1083/jcb.58.2.390>
- Consortium, T. U. (2014). UniProt: a hub for protein information. *Nucleic Acids Research*, 43(D1), D204–D212. <http://doi.org/10.1093/nar/gku989>
- Correa-Basurto, J., Cuevas-Hernández, R. I., Phillips-Farfán, B. V., Martínez-Archundia, M., Romo-Mancillas, A., Ramírez-Salinas, G. L., ... Mendoza-Torreblanca, J. G. (2015). Identification of the antiepileptic racetam binding site in the synaptic vesicle protein 2A by molecular dynamics and docking simulations. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 9(April), 1–12. <http://doi.org/10.3389/fncel.2015.00125>
- da Costa, R. F. M., de Souza, W., Benchimol, M., Alderete, J. F., & Morgado-Diaz, J. A.

- (2005). *Trichomonas vaginalis* perturbs the junctional complex in epithelial cells. *Cell Research*, 15(9), 704–716. <http://doi.org/10.1038/sj.cr.7290340>
- Ekins, S., Mestres, J., & Testa, B. (2007). *In silico* pharmacology for drug discovery: methods for virtual ligand screening and profiling. *British Journal of Pharmacology*, 152(1), 9–20. <http://doi.org/10.1038/sj.bjp.0707305>
- Eva Avila, and J. C. (1993). avila-calderon.pdf. *Experimental Parasitology*, 76, 232–241.
- Fiser, A., & Sali, A. (2003). ModLoop: Automated modeling of loops in protein structures. *Bioinformatics*, 19(18), 2500–2501. <http://doi.org/10.1093/bioinformatics/btg362>
- Furuse, M., Fujita, K., Hiiiragi, T., Fujimoto, K., & Tsukita, S. (1998). Claudin-1 and -2: novel integral membrane proteins localizing at tight junctions with no sequence similarity to occludin. *The Journal of Cell Biology*, 141(7), 1539–50. <http://doi.org/10.1083/jcb.141.7.1539>
- García-Rivera, G., Rodríguez, M. a., Ocadiz, R., Martínez-López, M. C., Arroyo, R., González-Robles, a., & Orozco, E. (1999). Entamoeba histolytica: A novel cysteine protease and an adhesin form the 112 kDa surface protein. *Molecular Microbiology*, 33, 556–568. <http://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1999.01500.x>
- Glykos, N. M. (2006). Software News and Updates Carma: A Molecular Dynamics Analysis Program. *Journal of Computational Chemistry*, 27(16), 1765–1768. <http://doi.org/10.1002/jcc>
- Goldberg, M. B., & Sansonetti, P. J. (1993). Shigella subversion of the cellular cytoskeleton: A strategy for epithelial colonization. *Infection and Immunity*, 61(12), 4941–4946.
- Guttman, J. a., & Finlay, B. B. (2009). Tight junctions as targets of infectious agents. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1788(4), 832–841. <http://doi.org/10.1016/j.bbamem.2008.10.028>
- Humphrey, W., Dalke, A., & Schulten, K. (1996). VMD: Visual molecular dynamics. *Journal of Molecular Graphics*, 14(1), 33–38. [http://doi.org/10.1016/0263-7855\(96\)00018-5](http://doi.org/10.1016/0263-7855(96)00018-5)
- Ichioka, F., Takaya, E., Suzuki, H., Kajigaya, S., Buchman, V. L., Shibata, H., & Maki, M. (2007). HD-PTP and Alix share some membrane-traffic related proteins that interact with their Bro1 domains or proline-rich regions. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 457, 142–149. <http://doi.org/10.1016/j.abb.2006.11.008>
- Lecaille, F., Kaleta, J., & Brömme, D. (2002). Human and parasitic Papain-like cysteine proteases: Their role in physiology and pathology and recent developments in inhibitor design. *Chemical Reviews*, 102(12), 4459–4488. <http://doi.org/10.1021/cr0101656>
- Lejeune, M., Moreau, F., & Chadee, K. (2011). Prostaglandin E2 produced by entamoeba histolytica signals via EP4 receptor and alters claudin-4 to increase ion permeability of tight junctions. *American Journal of Pathology*, 179(2), 807–818. <http://doi.org/10.1016/j.ajpath.2011.05.001>
- Leroy, a, Lauwaet, T., De Bruyne, G., Cornelissen, M., & Mareel, M. (2000). Entamoeba histolytica disturbs the tight junction complex in human enteric T84 cell layers. *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 14(9), 1139–46. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10834936>

- Lim, T. S., Vedula, S. R. K., Hunziker, W., & Lim, C. T. (2008). Kinetics of adhesion mediated by extracellular loops of claudin-2 as revealed by single-molecule force spectroscopy. *Journal of Molecular Biology*, 381(3), 681–691. <http://doi.org/10.1016/j.jmb.2008.06.009>
- Luettig, J., Rosenthal, R., Barmeyer, C., & Schulzke, J. D. (2015). Claudin-2 as a mediator of leaky gut barrier during intestinal inflammation. *Tissue Barriers*, 3(1-2), e977176. <http://doi.org/10.4161/21688370.2014.977176>
- Lynch, E. C., Rosenberg, I. M., & Gitler, C. (1982). An ion-channel forming protein produced by *Entamoeba histolytica*. *The EMBO Journal*, 1(7), 801–4. <http://doi.org/6329705>
- MacKerell, A., & Bashford, D. (1998). All-atom empirical potential for molecular modeling and dynamics studies of proteins. *The Journal of ...*, 5647(97), 3586–3616. <http://doi.org/10.1021/jp973084f>
- Madriz, X. (2004). Expression in fibroblasts and in live animals of *Entamoeba histolytica* polypeptides EhCP112 and EhADH112. *Microbiology*, 150(5), 1251–1260. <http://doi.org/10.1099/mic.0.26938-0>
- Marion, S., & Guillén, N. (2006). *Genomic and proteomic approaches highlight phagocytosis of living and apoptotic human cells by the parasite Entamoeba histolytica*. *International Journal for Parasitology*.
- Martínez-López, C., Orozco, E., Sánchez, T., García-Pérez, R. M., Hernández-Hernández, F., & Rodríguez, M. a. (2004). The EhADH112 recombinant polypeptide inhibits cell destruction and liver abscess formation by *Entamoeba histolytica* trophozoites. *Cellular Microbiology*, 6(4), 367–376. <http://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2004.00363.x>
- Martínez-Palomo, a. (1987). The pathogenesis of amoebiasis. *Parasitology Today (Personal Ed.)*, 3(4), 111–118. [http://doi.org/10.1016/0169-4758\(87\)90048-2](http://doi.org/10.1016/0169-4758(87)90048-2)
- Martinez-Palomo et al. (1985). Structural Bases of the Cytolytic Mechanisms of *Entamoeba histolytica*. *Journal of Protozool*, 32(1), 166–175.
- Méndez-Luna, D., Martínez-Archundia, M., Maroun, R. C., Ceballos-Reyes, G., Fragoso-Vázquez, M. J., González-Juárez, D. E., & Correa-Basurto, J. (2015). Deciphering the GPER/GPR30-agonist and antagonists interactions using molecular modeling studies, molecular dynamics, and docking simulations. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, (May), 1–12. <http://doi.org/10.1080/07391102.2014.994102>
- Meza, I., Cazares, F., Rosales-Encina, J. L., Talamas-Rohana, P., & Rojkind, M. (1987). Use of antibodies to characterize a 220-kilodalton surface protein from *Entamoeba histolytica*. *J Infect Dis*, 156(5), 798–805. <http://doi.org/10.1093/infdis/156.5.798>
- Mishra, V., Kumar, A., Ali, V., Nozaki, T., Zhang, K. Y. J., & Bhakuni, V. (2012). Novel protein-protein interactions between *Entamoeba histolytica*-phosphoglycerate dehydrogenase and phosphoserine aminotransferase. *Biochimie*, 94(8), 1676–1686. <http://doi.org/10.1016/j.biochi.2012.02.028>
- Moitessier, N., Englebienne, P., Lee, D., Lawandi, J., & Corbeil, C. R. (2008). Towards the development of universal, fast and highly accurate docking/scoring methods: a long way to go. *British Journal of Pharmacology*, 153 Suppl, S7–S26. <http://doi.org/10.1038/sj.bjp.0707515>
- Ocádiz, R., Orozco, E., Carrillo, E., Quintas, L. I., Ortega-López, J., García-Pérez, R. M.,

- ... Rodríguez, M. a. (2005). EhCP112 is an *Entamoeba histolytica* secreted cysteine protease that may be involved in the parasite-virulence. *Cellular Microbiology*, 7, 221–232. <http://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2004.00453.x>
- Ocádiz-Ruiz, R., Fonseca, W., Linford, A. S., Yoshino, T. P., Orozco, E., & Rodríguez, M. a. (2015). The knockdown of each component of the cysteine proteinase-adhesin complex of *Entamoeba histolytica* (EhCPADH) affects the expression of the other complex element as well as the in vitro and in vivo virulence. *Parasitology*, 1–10. <http://doi.org/10.1017/S003118201500147X>
- Ocádiz-Ruiz, R., Fonseca, W., Martínez, M. B., Ocádiz-Quintanar, R., Orozco, E., & Rodríguez, M. a. (2013). Effect of the silencing of the Ehcp112 gene on the in vitro virulence of *Entamoeba histolytica*. *Parasites & Vectors*, 6, 248. <http://doi.org/10.1186/1756-3305-6-248>
- Okada, M., Huston, C. D., Oue, M., Mann, B. J., Petri Jr., W. a, Kita, K., & Nozaki, T. (2006). Kinetics and strain variation of phagosome proteins of *Entamoeba histolytica* by proteomic analysis. *Mol Biochem Parasitol*, 145(2), 171–183. <http://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2005.10.001>
- Orozco, Esther et al. (1983). *Entamoeba histolytica* Phagocytosis as a Virulent Factor, 158(November 1983), 1511–1521.
- Petri, W. a, Haque, R., & Mann, B. J. (2002). The bittersweet interface of parasite and host: lectin-carbohydrate interactions during human invasion by the parasite *Entamoeba histolytica*. *Annual Review of Microbiology*, 56, 39–64. <http://doi.org/10.1146/annurev.micro.56.012302.160959>
- Phillips, J. C., Braun, R., Wang, W., Gumbart, J., Tajkhorshid, E., Villa, E., ... Schulten, K. (2005). Scalable molecular dynamics with NAMD. *Journal of Computational Chemistry*, 26(16), 1781–1802. <http://doi.org/10.1002/jcc.20289>
- Piontek, J., Winkler, L., Wolburg, H., Müller, S. L., Zuleger, N., Piehl, C., ... Blasig, I. E. (2008). Formation of tight junction: determinants of homophilic interaction between classic claudins. *The FASEB Journal : Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 22(1), 146–158. <http://doi.org/10.1096/fj.07-8319com>
- Que, X., Brinen, L. S., Perkins, P., Herdman, S., Hirata, K., Torian, B. E., ... Reed, S. L. (2002). Cysteine proteinases from distinct cellular compartments are recruited to phagocytic vesicles by *Entamoeba histolytica*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 119(1), 23–32. [http://doi.org/10.1016/S0166-6851\(01\)00387-5](http://doi.org/10.1016/S0166-6851(01)00387-5)
- Quintas-Granados, L. I., Orozco, E., Brieba, L. G., Arroyo, R., & Ortega-López, J. (2009). Purification, refolding and autoactivation of the recombinant cysteine proteinase EhCP112 from *Entamoeba histolytica*. *Protein Expression and Purification*, 63(1), 26–32. <http://doi.org/10.1016/j.pep.2008.09.006>
- R, B., Y, N., & Mirelman. (2002). Amoebapore is an important virulence factor of *Entamoeba histolytica*. *Journal of Biosciences*, 27(6), 579–587.
- Raether and Pockrand H. (1977). Surface plasma oscillations at sinusoidal silver surfaces : erratum, 16(11), 2803.
- Rodríguez, M. a, Hernández, F., Santos, L., Valdez, a, & Orozco, E. (1989). *Entamoeba histolytica*: molecules involved in the target cell-parasite relationship. *Molecular and*

- Biochemical Parasitology*, 37(1), 87–99. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2559329>
- Roy, A., Kucukural, A., & Zhang, Y. (2010). I-TASSER: a unified platform for automated protein structure and function prediction. *Nature Protocols*, 5(4), 725–738. <http://doi.org/10.1038/nprot.2010.5>
- Saitoh, Y., Suzuki, H., Tani, K., Nishikawa, K., Irie, K., Ogura, Y., ... Fujiyoshi, Y. (2015). Tight junctions. Structural insight into tight junction disassembly by *Clostridium perfringens* enterotoxin. *Science (New York, N.Y.)*, 347(6223), 775–8. <http://doi.org/10.1126/science.1261833>
- Sanchez-Pulido, L., Martin-Belmonte, F., Valencia, a, & Alonso, M. a. (2002). MARVEL: a conserved domain involved in membrane apposition events. *Trends in Biochemical Sciences*, 27(12), 599–601. [http://doi.org/10.1016/S0968-0004\(02\)02229-6](http://doi.org/10.1016/S0968-0004(02)02229-6)
- Seydel, K. B., Zhang, T., & Stanley, S. L. (1997). Neutrophils play a critical role in early resistance to amebic liver abscesses in severe combined immunodeficient mice. *Infection and Immunity*, 65(9), 3951–3953.
- Staehelin L.A. (1973). Further observations on the fine structure of freeze-cleaved tight junctions. *Journal of Cell Science*, 13, 763–786. <http://doi.org/10.1007/BF00339283>
- Stanley, S. L., Becker, a, Kunz-Jenkins, C., Foster, L., & Li, E. (1990). Cloning and expression of a membrane antigen of *Entamoeba histolytica* possessing multiple tandem repeats. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 87(July), 4976–4980.
- Taylor, J. S., & Burnett, R. M. (2000). DARWIN: A program for docking flexible molecules. *Proteins: Structure, Function and Genetics*, 41(2), 173–191. [http://doi.org/10.1002/1097-0134\(20001101\)41:2<173::AID-PROT30>3.0.CO;2-3](http://doi.org/10.1002/1097-0134(20001101)41:2<173::AID-PROT30>3.0.CO;2-3)
- Tillack, M., Biller, L., Imer, H., Freitas, M., Gomes, M. a, Tannich, E., & Bruchhaus, I. (2007). The *Entamoeba histolytica* genome: primary structure and expression of proteolytic enzymes. *BMC Genomics*, 8, 170. <http://doi.org/10.1186/1471-2164-8-170>
- Vajda Sandor and Kozakov Dima. (2009). NIH Public Access, 18(2), 164–170. <http://doi.org/10.1016/j.micinf.2011.07.011.Innate>
- Van Itallie, C. M., & Anderson, J. M. (2004). The molecular physiology of tight junction pores. *Physiology (Bethesda, Md.)*, 19(13), 331–338. <http://doi.org/10.1152/physiol.00027.2004>
- Webb, B., & Sali, A. (2014). *Comparative Protein Structure Modeling Using MODELLER. Current protocols in bioinformatics / editorial board, Andreas D. Baxevanis ... [et al.]*(Vol. 47). <http://doi.org/10.1002/0471250953.bi0506s47>
- Yang, J., Yan, R., Roy, A., Xu, D., Poisson, J., & Zhang, Y. (2014). The I-TASSER Suite: protein structure and function prediction. *Nature Methods*, 12(1), 7–8. <http://doi.org/10.1038/nmeth.3213>
- Yu, Y., & Chadee, K. (1997). *Entamoeba histolytica* stimulates interleukin 8 from human colonic epithelial cells without parasite-enterocyte contact. *Gastroenterology*, 112(5), 1536–1547.
- Zhang, Y. (2008). I-TASSER server for protein 3D structure prediction. *BMC Bioinformatics*, 9, 40. <http://doi.org/10.1186/1471-2105-9-40>

Zhang, Z., & Stanley, S. L. (2004). Stereotypic and specific elements of the human colonic response to *Entamoeba histolytica* and *Shigella flexneri*. *Cellular Microbiology*, 6(6), 535–554. <http://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2004.00381.x>