

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

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE INFECTÓMICA Y PATOGÉNESIS MOLECULAR

“Caracterización funcional del complejo ESCRT-III en *Entamoeba histolytica*”

T E S I S

Que presenta

M. en C. Yunuén Ávalos Padilla

para obtener el grado de

Doctora en Ciencias en Infectómica y Patogénesis Molecular

Directora de la Tesis: Dra. María Esther Orozco Orozco

Co-directora: Dra. Abigail Betanzos Fernández

Este trabajo fue realizado en el laboratorio 2 del Departamento de Infectómica y Patogénesis Molecular del CINVESTAV-IPN bajo la dirección de la Dra. Ma. Esther Orozco Orozco y de la Dra. Abigail Betanzos Fernández, y en el laboratorio de Teoría y Biosistemas del Instituto Max Planck de Coloides e Interfaces, bajo la dirección de la Dra. Rumiana Dimova.

Agradezco el apoyo brindado a través de una beca para la realización de los estudios de Maestría que fue otorgado por parte del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT, becario No. 243275).

*A LAS MUJERES DE MI VIDA, AMOROSAS
COMPAÑERAS QUE CON DELICADA
PACIENCIA ME HAN ENSEÑADO LA INFINITA
FUERZA QUE EXISTE DENTRO DE NOSOTRAS.
GRACIAS POR TRANSFORMAR MI MUNDO.*

Agradecimientos

Este trabajo es un esfuerzo en el cual directa e indirectamente participaron varias personas opinando, corrigiendo, dándome ánimo y acompañando en los momentos más difíciles y en los momentos de felicidad. Este proyecto me permitió enriquecerme de los conocimientos y la experiencia de muchas personas a quienes deseo agradecer en este apartado.

En primer lugar, a las doctoras Esther Orozco y Abigail Betanzos por su valiosa dirección y apoyo para seguir este camino y llegar a la conclusión del mismo. Su experiencia y educación han sido mi fuente de motivación en el campo científico y personal durante estos años.

A todo mi comité por guiarme durante estos años. Al Dr. Israel López por brindarme su amistad y conocimiento, a los Doctores Mario Alberto Rodríguez y Fidel de la Cruz por sus atinadas observaciones que permitieron enriquecer más este proyecto y a la Dra. Rossana Arroyo por el apoyo continuo e interés en mi proyecto de investigación. Finalmente al Dr. Jorge Cerbón por sus perspicaces comentarios y preguntas difíciles que incentivaron el llevar mi investigación más a fondo.

A la Dra. Bibiana Chávez y a mi gran amiga Anel Lagunes por apoyarme en la obtención e interpretación de las imágenes de microscopias electrónicas.

A la doctora Rumiana Dimova por haberme recibido en su grupo de investigación en el instituto Max Planck; por la gran sabiduría, apoyo y paciencia que me brindó durante mi estancia donde tuve la oportunidad de aprender nuevas técnicas que enriquecieron mi proyecto así como formas de trabajo diferentes que contribuyeron en mi crecimiento como científica.

Al Dr. Roland Knorr por mostrarme el increíble mundo de las vesículas gigantes, por su valiosa amistad e inagotable paciencia que siempre mostró para mi aprendizaje. Asimismo, agradezco al resto del grupo de Teoría y Biosistemas del Instituto Max Planck, quienes siempre tuvieron la mejor disposición para orientarme en el trabajo de laboratorio.

Mi más sincero agradecimiento al grupo del Dr. Secklerei de la Universidad de Potsdam, en especial a la Dra. Stefanie Barbirz y a Sonja Kuntsmann, por su apoyo

absoluto, asistencia técnica y acceso total a sus instalaciones para poder completar mi proyecto de tesis.

A los auxiliares de investigación de mi grupo de trabajo, Dra. Guillermina García y Tomas Sánchez por ayudarme y acompañarme en los arduos días de trabajo, siempre con la disposición de auxiliarme y darme los mejores consejos. También agradezco a Alejandrina Reyes por el apoyo técnico durante mi proyecto, porque sin ella el laboratorio no avanzaría.

A mis compañeros de laboratorio Jon, Jeni, Silvia, Paty y Eli por las eternas horas de trabajo y buenos ratos. Por todo el tiempo que me brindaron, por las conversaciones científicas de las que tanto provecho he sacado, por el respaldo y principalmente por su amistad. Gracias por los buenos y malos momentos, por aguantarme y escucharme. Siempre estuvieron ahí aún a pesar de la distancia, dándome ánimos para el camino, gracias por todo.

Agradezco también a todos mis amigos de Alemania, mi segunda familia, por acompañarme en esa larga travesía y por compartir su tiempo y su talento conmigo. En especial agradezco a David Gómez por ayudar a que esos largos días fueran más llevaderos y por brindarme su amistad y consejos, siempre estaré en deuda contigo por todo el apoyo que me brindaste en un país tan ajeno para mí.

A mis eternas amigas Aura y Cristina, por creer siempre en mí, en ustedes la palabra Amistad cobra un sentido diferente, gracias por sus infinitas palabras de aliento y cariño constante.

Todo esto nunca hubiera sido posible sin el apoyo que me otorgan y el cariño que me brinda mi familia, quienes de forma incondicional entendieron mis ausencias y malos momentos. Gracias por estar siempre a mi lado a pesar de la distancia, siempre pendiente de mis progresos. Las palabras no son suficientes para expresar mi aprecio y agradecimiento.

Gracias mamá por el amor y devoción que siempre has tenido conmigo, por tu apoyo ilimitado, por enseñarme a tener la fortaleza para salir adelante sin importar los obstáculos, por darme la vida y juntó con mi papá, enseñarme a vivirla.

A mis hermanas Deyanira, Mireya, Reyna y Mayra, por ser las mejores amigas que puedo desear, por darme la motivación, el apoyo y la confianza cuando la perdía, gracias por ayudarme a materializar mis sueños. A mis hermosos sobrinos por iluminar mi vida y robarme risas en los días más difíciles.

Finalmente agradezco a Igor por acompañarme en las últimas etapas de esta travesía, por estar siempre a mi lado y demostrarme que puedo ser capaz de todo, por enseñarme a llorar en medio de risas y sostener mi mano mientras llevaba en mi vientre el peso de dos mundos. Por fin podemos abrazar a nuestra hermosa hija y darnos cuenta como algo tan pequeño hace que todo sea más grande.

A todos ustedes mi mayor reconocimiento y gratitud.

ÍNDICE

Resumen	1
Abstract	2
1. Introducción	3
1.1 Epidemiología de la amibiasis	3
1.2 Taxonomía de <i>E. histolytica</i>	4
1.3 Ciclo de vida de <i>E. histolytica</i>	4
1.4 Patogenicidad de <i>E. histolytica</i>	7
1.4.1 Adherencia	7
1.4.2 Citólisis	9
1.4.3 Fagocitosis	10
1.4.3.1 Trogocitosis	11
1.5 Tráfico vesicular en <i>E. histolytica</i>	12
1.6 Endocitosis y cuerpos multivesiculares (MVBs)	13
1.7 Complejo ESCRT	14
1.7.1 ESCRT en levadura	15
1.7.2 ESCRT en <i>E. histolytica</i>	19
1.8 ESCRT-III	25
1.8.1 Vps20	29
1.8.2 Vps32	29
1.8.3 Vps24	30
1.8.4 Vps2	31
1.9 Dinámica de lípidos durante la endocitosis	31
1.10 Modelos para el estudio de membranas biológicas	32
2. Justificación	34

3. Hipótesis	35
4. Objetivos	35
4.1 Objetivo general	35
4.2 Objetivos particulares	35
5. Diseño experimental	36
6. Materiales y métodos	37
6.1 Cultivo de trofozoítos de <i>E. histolytica</i>	37
6.2 Obtención de ADN genómico de <i>E. histolytica</i>	37
6.3 Extracción de RNA total	38
6.4 Síntesis de la cadena complementaria de ADN (cADN)	38
6.5 Diseño de oligonucleótidos específicos	39
6.6 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	39
6.7 Purificación del ADN a partir de geles de agarosa	40
6.8 Clonación de <i>Ehvps2</i> , <i>Ehvps20</i> , <i>Ehvps20(1-173)</i> , <i>EhVps24</i> , <i>Ehvps32(1-165)</i> y <i>Ehvps32-431</i> en el vector <i>pJET1.2/blunt</i>	42
6.9 Digestión de los plásmidos <i>pGEX-6P-1</i> , <i>pJET1.2-EhVps2</i> , <i>pJET1.2-EhVps20</i> , <i>pJET1.2-EhVps20(1-173)</i> , <i>pJET1.2-Ehvps24</i> , <i>pJET1.2-Ehvps32(1-165)</i> y <i>pJET1.2-EhVps32-431</i>	42
6.10 Subclonación de <i>Ehvps2</i> , <i>Ehvps20</i> , <i>Ehvps20(1-173)</i> , <i>Ehvps32(1-165)</i> y <i>Ehvps24</i> en el vector de expresión	43
6.11 Preparación de bacterias competentes congeladas	43
6.12 Transformación de células competentes	44
6.13 Conservación de bacterias transformadas	44
6.14 Purificación plasmídica	44
6.15 Secuenciación	45
6.16 Expresión de las proteínas recombinantes GST-EhVps2, GST-EhVps20, GST-EhVps20(1-173), GST-EhVps32(1-165) y GST-EhVps24	45

6.17	Análisis de la solubilidad de las proteínas recombinantes	46
6.18	Purificación de las proteínas recombinantes	46
6.19	Corte de la etiqueta de GST	47
6.20	Obtención de anticuerpos policlonales	47
6.21	Extracción de proteínas totales de <i>E. histolytica</i>	48
6.22	Electroforesis de proteínas en SDS-PAGE	49
6.23	Ensayo de <i>Western-blot</i>	49
6.24	Obtención de eritrocitos humanos	50
6.25	Ensayos de inmunofluorescencia	50
6.26	Microscopía electrónica de transmisión	51
6.27	Tinción negativa	52
6.28	Microscopía electrónica de barrido	52
6.29	Generación de Vesículas Unilamelares Gigantes (GUVs)	52
6.30	Marcaje de proteínas recombinantes EhVps20, EhVps20(1-173), EhVps32 y EhVps32(1-165) con Alexa 488	54
6.31	Análisis funcional de ESCRT-III en GUVs	54
6.32	Sobre-expresión de la proteína EhVps32	55
6.33	Silenciamiento de la proteína EhVps32	55
6.34	Ensayos de eritrofagocitosis	55
7.	Resultados	56
7.1	Análisis <i>in silico</i> de los miembros de la maquinaria ESCRT-III en <i>Entamoeba histolytica</i>	56
7.2	Estructura de las proteínas ESCRT-III	58
7.3	Clonación de EhVps2, EhVps20, EhVps20(1-173) y EhVps24	58
7.3.1	Clonación en <i>pJET1.2/blunt</i>	58
7.3.2	Clonación en <i>pGEX-6P-1</i>	68

7.4 Expresión y purificación de las proteínas recombinantes GST-EhVps2, GST-EhVps20, GST-EhVps20(1-173) y GST-EhVps24	68
7.4.1 Expresión y purificación de la proteína GST-EhVps2	81
7.4.2 Expresión y purificación de la proteína GST-EhVps20	81
7.4.3 Expresión y purificación de la proteína GST-EhVps20(1-173)	82
7.4.4 Expresión y purificación de la proteína GST-EhVps24	82
7.4.5 Expresión y purificación de la proteína GST-EhVps32(1-165)	82
7.5 Detección de las proteínas EhVps2, EhVps20, EhVps32 y EhVps24 en extractos amibianos	85
7.5.1 Producción de anticuerpos policlonales α -EhVps2, α -EhVps20, α -EhVps24 y α -EhVps32	85
7.5.2 Expresión y localización subcelular de la proteína EhVps2 en trofozoítos	88
7.5.3 Expresión y localización subcelular de la proteína EhVps20 en trofozoítos	93
7.5.4 Expresión y localización subcelular de la proteína EhVps24 en trofozoítos	93
7.6 Participación de las proteínas del complejo ESCRT-III durante la eritrofagocitosis	98
7.7 Polimerización <i>in vitro</i> de EhVps24 y EhVps32	99
7.8 Polimerización <i>in vivo</i> de EhVps32	110
7.9 Reconstitución de la maquinaria ESCRT-III en el modelo de vesículas gigantes unilamelares	110
7.10 Caracterización funcional <i>in vitro</i> de los miembros de la maquinaria ESCRT-III de <i>E. histolytica</i>	113
7.10.1 Unión de EhVps20 y EhVps32 a membranas cargadas negativamente	113
7.10.2 Análisis de la función de cada una de las proteínas del complejo ESCRT-III en el modelo de GUVs	113
7.10.3 Especificidad de miembros del complejo ESCRT-III hacia membranas cargadas negativamente	118
7.10.4 Acción de la maquinaria ESCRT-III mínima en membranas con separación de fase	121

7.11 Interacción entre los miembros del complejo ESCRT-III con otros miembros de la maquinaria ESCRT	124
7.12 Efectos de la sobre-expresión y el silenciamiento de EhVps32 en la eritrofagocitosis de <i>E. histolytica</i>	132
8. Discusión	137
9. Conclusiones	149
10. Perspectivas	150
11. Bibliografía	151

Índice de tablas:

Tabla 1. Secuencia de cada uno de los oligos diseñados para los cuatro genes estudiados, así como el tamaño del fragmento y la Tm	41
Tabla 2. Comparación de la maquinaria ESCRT-III de <i>E. histolytica</i> , <i>S. cerevisiae</i> y <i>H. sapiens</i>	57

Índice de figuras:

Fig. 1. Ciclo de vida de <i>E. histolytica</i>	6
Fig. 2. Estructura de la maquinaria ESCRT	18
Fig. 3. Modelo del direccionamiento dependiente de ubiquitina de proteínas transmembranales al endosoma	21
Fig. 4. Localización de EhVps32 en condiciones basales y durante la eritrofagocitosis	24
Fig. 5. Interacción <i>in vitro</i> de EhVps32 con el dominio Bro1 de EhADH	24
Fig. 6. Predicción estructural de las proteínas del complejo ESCRT-III	60
Fig. 7. Amplificación de los genes <i>Ehvps2</i> , <i>Ehvps20</i> , <i>Ehvps20(1-173)</i> , <i>Ehvps24</i> y <i>EhVps32(1-165)</i>	63
Fig. 8. Mapa del vector <i>pJET1.2/blunt</i>	65

Fig. 9. Clonación de los genes <i>Ehvps2</i> , <i>Ehvps20</i> , <i>Ehvps20(1-173)</i> , <i>Ehvps24</i> y <i>Ehvps32(1-165)</i> en el vector de transición <i>pJET1.2/blunt</i>	67
Fig. 10. Mapa del vector <i>pGEX-6P-1</i>	70
Fig. 11. Sub-clonación en el vector de expresión <i>pGEX-6P-1</i>	72
Fig. 12. Electroferograma de la secuencia nucleotídica del gen <i>Ehvps2</i>	74
Fig. 13. Electroferograma de la secuencia nucleotídica del gen <i>Ehvps20</i>	76
Fig. 14. Electroferograma de la secuencia nucleotídica del gen <i>Ehvps20(1-173)</i>	78
Fig. 15. Electroferograma de la secuencia nucleotídica del gen <i>Ehvps24</i>	80
Fig. 16. Inducción y purificación de las proteínas recombinantes GST-EhVps2, GST-EhVps20, GST-EhVps20(1-173) y GST-EhVps24	84
Fig. 17. Inducción y purificación de la proteína recombinante GST-EhVps32(1-165)	87
Fig. 18. Inmunodetección de las proteínas recombinantes utilizando los anticuerpos policlonales generados	89
Fig. 19. Inmunodetección de EhVps2 en <i>E. histolytica</i>	92
Fig. 20. Inmunodetección de EhVps20 en <i>E. histolytica</i>	95
Fig. 21. Inmunodetección de EhVps24 en <i>E. histolytica</i>	97
Fig. 22. Localización de EhVps32 durante el proceso de eritrofagocitosis	101
Fig. 23. Localización de EhVps24 durante el proceso de eritrofagocitosis	103
Fig. 24. Localización de EhVps20 durante el proceso de eritrofagocitosis	105
Fig. 25. Localización de EhVps2 durante el proceso de eritrofagocitosis	107
Fig. 26. Tinción negativa de GST-EhVps24 y GST-EhVps32	109
Fig. 27. Sobre-expresión de EhVps32	112
Fig. 28. Método de electroformación para generar GUVs	114
Fig. 29. Unión de EhVps20 y EhVps32 a membranas lipídicas	117
Fig. 30. Reconstitución de la maquinaria ESCRT-III	120
Fig. 31. Acción de la maquinaria ESCRT-III mínima sobre membranas cargadas negativamente	123

Fig. 32 Separación de fase en GUVs inducida por la proteína EhVps32	126
Fig. 33 Colocalización de EhVps32 con LysoTracker	129
Fig. 34 Colocalización de EhVps32 con EhADH	131
Fig. 35. Sobre-expresión de EhVps32	134
Fig. 36. Silenciamiento de EhVps32	136

ABREVIATURAS

°C	Grados centígrados
A	Adenina
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
C	Citosina
CP	Cisteína proteasa
DAPI	Diclorhidrato de 4',6-diamidino-fenilindol
dNTPs	Desoxinucléotidos trifosfato
DO	Densidad óptica
ESCRT	Del inglés <i>Endosomal Sorting Complex Required for Transport</i>
Fig.	Figura
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
G	Guanina
g	Gramos
GDP	Guanosín difosfato
GST	Glutación-S-transferasa
GTP	Guanosín trifosfato
GUVs	Del inglés <i>Giant Unilamellar Vesicles</i>
h	Hora
IPTG	Isorpopil- β -D-tio-galactósido
ILV	Del inglés <i>Intraluminal vesicle</i>
ITO	Del inglés
kb	Kilobases
kDa	Kilodaltones
LB	Medio Luria-Bertani
M	Molar
mA	Miliamperes

ml	Mililitros
mM	Milimolar
MVB	Del inglés <i>Multivesicular Bodie</i>
ng	Nanogramos
PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida
pb	Pares de bases
PBS	Solución amortiguadora salina de fosfatos
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PHMB	Para-hidroxi-mercuribenzoato
pI	Punto isoeléctrico
PC	Fosfatidilcolina
PS	Fosfatidilserina
POPC	1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicero-fosfocolina
POPS	1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicero-fosfoserina
rpm	Revoluciones por minuto
RT	Retrotranscriptasa
S	Segundo
SDS	Dodecilsulfato sódico
Snf	Del inglés <i>Sucrose non fermenting</i>
T	Timina
TAE	Solución amortiguadora de Tris, ácido acético glacial y EDTA
Tm	Temperatura de alineamiento
UI	Unidades internacionales
V	Volt
Vps	Del inglés <i>Vacuolar protein sorting</i>
x g	Gravedades
μl	Microlitros
μm	Micrómetro

Resumen

La maquinaria ESCRT (*Endosomal Sorting Complex Required for Transport*) participa en varias funciones relacionadas con las membranas biológicas y se encuentra conformada por los complejos 0, I, II, III y algunas proteínas accesorias (Vps4, Alix, Doa4). El complejo ESCRT-III (formado por Vps2, Vps20, Vps24 y Vps32) se ensambla en el sitio donde se produce la deformación de la membrana y participa en el proceso de escisión de la misma, un evento necesario para la maduración de los fagosomas. Este complejo está altamente conservado a través de la escala evolutiva, ya que se encuentra presente tanto en miembros del dominio Archaea como en eucariontes superiores.

En *Entamoeba histolytica* se han identificado *in silico*, a los homólogos de la maquinaria ESCRT y experimentalmente, se ha encontrado el transcrito de la mayoría de los genes que codifican para estas proteínas. Hasta el momento, se ha estudiado la función de EhADH y EhVps4, proteínas accesorias al complejo, así como la de EhVps32, del complejo ESCRT-III. Las tres proteínas estudiadas, EhADH, EhVps4 y EhVps32, se relocalizan alrededor de eritrocitos ingeridos durante la eritrofagocitosis, lo cual sugiere que participan de manera activa en este proceso.

El objetivo de este trabajo fue caracterizar las proteínas que conforman al ESCRT-III y estudiar su participación durante la eritrofagocitosis. Durante este proyecto encontramos que las proteínas EhVps2, EhVps20 y EhVps24 sufren cambios en su localización durante la eritrofagocitosis. Además, utilizamos el modelo de vesículas gigantes unilamelares (GUVs) para delimitar la función de cada una de estas proteínas. Nuestros resultados mostraron que EhVps20 es la primera proteína que se une a las membranas cargadas negativamente e inicia el reclutamiento del resto de la maquinaria. A continuación, EhVps32 genera invaginaciones en la membrana y posteriormente, EhVps24, se encarga de la escisión de la vesícula naciente durante la formación de cuerpos multivesiculares. En este ensayo, EhVps2 parece no ser necesaria para la formación de vesículas intraluminales.

La participación de la maquinaria ESCRT-III en la eritrofagocitosis se evaluó en trofozoítos que sobre-expresaron o sufrieron el silenciamiento de EhVps32, la proteína más abundante de este complejo. Nuestros resultados mostraron un aumento o disminución, respectivamente, del porcentaje de eritrocitos ingeridos por los trofozoítos transfectados. Estos resultados nos permiten concluir que la maquinaria ESCRT-III resulta esencial para la fagocitosis en *E. histolytica*.

Abstract

The ESCRT machinery (Endosomal Sorting Complex Required for Transport) participates in several membrane-related functions. This machinery is constituted by -0, -I, -II, and -III sub-complexes and some accessory proteins (Vps4, Alix, Doa4). ESCRT-III complex (formed by Vps2, Vps20, Vps24 and Vps32) is assembled in the site where the membrane is deforming and participates in the scission process, a key event for phagosome maturation. This complex is highly conserved across the eukaryotic lineage and members of this machinery can be found both in the Archae domain as well as in higher eukaryotes.

The homologues of ESCRT machinery have been identified in *Entamoeba histolytica* and the expression of the majority of these genes has been demonstrated. Until now, only three proteins have been studied, EhVps4 and EhADH, accessory proteins of the machinery and EhVps32 from the ESCRT-III complex. All of them are re-localized around ingested erythrocytes during erythrophagocytosis. These results suggest the participation of the ESCRT machinery in this process.

The objective of this project was to characterize the ESCRT-III proteins and to study their participation during *E. histolytica* erythrophagocytosis. In this project, we found that EhVps2, EhVps20 and EhVps24 undergo changes on their localization during erythrophagocytosis. Besides, we used the Giant Unilamellar Vesicles (GUVs) model to define the function of each of the proteins. Our results showed that EhVps20 is the first protein that binds to negatively-charged membranes and initiates the recruitment of the rest of the machinery. Then, EhVps32 generates invaginations in the membrane of the GUV. Finally, EhVps24 produces the scission of the nascent vesicle, forming the intraluminal vesicles (ILVs). In this model, EhVps2 appears not to be essential for the formation of ILVs.

Moreover, the ESCRT-III participation during erythrophagocytosis was evaluated in trophozoites over-expressing EhVps32 or EhVps32-silenced. This is the most abundant protein of the complex. Our results showed an increase or decrease, respectively, of the percentage of ingested erythrocytes. Putting all these results together, we conclude that ESCRT-III machinery is vital for phagocytosis in *E. histolytica*.

1. Introducción

1.1 Epidemiología de la amibiasis

Entamoeba histolytica es el protozoo parásito del intestino humano que causa la enfermedad conocida como amibiasis, considerada como la tercer causa de muerte a nivel mundial debida a enfermedades parasitarias, antecedida sólo por la esquistosomiasis y la malaria (Mortimer y Chadee, 2010). Se estima que el 10% de la población mundial está infectada por *E. histolytica*, lo que resulta en aproximadamente 50 millones de casos de amibiasis invasora y hasta 100 mil muertes por año (Ximénez et al., 2007). La amibiasis invasiva tiene lugar cuando los trofozoítos de *E. histolytica* colonizan y penetran la pared del intestino produciendo disentería aguda fulminante con cuadros febriles, o bien disentería amibiana con diarrea muco-sanguinolenta (Ximénez et al., 2007). En algunos casos existe diseminación amibiana a otros órganos, en especial al hígado, en donde se forma el absceso hepático amibiano, que de no ser tratado puede resultar fatal (Pritt y Clark, 2008).

Las zonas de mayor endemia son los países tropicales y subtropicales, siendo factores importantes, los rasgos sociodemográficos y la accesibilidad a los servicios sanitarios (Ximénez et al., 2007). En países desarrollados, las poblaciones en riesgo de contraer la infección por *E. histolytica* incluyen residentes, inmigrantes y viajeros hacia áreas endémicas como México, América Central, Sudamérica, Asia, India, África e Islas del Pacífico; hombres que tienen relaciones sexuales con hombres y personas que viven en orfanatos (Haque et al., 2003; Stanley, 2003; Weinke et al., 1990). En México, la amibiasis se considera un problema de salud muy importante, ya que refleja el rezago en las condiciones higiénicas de la población; además, constituye la parasitosis más frecuente en niños y en adolescentes (González-Ruiz, 1990). Sin embargo, en años recientes se ha observado una tendencia al decremento en el número de casos (González-Ruiz, 1990). El último reporte epidemiológico reveló que para Septiembre del año 2015 existieron 177,169 nuevos casos reportados en nuestro país (SUIVE/DGE/SALUD, 2015).

1.2 Taxonomía de *E. histolytica*

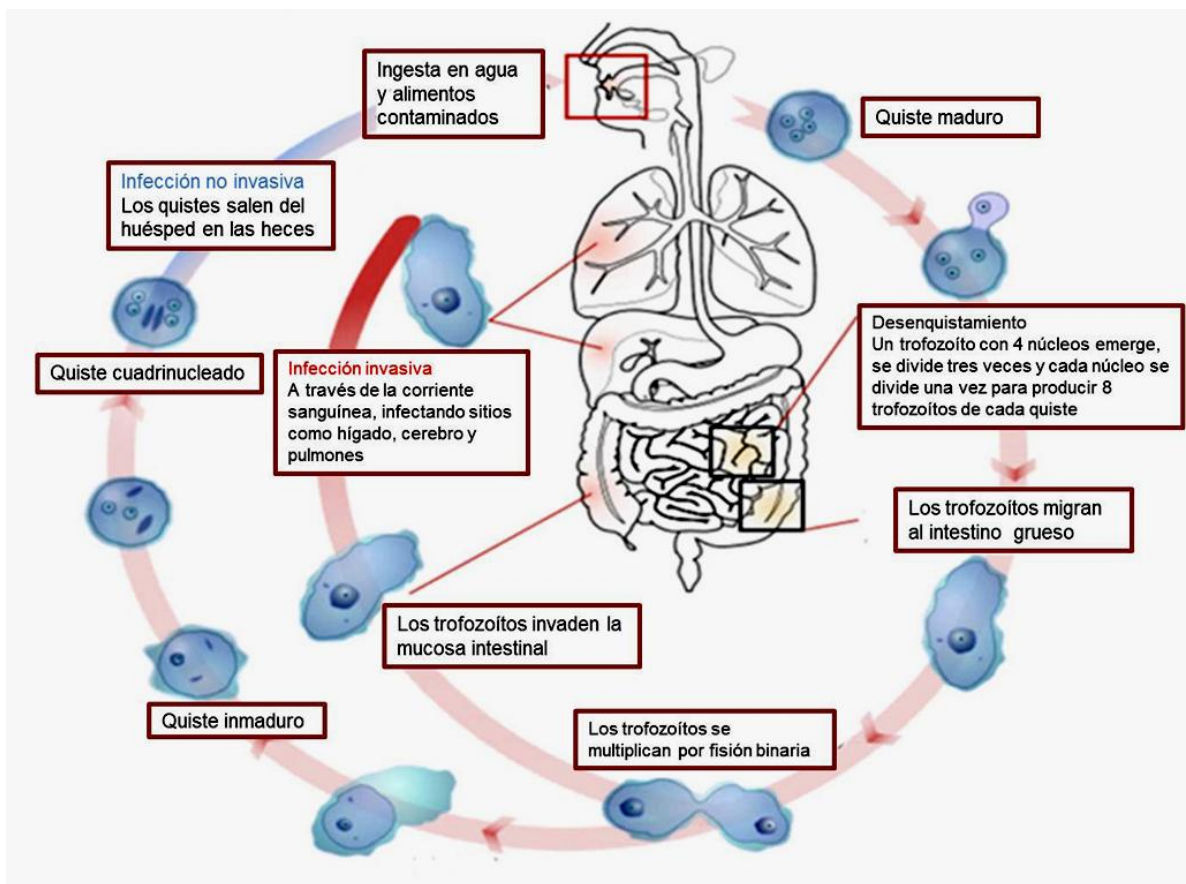
La clasificación taxonómica aceptada a partir de 1994 para la especie *Entamoeba histolytica* corresponde al reino *Protista*, Phylum *Amoebozoa*, subphylum *Sarcodina*, superclase *Rhizopoda*, clase *Archamoebae*, Subclase *Gymnamoebia*, orden *Entamoebida*, familia *Entamoebidae* y género *Entamoeba* (Ximénez et al., 2007). En el ser humano sólo cuatro especies del género *Entamoeba* producen infección: *E. histolytica*, *E. dispar*, *E. moshkovskii* (Martínez-Palomo, 1993) y la recientemente caracterizada *E. bangladeshi* (Royer et al., 2012).

1.3 Ciclo de vida de *E. histolytica*

E. histolytica presenta dos formas de vida: el quiste y el trofozoíto. El quiste es la forma infectiva y consiste en una estructura redondeada cuyo tamaño es de 10 a 16 μm ; posee de uno a cuatro núcleos y presenta una cubierta gruesa que le otorga sus propiedades de resistencia, especialmente en climas húmedos (Gómez et al., 2007). El trofozoíto tiene un diámetro de 20 a 40 μm y es móvil gracias a su ectoplasma que le permite formar pseudópodos; su núcleo presenta un cariosoma compacto central además de cromatina en gránulos uniformes en tamaño y localización (Haque et al., 2003).

La transmisión de *E. histolytica* se realiza por la vía fecal-oral (Gómez et al., 2007). La infección inicia por la ingesta de quistes presentes en bebidas o alimentos contaminados. Debido a su cubierta externa el quiste no se daña por la acción de enzimas ni por el microambiente que existe en el estómago. Una vez que el quiste llega al intestino delgado (íleon terminal), sufre un proceso de desenquistamiento y emergen los trofozoítos que migran hacia el intestino grueso, donde pueden o no desarrollar infección invasiva (Gómez et al., 2007). El trofozoíto coloniza la mucosa intestinal del colon, sitio en el cual lleva a cabo su reproducción asexual y se multiplica por fisión binaria. Si el trofozoíto continúa avanzado por el colon, inicia su proceso de enquistamiento y el quiste es posteriormente expulsado con la materia fecal, donde puede permanecer viable en el medio ambiente durante varios días (Tanyuksel y Petri, 2003). Por su parte, el trofozoíto puede migrar por vía hemática al hígado o a otros órganos y causar la infección extraintestinal (Fig. 1) (Ximénez et al., 2007).

Figura 1. Ciclo de vida de *E. histolytica*. La infección inicia con la ingesta de quistes en agua o comida contaminada. El quiste viaja a través del aparato digestivo y se desenquista en el intestino dando lugar a los trofozoítos, los cuales llevan a cabo la reproducción asexual en el colon. El trofozoíto puede seguir su camino por el colon e iniciar su proceso de enquistamiento para ser posteriormente expulsado en las heces; o bien, puede iniciar el proceso infeccioso y dañar la pared del intestino. En algunos casos, el trofozoíto alcanza la vía hemática y origina daño hepático (infección extraintestinal) (Tomado de: Mahon y Manuselis, 2000).



1.4 Patogenicidad de *E. histolytica*

En 1903 Schaudinn asignó al parásito entérico el nombre de *E. histolytica* debido a su habilidad para destruir tejidos humanos. Los trofozoítos de *E. histolytica* poseen la capacidad de destruir *in vitro* una amplia variedad de líneas celulares de origen humano, así como neutrófilos humanos, linfocitos T, eritrocitos y macrófagos (Ragland et al., 1994). El tejido principal que destruye *E. histolytica* en su paso por el cuerpo humano es el epitelio del intestino grueso y en menor grado el hígado, el pulmón, el cerebro y la piel (Olivos-García et al., 2011). Es probable que las lesiones en el pulmón y la piel sean ocasionadas debido a su cercanía con el intestino o el hígado infectados (Olivos-García et al., 2011). Las lesiones se caracterizan por una zona central de necrosis, con parásitos restringidos en la periferia y rodeados principalmente por un infiltrado inflamatorio de tipo linfocitario y mononuclear (Faust et al., 2011).

La interacción entre los trofozoítos y sus células blanco consta de tres pasos (Orozco et al., 1985; Ravdin et al., 1988):

- 1) Adherencia
- 2) Citólisis
- 3) Fagocitosis

1.4.1 Adherencia

La infección por *E. histolytica* se establece una vez que el parásito se adhiere a la capa de mucina presente en el colon (Marie y Petri, 2014). Los trofozoítos de *E. histolytica* tienen la propiedad de unirse a células del huésped que infectan, así como a materiales inertes como plástico o vidrio (Sengupta et al., 2009).

Una vez que los trofozoítos se establecen en el lumen del intestino, migran hacia el intestino grueso en donde se adhieren a la mucosa intestinal, al epitelio y a las células inflamatorias del huésped. Este mecanismo es mediado por lectinas, de las cuales la más estudiada es la Gal/GalNAc que se une a residuos de galactosa/N-acetil-galactosamina (Gal/GalNAc) presentes en la capa de la glicoproteína mucina (Allen et al., 1998; Petri et al., 2002; Ravdin y Guerrant, 1981; Ravdin et al., 1985).

Otra proteína que participa de manera importante en el proceso de adhesión de *E. histolytica* es la adhesina de 112 kDa, que forma parte del complejo EhCPADH112 (Arroyo y Orozco, 1987; García-Rivera et al., 1999). El complejo EhCPADH112 es un

polipéptido localizado en la superficie de los trofozoítos, que al ser bloqueado con un anticuerpo monoclonal, se observa una reducción drástica *in vitro* en las principales propiedades de virulencia de la amiba: adhesión, eritrofagocitosis, efecto citopático y efecto citotóxico (Arroyo y Orozco, 1987; García-Rivera et al., 1999; Rodríguez y Orozco, 1986).

Este complejo está formado por una adhesina codificada por el gen *Ehadh112* que se encuentra adyacente al gen *Ehcp112*, el cual codifica para una cisteína proteasa (García-Rivera et al., 1999). Este último gen se encuentra flanqueado por el gen *EhrabB* localizado 332 pb río arriba del codón de inicio de la traducción del gen *Ehcp112*. Aunque EhRabB se transcribe a partir de la cadena complementaria (Rodríguez y Orozco, 2000). Los genes *Ehadh112*, *Ehcp112* y *EhrabB* se empalman en una región de 4500 pb conocida como el locus de virulencia VI (Flores-Soto et al., 2005). EhADH contiene tres segmentos transmembranales putativos y cuatro posibles sitios de glicosilación en su extremo N-terminal (García-Rivera et al., 1999). Además tiene un dominio Bro1 en su extremo N-terminal que la ubica dentro de la familia de las proteínas Alix/AIP1 involucradas en los procesos de transducción de señales (Bañuelos et al., 2005).

Además de estas proteínas, se han identificado otras moléculas que participan en el proceso de adhesión, como una lectina inhibida por oligosacáridos de N-acetilglucosamina, que tiene un peso molecular de 220 kDa (Kobiler y Mirelman, 1980; Rosales-Encina et al., 1987), y las proteínas de 90, 70, 50 y 24 kDa identificadas por ensayos de ligando (Rodríguez et al., 1989). Por otro lado, existen proteoglicanos (PPGs) anclados a glicosilfosfatidilinositol (GPI) que son las moléculas más abundantes en la superficie del trofozoíto. Anticuerpos dirigidos contra estas moléculas reducen las capacidades de adhesión y citotoxicidad del parásito (Marinets et al., 1997). De igual manera, la proteína rica en lisina y ácido glutámico KERP1 y la proteína rica en serina y treonina denominada STIRP han sido probadas como moléculas de adhesión a células inmunes (Marquay Markiewicz et al., 2011; Seigneur et al., 2005).

Además de moléculas de adhesión a las células vivas, *E. histolytica* también posee receptores para el reconocimiento de células apoptóticas, entre ellos, la proteína rica en Serinas (SHREP) de 52 kDa (Stanley et al., 1990; Teixeira y Huston, 2008), la calreticulina presente en su superficie celular (Vaithilingam et al., 2012) y la cinasa transmembranal TMK96 (Boettner et al., 2008).

1.4.2 Citólisis

E. histolytica es capaz de matar e ingerir células del huésped en cuestión de minutos de una manera dependiente de contacto (Ralston y Petri, 2011). El efecto citopático de la amiba depende de la temperatura y se lleva a cabo de manera óptima a la temperatura corporal del ser humano, es decir, a 37°C (Ravdin et al., 1988). Los principales efectos citotóxicos sobre las células huésped incluyen incremento de Ca^{2+} intracelular, producción de especies reactivas de oxígeno, pérdida de la integridad de membrana, fragmentación de ADN, exposición de fosfatidilserina y activación de caspasa-3 (Ralston y Petri, 2011).

Por otro lado, dentro del proceso de virulencia participan efectores citotóxicos secretados de una forma regulada y dependiente de contacto, entre los que se encuentran los amebaporos, un grupo de proteínas formadoras de poros, cuya secuencia es similar a proteínas permeabilizadoras de membrana, como NK-lisina y la granulicina de mamíferos (Ralston y Petri, 2011). Los amebaporos forman canales iónicos en la membrana de la célula huésped por su asociación irreversible en oligómeros, similar al componente C9 del complemento y a la perforina de los linfocitos T citotóxicos (Leippe, 1992). Los tres amebaporos presentes en el genoma de *E. histolytica* A, B y C pueden inducir la formación de poros en liposomas sintéticos y presentan actividad máxima a pH 5.2 (Zhang et al., 2004).

Además, el genoma de *E. histolytica* posee 86 genes que codifican para proteasas putativas pertenecientes a todos los subgrupos: 50 cisteína-proteasas (CPs), 10 serina-proteasas, 4 aspartato-proteasas y 22 metaloproteinasas (Tillack et al., 2007). Sin embargo, solo una fracción de estos genes parece ser transcrita por parásitos cultivados *in vitro* (Bruchhaus et al., 2003). Las CPs son abundantes en *E. histolytica* y actúan en una amplia variedad de sustratos del huésped, además de tener una función en la invasión del tejido y la degradación del moco del epitelio del colon (Ralston y Petri, 2011). El 90% de la actividad proteolítica presente en extractos de trofozoítos amibianos se debe a la acción de 5 CPs: EhCP-A1, EhCP-A2, EhCP-A5, EhCP-A7 (Irmer et al., 2009) y EhCP112 (Ocádiz et al., 2005). Las cisteína proteasas purificadas de *E. histolytica* degradan elementos de la matriz extracelular (colágena, elastina, fibrinógeno y laminina) que los trofozoítos deben penetrar para invadir el epitelio (Keene et al., 1990; Luaces y Barrett, 1988). La sobre-expresión de la proteína EhRab11B en trofozoítos de *E. histolytica* genera un incremento en la actividad de las cisteína proteasas secretadas: EhCP-A1, EhCP-A2 y EhCP-A5

sugiriendo que la ruta secretoria de estas enzimas proteolíticas se encuentra relacionada con EhRab11B (Mitra et al., 2007). *E. histolytica* degrada la mucosa del colon con enzimas proteolíticas como la cisteína proteasa A5 (Faust et al., 2011). CP-A5 también posee un motivo RGD de unión a integrinas, el cual es capaz de unirse a la integrina $\alpha\beta3$ presente en enterocitos humanos y desencadenar una respuesta inflamatoria dependiente de NF κ B (Hou et al., 2010), la cual participa en el proceso de formación del absceso hepático (Ankri et al., 1999).

Entre las CPs mejor estudiadas se encuentra la EhCP112 que forma parte del complejo EhCPADH112 descrito anteriormente. Esta proteasa posee un dominio RGD de posible interacción con las integrinas celulares (García-Rivera et al., 1999) y cuenta con una secuencia hidrofóbica que pudiera anclarla a la membrana celular (García-Rivera et al., 1999). Más aún, se ha observado que EhCP112 presenta actividad proteolítica significativa en geles de poliacrilamida co-polimerizados con gelatina (García-Rivera et al., 1999; Ocádiz et al., 2005), además posee la capacidad de unirse y destruir colágena, fibronectina y monocapas de células MDCK *in vitro* e *in vivo*, y unirse y destruir glóbulos rojos y hemoglobina (Ocadiz et al., 2005).

Los productos secretados amebianos poseen efectos contacto-independientes en las uniones estrechas y en la absorción de iones, lo cual origina la diarrea (Marie y Petri, 2014).

E. histolytica posee además, vesículas intracelulares ácidas (pH 5.4) que pudieran tener un papel en la citotoxicidad (Ralston y Petri, 2011). Finalmente, la fosfolipasa A, una enzima ubicada en la membrana plasmática de los trofozoítos que requiere calcio para su actividad participa durante el proceso de lisis de las células blanco (Long-Krug et al., 1985).

1.4.3 Fagocitosis

El proceso endocítico constituye uno de los factores clave en la virulencia de *E. histolytica* (Marion et al., 2005; Okada et al., 2006). La fagocitosis es la capacidad de los trofozoítos de ingerir microorganismos, así como células del hospedero, entre las que se incluyen células inmunes y no inmunes (Marion et al., 2005). En otros organismos, la fagocitosis constituye el paso final en la vía de la apoptosis y sirve para limitar la inflamación; por lo que en *E. histolytica*, la ingestión de células inmunes y no inmunes podría limitar igualmente la respuesta inflamatoria del hospedero y permitir que el protozoo establezca una infección persistente

(Mortimer y Chadee, 2010). Amibas mutantes, deficientes en su capacidad fagocítica, son defectuosas en la destrucción de cultivos de células de mamíferos *in vitro*, así como en la formación de abscesos hepáticos *in vivo*, lo cual resalta la importancia de este proceso (Orozco et al., 1983; Orozco et al., 1985; Rodríguez y Orozco, 1986).

En *E. histolytica* la fagocitosis puede ser de dos tipos: a) no específica, por medio de la cual, los trofozoítos ingieren partículas como almidón, látex, hierro, etc. y en donde el contacto inicial parece estar mediado por fuerzas electrostáticas (Bailey et al., 1990) y, b) un mecanismo altamente específico, en el cual intervienen las adhesinas que participan en el reconocimiento y unión de los trofozoítos a la célula blanco (Arroyo y Orozco, 1987).

En el proceso de fagocitosis participan varias estructuras, entre ellas microfilamentos amibianos (Guerrant et al., 1981), componentes del citoesqueleto como miosina IB y una proteína semejante a espectrina (Marion et al., 2005; Voigt et al., 1999), reguladores de la estructuración del citoesqueleto como las GTPasas Rho y RacG (Godbold y Mann, 1998; Guillen et al., 1998), cinasas como EhPAK, que controlan motilidad y fagocitosis en la amiba (Labruyere et al., 2003) y, probablemente moléculas que regulan la endocitosis como EhRab5, EhRab7 y EhRabB (Rodríguez y Orozco, 2000; Saito-Nakano et al., 2004; Welter et al., 2002). Además, se ha demostrado que durante el proceso de fagocitosis el complejo EhCPADH112 se une a las moléculas blanco y es internalizado junto con las moléculas endocitadas (García-Rivera et al., 1999; Rodríguez et al., 1989).

1.4.3.1 Trogocitosis

Recientemente se descubrió que los trofozoítos de *E. histolytica* son capaces de ingerir trozos de células vivas intactas mediante un proceso denominado trogocitosis. Este proceso activo, similar a la fagocitosis amibiana, requiere la adhesión a la célula blanco, así como a EhC2PK, un regulador temprano de la fagocitosis. Después del contacto con la célula, la amiba internaliza diferentes fragmentos de la membrana plasmática. La trogocitosis induce un rápido aumento en la concentración de Ca^{2+} intracelular en la célula blanco que culmina con la muerte celular, momento en el cual cesa la ingestión de fragmentos (Ralston et al., 2014).

1.5 Tráfico vesicular en *E. histolytica*

El tráfico vesicular tiene un papel fundamental en la formación y el mantenimiento de diferentes compartimientos intracelulares así como en la comunicación entre las células y su ambiente (Vassilieva y Nusrat, 2008). Una manera simplificada del tráfico vesicular describe dos rutas intracelulares principalmente: endocitosis y exocitosis. Ambas rutas requieren varios pasos que involucran la fusión de vesículas con diferentes compartimientos celulares. La formación de vesículas representa un proceso complejo que involucra una gran cantidad de moléculas (Vassilieva y Nusrat, 2008), en el cual participa el sistema endomembranoso (SE). El SE se define como el conjunto de membranas en el citoplasma de una célula eucarionte y divide a la misma en compartimientos estructurales y funcionales. Este sistema es responsable de la biosíntesis y transporte de lípidos y proteínas y se encuentra compuesto por la membrana nuclear, el retículo endoplásmico, el aparato de Golgi, los lisosomas y los endosomas (Field y Dacks, 2009). En *E. histolytica* los compartimientos celulares que involucran el tráfico vesicular no han sido bien establecidos. Un análisis ultraestructural en trofozoítos de *E. histolytica* reveló la presencia de estructuras similares a retículo endoplásmico liso, así como estructuras parecidas al aparato de Golgi (Chavez-Munguía et al., 2000). De igual manera, mediante el uso de anticuerpos dirigidos contra proteínas localizadas en el retículo endoplásmico rugoso y el aparato de Golgi de otros eucariontes, se identificaron estructuras similares a estos organelos en la amiba (Ghosh et al., 1999). A pesar de que en los trofozoítos de *E. histolytica* no se observan organelos clásicos visibles como peroxisomas, retículo endoplásmico rugoso (RER) y aparato de Golgi, las amibas conservan funciones asociadas a ellos (Smith y Guillen, 2010).

El tráfico vesicular se encuentra implicado en muchos aspectos de la virulencia de *E. histolytica*. Por ejemplo, el movimiento característico de los trofozoítos, depende del movimiento interno de vesículas hacia la membrana plasmática para la formación de los pseudópodos (Bretscher y Aguado-Velasco, 1998; Welter y Temesvari, 2004). Así mismo, el tráfico vesicular es imprescindible durante la fagocitosis (Orozco et al., 1985) y durante la secreción de moléculas hacia los lisosomas y fagosomas para desintegrar sustancias internalizadas por la amiba; o bien, para la secreción extracelular de vesículas con moléculas líticas, importantes en la invasión tisular (Okada et al., 2006).

1.6 Endocitosis y cuerpos multivesiculares (MVBs)

En general, la endocitosis implica la formación e internalización de vesículas originadas en la membrana lipídica junto con proteínas embebidas en ella o moléculas del espacio extracelular, comúnmente denominadas moléculas cargo. La endocitosis comienza con la generación de vesículas a partir de la membrana plasmática que se fusionan con el endosoma temprano. El endosoma temprano sirve como un eje para múltiples vías, incluyendo el reciclaje de receptores superficiales hacia la membrana plasmática, la fusión de vesículas derivadas del aparato de Golgi o bien, su direccionamiento hacia el lumen del lisosoma en donde las partículas ingeridas son finalmente degradadas (Cabrera y Ungermann, 2010; Lemmon y Traub, 2000; Peñalva et al., 2008). Los endosomas tardíos son las estructuras responsables de conectar la ruta de reciclaje con la vía degradativa dirigiendo moléculas endocitadas hacia lisosomas (Huotari y Helenius, 2011).

El lisosoma tiene un papel importante en la degradación de lípidos y proteínas celulares. Para poder llevar a cabo su función degradativa, los lisosomas poseen una gran cantidad de hidrolasas que son transportadas en forma inactiva a través de la vía biosintética y son activadas proteolíticamente una vez que llegan a esta estructura. La entrada de proteínas transmembranales, así como de receptores superficiales celulares activados (tanto para degradación como para regulación) o de hidrolasas (para su correcta localización), requiere la formación de cuerpos multivesiculares (MVBs por sus siglas en inglés *multivesicular bodies*) (Bishop et al., 2002).

Los MVBs fueron descritos por primera vez en 1959 en ovocitos de rata (Sotelo, 1959); sin embargo, su existencia fue revelada previamente en 1955, gracias a los avances en microscopía electrónica, debido a su morfología peculiar en una amplia variedad de células de mamífero como basófilos (Palade, 1955) y neuronas (Palay y Palade, 1955). Los MVBs son producto de un compartimento derivado de los endosomas tardíos. Tienen un tamaño aproximado de 400-500 nm en eucariontes superiores (Gruenberg y Stenmark, 2004). Estos cuerpos son formados mediante la invaginación de la membrana endosomal, creando vesículas, relativamente uniformes, de aproximadamente 50 nm en el lumen del citoplasma, denominadas vesículas intraluminales (ILVs por sus siglas en inglés *intraluminal vesicles*). El direccionamiento endosomal de proteínas membranales endocitadas hacia los MVBs requiere de señales específicas, de las cuales la más caracterizada es la monoubiquitinación (Gruenberg y Stenmark, 2004; Woodman y Futter, 2008).

En las células de mamíferos, además de formar parte del sistema endosomal para la degradación de proteínas transmembranales, los MVBs también participan en el proceso de gemación de virus envueltos como HIV (del inglés, *Human Immunodeficiency Virus*) y EIAV (del inglés, *Equine Infectious Anemia Virus*) (Martín-Serrano et al., 2003) y en la degradación de lípidos (Bishop et al., 2002; Iwaki et al., 2007). Adicionalmente, muchas proteínas críticas para el crecimiento y desarrollo celular son direccionadas a los MVBs, por ejemplo, el receptor del factor de crecimiento epidermal (Haigler et al., 1979). La regulación de este receptor activado es fundamental para evitar señalizaciones celulares aberrantes, las cuales provocarían una proliferación celular descontrolada (Katzmann et al., 2002). Por todo esto, se puede decir que los MVBs participan tanto en procesos normales celulares como en eventos patogénicos.

1.7 Complejo ESCRT

El proceso de formación de los MVBs requiere la acción secuencial de varios complejos proteicos denominados complejos de dirección endosomal requeridos para el transporte o ESCRTs, por sus siglas en inglés: “*Endosomal Sorting Complex Required for Transport*” (Leung et al., 2008). El sistema ESCRT en eucariontes está compuesto por cinco grupos proteicos: ESCRT-0, ESCRT-I, ESCRT-II, ESCRT-III y una serie de proteínas accesorias que se ensamblan de manera coordinada para desencadenar la formación de vesículas intraluminales (Katzmann et al., 2002).

La maquinaria ESCRT ayuda en el proceso de remodelación de la membrana provocando la invaginación de la misma hasta que se lleva a cabo la escisión de la membrana, formando la vesícula intraluminal (Mueller et al., 2012). Una vez que la maquinaria ESCRT cumple su función, los complejos son disociados de la membrana blanco a través de la ATPasa tipo AAA denominada Vps4, de tal manera que los componentes ESCRT son reciclados de vuelta al citoplasma (Babst et al., 1998).

Prácticamente todos los componentes del sistema ESCRT descritos en levadura tienen al menos un homólogo en organismos multicelulares (Winter y Hauser, 2006), donde el núcleo de este sistema es prácticamente universal, lo cual indica la presencia de esta maquinaria en el organismo LECA (Koumandou et al., 2013). Este análisis sugiere que la función del sistema ESCRT y su reclutamiento a membranas endosomales, se encuentra altamente conservado en toda la línea eucariótica, desde levaduras hasta el humano, lo cual resalta la importancia de esta ruta de transporte

(Katzmann et al., 2002). Sin embargo, la duplicación de algunos genes plantea la posibilidad de papeles alternativos para los componentes del sistema ESCRT.

Estudios filogenéticos relevaron que los genes del sistema ESCRT emergieron durante la evolución de los eucariontes (Field y Dacks, 2009); se cree que en el organismo LECA (*last eucaryotic common ancestor*), existió un complejo primordial formado por un factor único similar a Snf7/Vps32 y relacionado con Vps2 derivado de una proteína del reino Archae. Este factor único sufrió duplicaciones permitiendo la diversificación hacia la maquinaria ESCRT-III y a las proteínas asociadas al complejo ESCRT-III (Field y Dacks, 2009; Leung et al., 2008). El reclutamiento subsecuente de las subunidades ESCRT-I y ESCRT-II, posterior al LECA, terminaron por originar el sistema ESCRT, siendo ESCRT-0 el último componente en surgir en una manera específica de linaje (Field y Dacks, 2009).

Los componentes del sistema ESCRT-III también se han identificado en el reino Archaea (Lindas et al., 2008) donde participan en la deformación de la membrana durante la citocinesis (Samson et al., 2008). Esta función ancestral se mantiene en eucariontes, donde factores de la maquinaria ESCRT son reclutados durante la escisión de la membrana plasmática en los pasos finales de la citocinesis (Morita et al., 2007).

1.7.1 ESCRT en levadura

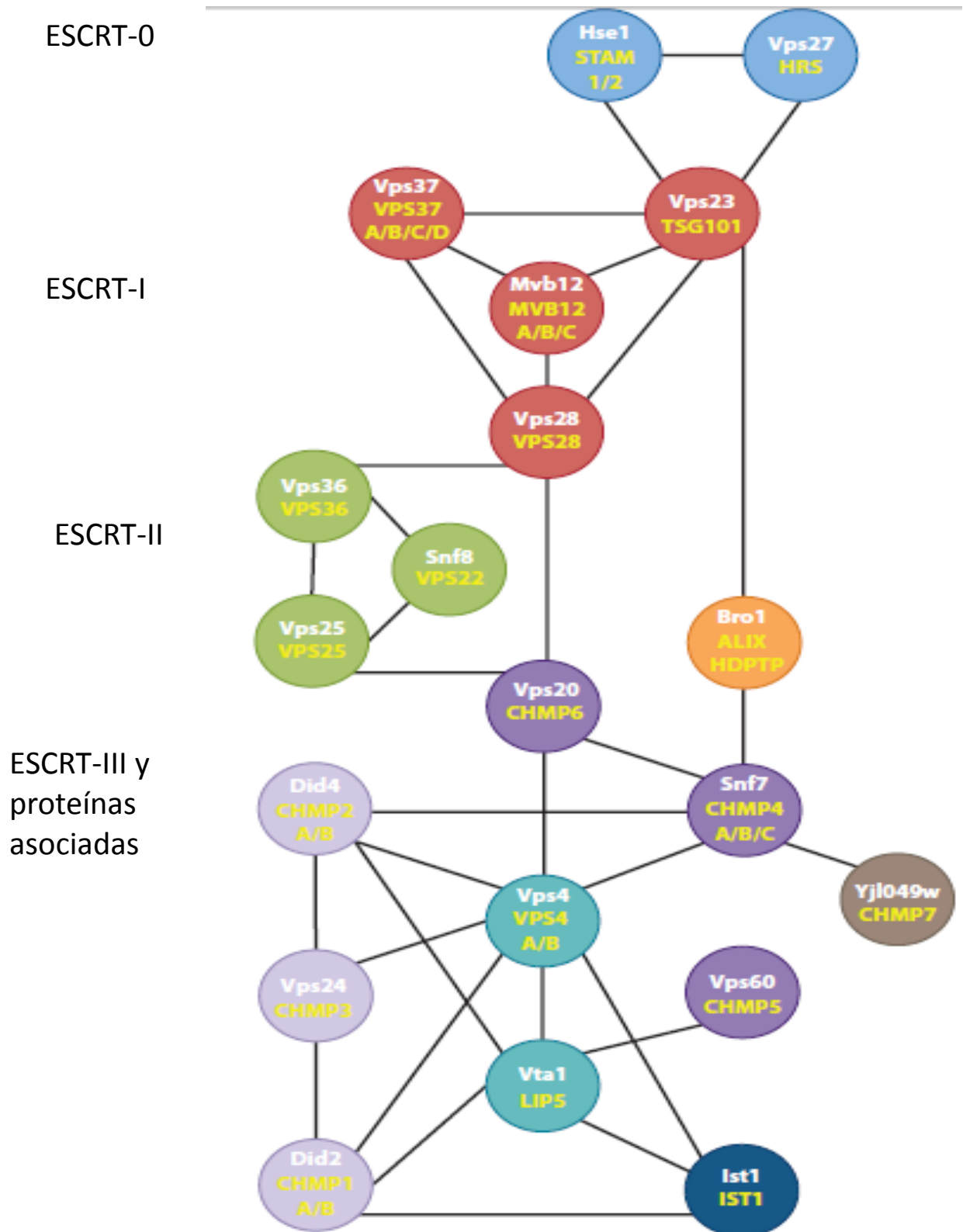
La maquinaria ESCRT fue originalmente descrita en la levadura *Sacharomyces cerevisiae*. En esta especie, el direccionamiento de moléculas cargo y la unión de vesículas en el lumen de los MVBs dependen de una red de aproximadamente 21 proteínas que actúan mediante un proceso altamente regulado (Babst, 2005). Estas proteínas son moléculas vacuolares de clase E (por participar en la formación de compartimientos endosomales), también llamadas Vps (por sus siglas en inglés: “*vacuolar proteins sorting*”) (Leung et al., 2008). Mutaciones en los genes *vps*, producen un sistema deficiente de transporte de hidrolasas recién sintetizadas, acumulándose en un compartimiento anormal perivacuolar de clase E, el cual es incapaz de dirigir moléculas hacia vesículas internas. Dichos resultados sugieren que el direccionamiento de receptores, como la invaginación interna de la membrana, están directa o indirectamente regulados por proteínas Vps (Bishop et al., 2002).

En levadura el complejo ESCRT-0 está conformado por Vps27 y Hse1; ESCRT-I está constituido por Vps37, Vps23, Vps28 y Mvb12; ESCRT-II se encuentra formado por Vps36, Vps22 y Vps25; ESCRT-III es conformado por Vps20, Snf7/Vps32, Vps2 y Vps24; y finalmente, el grupo de proteínas asociadas al ESCRT-III está conformado por las llamadas proteínas accesorias Vps31, Vps4, Vps46, Vps60, Vta1, Ist1, BRO1 y la enzima desubiquitinizadora Doa4 (Fig. 2) (Curtiss et al., 2007; Iwaki et al., 2007; Luhtala y Odorizzi, 2004).

La formación del sistema ESCRT comienza con la unión del complejo ESCRT-I a la membrana del endosoma, dicha unión depende de la interacción del ESCRT-I con el complejo ESCRT-0, el cual actúa como un receptor clasificador de las proteínas cargo monoubiquitinadas en los MVBs (Fig. 3) (Curtiss et al., 2007). Vps27, que forma parte del complejo ESCRT-0, se encuentra en endosomas tempranos y tardíos y su correcta localización depende de su dominio FYVE, a través del cual se une a un lípido típico de endosomas denominado fosfatidilinositol-3-fosfato [PtdIns (3)P]. Vps27, a través de su motivo de unión a clatrina, concentra y localiza moléculas cargo en los MVB's (Babst, 2005) y junto con Hse1, unen a la ubiquitina de la molécula cargo, a través de sus motivos UIM (*Ubiquitin Interacting Motif*) (Hurley, 2008).

Una vez que la molécula cargo se encuentra unida a la membrana, Vps27 mediante sus motivos P(S/T)XP recluta al complejo soluble heterotetramérico ESCRT-I, a través del dominio UEV (*Ubiquitin E2 Variant*) de la proteína Vps23 (Hurley, 2008). Las moléculas del complejo ESCRT-I se unen a las proteínas cargo ubiquitinadas, por medio de sus dominios de unión a ubiquitina y activan al complejo ESCRT-II. El complejo ESCRT-II activado inicia el reclutamiento, desde el citoplasma hacia el compartimiento endosomal, de proteínas monoméricas pequeñas de tipo "coiled-coil", seguido por la oligomerización de las mismas, resultando en la formación del complejo ESCRT-III (Iwaki et al., 2007). El complejo ESCRT-III es el encargado de concentrar las proteínas cargo en los MVBs. Dentro del complejo ESCRT-III, las proteínas Vps2 y Vps24 son homólogas entre sí, de igual manera que Vps20 y Vps3. Estos dos pares de proteínas homólogas forman dos subcomplejos dentro del complejo ESCRT-III (Babst et al., 2002a).

Figura 2. Estructura de la maquinaria ESCRT: El sistema ESCRT está compuesto por cinco grupos proteicos principales: ESCRT-0, ESCRT-I, ESCRT-II, ESCRT-III y ESCRT-III asociado. Estos complejos funcionan de forma secuencial en la clasificación de proteínas transmembranales hacia los MVBs. Las letras en color blanco indican el nombre de las proteínas presentes en la levadura mientras que las letras en color amarillo representan sus homólogos en el ser humano. Las líneas indican la manera en la que se asocian las proteínas, según datos experimentales (Tomado de: Hanson y Cashikar, 2012)



La formación del subcomplejo Vps20/Vps32, que está en contacto directo con el endosoma, es necesaria para que el complejo Vps2/Vps24 se forme, pero no en el sentido inverso (Katzmann et al., 2002). Vps32 se asocia al residuo conservado de 367 aminoácidos de la proteína accesoria Bro1 (Alix en humano o EhADH en *Entamoeba histolytica*), la cual recluta a la enzima desubiquitinizadora Doa4, que remueve la ubiquitina de la proteína cargo (Fig. 3).

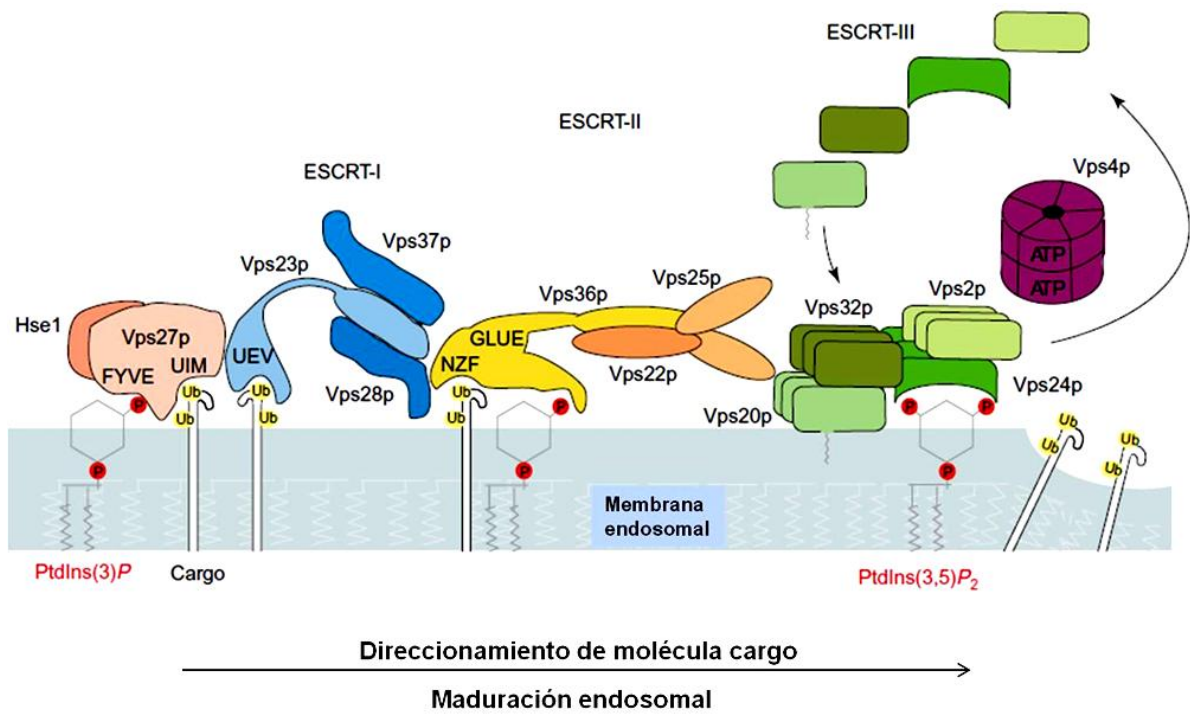
Se ha observado que el lípido LBPA está implicado en la formación de vesículas hacia el interior de los MVBs y en la fusión de vesículas con la membrana limitante en una manera promovida por Bro1 que se une a liposomas que contienen LBPA (Le Blanc et al., 2005; Matsuo et al., 2004). Bro1 proporciona la unión con la maquinaria ESCRT, ya que es capaz de unir tanto al complejo –I como al complejo –III (Odorizzi, 2006).

Una vez que la formación de MVBs está terminada, la proteína Vps4, una ATPasa de tipo AAA, se une al complejo ESCRT-III y disocia sus componentes de la membrana endosomal, de una forma dependiente de ATP, para posteriormente iniciar nuevas rondas de direccionamiento de moléculas cargo y de tráfico vesicular (Hurley y Emr, 2006). Las proteínas accesorias Vps60, Vta1 e Ist1 regulan la función de Vps4, mientras que Vps46 se ha sugerido que también se une al ESCRT-III, aunque su función precisa aún no se ha determinado (Babst et al., 2002b; Dimaano et al., 2008; Shiflett et al., 2004; Yang et al., 2012).

1.7.2 ESCRT en *E. histolytica*

En *E. histolytica* existen evidencias bioinformáticas y experimentales que sugieren la presencia de una maquinaria ESCRT bien conservada y un mecanismo de formación de MVBs similar al descrito en levadura. Los estudios bioinformáticos consistieron en analizar el genoma de *E. histolytica*, encontrándose 19 genes que codifican para proteínas putativas del complejo ESCRT, las cuales mostraron alta similitud (del 20 al 62%) con las proteínas ESCRT de humano y levadura (Banuelos et al., 2012; López-Reyes et al., 2010). Estas proteínas ESCRT putativas de *E. histolytica*, poseen los mismos dominios funcionales característicos de los factores ESCRT de humano y levadura (López-Reyes et al., 2010). Dieciséis de estos genes fueron analizados por ensayos de RT-PCR semicuantitativa y se observó la presencia de al menos 15 transcritos (López-Reyes et al., 2010), lo cual sugiere fuertemente la presencia de la maquinaria ESCRT en *E. histolytica*.

Figura 3. Modelo del direccionamiento dependiente de ubiquitina de proteínas transmembranales al endosoma. Las proteínas de unión a ubiquitina (Ub), Vps27 y Hse1 y la clatrina forman una cubierta de clatrina que funciona como un sistema de concentración de moléculas cargo para alimentar la maquinaria ESCRT. Vps27 recluta al complejo preformado ESCRT-I del citoplasma celular hacia al endosoma, donde interacciona con la molécula cargo monoubiquitinada. A continuación, ESCRT-I activa al ESCRT-II, el cual inicia la oligomerización de un grupo de proteínas pequeñas “*coiled-coil*” denominadas Vps2, Vps24, Vps20 y Vps32, resultando en la formación de ESCRT-III. Finalmente el ESCRT-III concentra las moléculas cargo en MVBs y recluta factores adicionales como Bro1 y la Vps4. Bro1 recluta a la enzima desubiquitinadora Doa4 que remueve la marca de ubiquitina de las proteínas cargo. Vps4 disocia la maquinaria ESCRT y libera las proteínas de clase E para ser posteriormente utilizadas en un nuevo ciclo de formación de MVBs (Tomado de: Slagsvold et al., 2006).

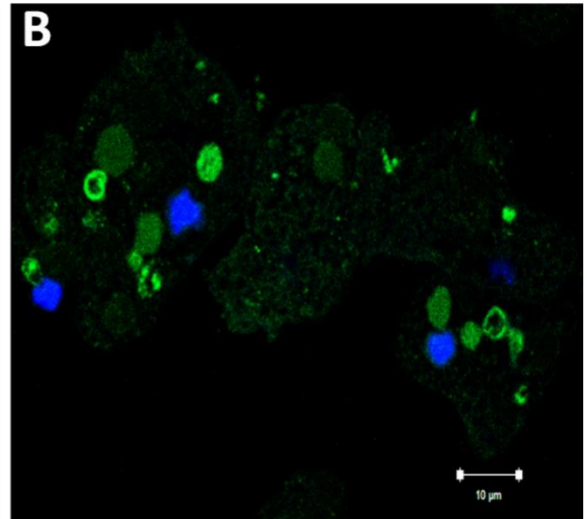
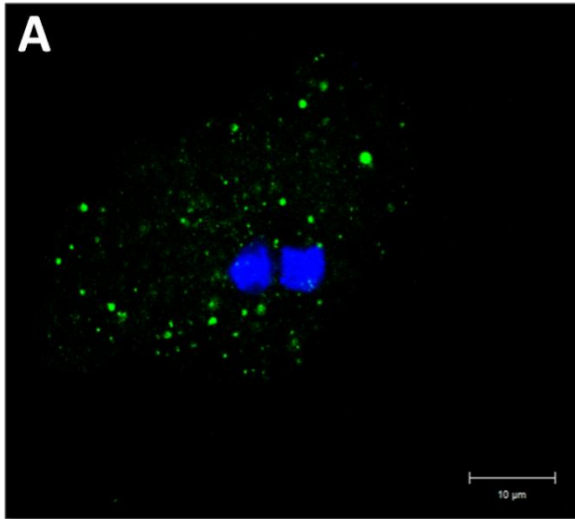


En cuanto al sistema ESCRT-III, durante mi proyecto de investigación para la Maestría en Ciencias, analizamos la expresión y localización de la proteína EhVps32 (Avalos-Padilla, 2012). En levadura, este componente es clave en el cierre de las vesículas preformadas (Wollert et al., 2009). Mediante el desarrollo de anticuerpos policlonales específicos contra EhVps32 determinamos su peso molecular en 31 kDa, peso mayor al calculado teóricamente en base a su secuencia de aminoácidos (24 kDa). La migración aberrante se ha observado en homólogos de esta proteína en *S. cerevisiae* y en el ser humano y se cree que se debe a la naturaleza intrínseca de carga de la proteína o bien (altamente ácida en su extremo N-terminal y Básica en el C-terminal), a una forma no globular de la misma (Babst et al., 2002a). Además, encontramos a esta proteína de forma abundante en el citoplasma de los trofozoítos, en estructuras punteadas similares a vesículas (Fig. 4, panel A). Adicionalmente, evaluamos el comportamiento de esta proteína durante el proceso de eritrofagocitosis. Nuestros hallazgos demostraron que la proteína se relocaliza alrededor de los eritrocitos ingeridos, delimitando las vacuolas fagocíticas (Fig. 4, panel B)(Avalos-Padilla, 2012).

Respecto a las proteínas ESCRT accesorias, López-Reyes *et al* (2010) demostraron la expresión de la molécula EhVps4 en trofozoítos de *E. histolytica*. Experimentos bioquímicos de acción enzimática con la proteína recombinante EhVps4 y ATP como sustrato, sugirieron que EhVps4 puede disociar al complejo ESCRT-III del endosoma (López-Reyes et al., 2010). Además, amibas que expresan una EhVps4 mutante catalíticamente inactiva (EhVps4-E211Q-FLAG) muestran propiedades reducidas de virulencia, sugiriendo un importante papel para EhVps4 en la patogenicidad de este parásito (López-Reyes et al., 2010).

Otra proteína ESCRT accesoria presente en *E. histolytica* es EhADH, la cual en determinadas condiciones forma parte del complejo EhCPADH (García-Rivera et al., 1999). EhADH contiene un dominio Bro1 en el extremo N-terminal, por lo que se ha propuesto como un nuevo miembro de la familia Alix, la cual está implicada en un amplio espectro de procesos de señalización celular (Bañuelos et al., 2005). EhADH se localiza en organelos semejantes a los MVBs en tanto que una forma mutada, con una delección de la mayor parte del dominio Bro1, se acumula en vesículas citoplásmicas posiblemente de clase E, caracterizadas por sus estructuras multilamelares (Banuelos et al., 2012).

Figura 4. Localización de EhVps32 en condiciones basales y durante la eritrofagocitosis. Trofozoítos de *E. histolytica* en condiciones basales **(A)** o que interaccionaron por 15 min con eritrocitos **(B)** se fijaron, permeabilizaron e incubaron con anticuerpos específicos de ratón α -EhVps32. Posteriormente, se usó un anticuerpo secundario anti-ratón acoplado a FITC (verde) y los núcleos se tiñeron con DAPI (azul). Las muestras se analizaron por microscopía confocal. En el panel izquierdo, se observa a la proteína EhVps32 localizada de forma abundante en estructuras punteadas similares a vesículas por todo el citoplasma. Sin embargo, durante la interacción con eritrocitos (panel derecho), la proteína se relocaliza alrededor de las vacuolas fagocíticas (Tomado de: Avalos-Padilla, 2012)



En Bro1 y Alix el dominio Bro1 constituye el sitio de interacción con Vps32 o CHMP4B, su homólogo en humano (Xu et al., 2004), por lo que mediante ensayos *in vitro* tipo “pull-down”, se demostró que la EhADH, a través de su dominio Bro1, se une de manera directa a la recombinante GST-EhVps32 (Fig. 5) (Banuelos et al., 2012). Este resultado sugiere que EhADH cumple una función similar a sus homólogos Bro1 y Alix. Además, EhADH está involucrada en la adhesión y fagocitosis de la ameba (Arroyo y Orozco, 1987; García-Rivera et al., 1999; Orozco et al., 1983), sugiriendo que la participación de EhADH en la vía de los MVBs media estos mecanismos patogénicos.

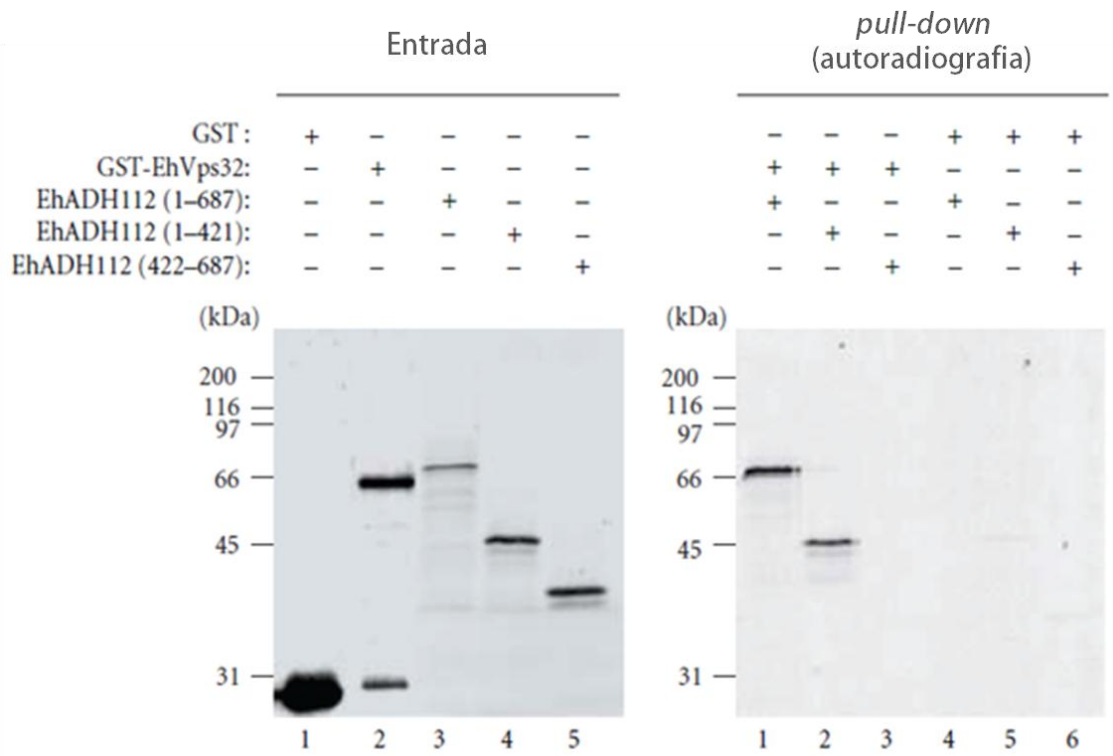
1.8 ESCRT-III

La maquinaria ESCRT está involucrada en un rango amplio de procesos de remodelación de membranas que involucran varias rutas de reclutamiento, pero todas convergen en el ensamblaje del complejo ESCRT-III en el sitio donde se lleva a cabo la deformación de la membrana y el proceso de escisión de las vesículas nacientes (Carlton y Martin-Serrano, 2007; Morita et al., 2007).

La importancia de este complejo es evidente por su alto grado de conservación a través de la escala evolutiva. Miembros homólogos del complejo -III se han identificado en el reino Archaea. Tal es el caso del microorganismo hipertermofílico *Sulfolobus*, en donde se han encontrado homólogos putativos de las proteínas Vps32, Vps20, Vps2 y Vps24 de levadura, las cuales muestran la propiedad de unirse entre ellas *in vitro* (Samson et al., 2008). Además, existe evidencia de que estas proteínas tienen un papel durante la división celular ya que mediante estudios de inmunolocalización se encontró la presencia de estas proteínas en el sitio de constricción de la membrana (Lindas et al., 2008; Samson et al., 2008).

En general, ESCRT-III polimeriza preferencialmente a lo largo de membranas curvadas y se piensa que actúa principalmente como una maquinaria de fisión en cuellos preformados. Cada una de las subunidades del complejo -III posee diferentes funciones: Vps20 se encarga de la nucleación del complejo ESCRT-III, Vps32 del crecimiento del polímero y, finalmente, la escisión de la vesícula es llevada a cabo por el subcomplejo Vps2/Vps24.

Fig. 5 Interacción *in vitro* de EhVps32 con el dominio Bro1 de EhADH. Las proteínas GST y GST-EhVps32 se inmovilizaron en perlas de glutatión sefarosa y se pusieron a interactuar con la proteína EhADH completa (1-687) o bien con su extremo amino (1-421) o carboxilo terminal (422-687), marcadas con ^{35}S . En el panel de la izquierda se muestra un gel desnaturalizante de poliacrilamida con las proteínas recombinantes usadas. En el panel de la derecha, después de realizar ensayos *pull-down* las proteínas se separaron en un gel y a través de un análisis autorradiográfico se observó cómo la proteína GST-EhVps32 es capaz de retener a la EhADH completa y al extremo N-terminal de la EhADH que contiene al dominio Bro1, pero no se une al extremo C-terminal de la EhADH. Los controles muestran que la proteína GST sola no es capaz de unirse inespecíficamente a EhADH, ni a sus derivados (Tomado de: Banuelos et al., 2012).



Todas las proteínas del complejo ESCRT-III poseen hacia su extremo N-terminal un dominio estructural denominado Snf7, el cual está formado por aproximadamente 160 aminoácidos (Winter y Hauser, 2006), que se pliegan en forma de hélices alfa formando interacciones tipo *coiled-coil*, lo que le permite a las proteínas de este complejo formar multímeros. Las proteínas que contienen este dominio forman parte de la familia SNF7. Esta familia es un grupo de moléculas involucradas en el direccionamiento y transporte de proteínas, desde el endosoma hacia el lisosoma y participan de manera activa en la formación de los MVBs (Pfam, 2011).

Las proteínas del complejo ESCRT-III, además poseen en su extremo N-terminal aminoácidos básicos (pI~10), mientras que su extremo C-terminal es fuertemente ácido (pI~4) (Babst et al., 2002a).

Las subunidades de ESCRT-III poseen una serie de α -hélices unidas por pequeñas secuencias de aminoácidos, denominadas "*linker*", que carece de estructura pero cuya composición se sugiere es análoga cuando están en solución. Las estructuras cristalográficas de las isoformas humanas de Vps24, Vps32 e Ist1 (Bajorek et al., 2009; Martinelli et al., 2012; Muziol et al., 2006) mostraron que las hélices α_1 y α_2 forman una horquilla helicoidal; adicionalmente, α_3 y α_4 se apilan contra el extremo abierto de la horquilla para generar un envoltorio asimétrico compuesto de 4 hélices α . El *linker* presente entre las hélices 4 y 5 carece de estructura pero posee un alto grado de flexibilidad, lo que permite que la hélice α_5 se localice sobre la horquilla helicoidal; o bien, se encuentre aislada del núcleo de 4 hélices, dando lugar a las conformaciones autoinhibida y activa respectivamente (Shen et al., 2014). A diferencia de los demás complejos, los miembros de ESCRT-III no están preensamblados sino que se localizan en forma soluble en el citosol (Babst et al., 2002a) como monómeros en su forma autoinhibida (Shim et al., 2007; Zamborlini et al., 2006).

Por otro lado, en ensayos de electroforesis, todas estas proteínas migran en un peso molecular más alto que el predicho por su secuencia de aminoácidos, al igual que las proteínas recombinantes que se producen a partir de sus genes. Esto sugiere que esta discrepancia no es el resultado de modificaciones post-traduccionales, sino una propiedad intrínseca de la proteína tal como la carga o una forma no globular de la proteína (Babst et al., 2002a; Babst et al., 1998).

1.8.1 Vps20

En *S. cerevisiae* Vps20 es una pequeña proteína hidrofílica que posee una secuencia de reconocimiento para la enzima *N*-miristoiltransferasa (Nmt1), que durante la traducción une covalentemente un miristato en la glicina del extremo N-terminal (Ashrafi et al., 1998; Babst et al., 2002a). La mutación de esta glicina resulta en la pérdida parcial de la función de la proteína y reduce su asociación a la membrana, sugiriendo la importancia de esta modificación para la correcta función de la proteína (Babst et al., 2002a).

Por otro lado, Vps20 junto con Vps32 y los complejos ESCRT-I y ESCRT-II, son requeridos para la señalización dependiente de pH, importante en la patogenicidad del hongo *Aspergillus nidulans* (Peñalva et al., 2008; Xu et al., 2004).

Su homólogo en el ser humano, denominado CHMP6 une a VTA1, la cual regula la actividad de la ATPasa VPS4 (Yeo et al., 2003).

Al momento de iniciar este trabajo experimental, el homólogo de Vps20 en *E. histolytica* no había sido identificado.

1.8.2 Vps32

En *S. cerevisiae* Vps32, también conocida como Snf7, es una proteína hidrofílica de 240 aa. Aproximadamente el 35% de sus residuos presentan carga y se encuentran distribuidos de forma desigual a lo largo de su secuencia. El peso molecular predicho por la secuencia de aminoácidos de esta proteína es de 27 kDa (Babst et al., 2002a; Babst et al., 1998).

Vps32 se asocia con Vps20, unión que permite la interacción directa con los lípidos de la membrana endosomal. Se ha observado que esta proteína posee la capacidad de asociarse a los endosomas, aún en ausencia de Vps20 (Babst et al., 2002a). Por lo tanto, se ha hipotetizado que Vps32, al ser una molécula altamente cargada, se une a las membranas a través de interacciones con grupos funcionales cargados en la cabeza de los lípidos (Babst et al., 2002a). Por otra parte, la delección de Vps32 afecta de manera significativa la asociación del subcomplejo Vps2-Vps24, con las membranas endosomales, resultando en una función deficiente del complejo ESCRT-III (Babst et al., 2002a).

Los hallazgos anteriores sugieren que la proteína Vps32 es una molécula clave para el sistema ESCRT-III y para la formación de los MVBs. Estudios realizados *in vitro* en el modelo de vesículas gigantes unilamelares (GUVs, por sus siglas en inglés "*Giant*

Unilamellar Vesicles) revelaron que Vps32 es el componente del ESCRT-III más importante en el reclutamiento de las moléculas cargo, y en el proceso de escisión de la membrana (Wollert et al., 2009).

En el humano, el homólogo de Vps32 se denomina CHMP4 y presenta tres isoformas: CHMP4A, CHMP4B y CHMP4C (McCullough et al., 2008). CHMP4 posee la capacidad de unirse a Alix. Esta unión resulta de gran importancia, ya que Alix puede servir como un adaptador que recluta los complejos ESCRT-III en distintas membranas biológicas (Kato et al., 2004).

La búsqueda del ortólogo Vps32 en *E. histolytica* mostró que en la ameba existe una proteína con valores del 25% de identidad, 48% de homología y valor e de 2.5×10^{-12} , respecto a la Vps32 de *S. cerevisiae*; mientras que con la CHMP4B de humano comparte 20% de identidad, 43% de homología y un valor de e de 9.6×10^{-07} (López-Reyes et al., 2011). Estos datos sugieren que la proteína EhVps32 de *E. histolytica*, puede ser un miembro de la familia SNF7 (López-Reyes et al., 2011; López-Reyes et al., 2010). En la base de datos AmoebaDB, considerada como la base de datos oficial del genoma amebiano y tomando en cuenta la estructura de la proteína EhVps32, se predice que puede desempeñar funciones de unión y movimiento dirigido de proteínas dentro, fuera o a través de la célula, o bien, entre distintas células (Pathema, 2011). Además, se predice que EhVps32 contiene 205 aminoácidos, con peso molecular calculado de ~23.8 kDa, un pI de ~4.6572 y una longitud del gen de 614 nucleótidos (Pathema, 2011).

Mediante el programa bioinformático Phyre, que permite predecir la estructura tridimensional de proteínas cuyo análisis cristalográfico no se ha realizado, se modeló la estructura terciaria de EhVps32 y se observó que EhVps32 adopta un plegamiento y una estructura conformacional más similar a la CHMP4B de humano, que a la Vps32 de levadura (López-Reyes et al., 2011).

1.8.3 Vps24

La proteína Vps24 posee en su extremo C-terminal una región que interactúa con el dominio MIT (*Microtubule Interacting and Trafficking*) de la ATPasa Vps4, lo cual permite la disociación del complejo ESCRT-III formado (Obita et al., 2007; Stuchell-Brereton et al., 2007). Además se ha identificado a esta proteína como la responsable del tamaño de la vesícula en levaduras (Rudge et al., 2004).

Su homólogo en el ser humano se denomina CHMP3, la primer proteína ESCRT-III cristalizada. Su estructura sugiere que todos los miembros de la familia ESCRT-III comparten un núcleo básico conservado (Muziol et al., 2006). CHMP3 reconoce al fosfolípido $\text{Ptlns}(3,5)\text{P}_2$ (Fosfatidilinositol 3,5-difosfato) (Whitley et al., 2003) y es capaz de anclarse a la membrana de los endosomas.

En *E. histolytica* existe una proteína putativa que posee una similitud del 48% y una identidad del 22%, y un valor de e de 2.2×10^{-5} , respecto a la presente en levadura (López-Reyes et al., 2011).

1.8.4 Vps2

Al igual que Vps20, Vps2 es una pequeña proteína hidrofílica (Babst et al., 2002a). Junto con Vps24, Vps2 recluta a la ATPasa Vps4, al unir su dominio MIM (*MIT domain-interacting motif*) presente en el extremo C-terminal de Vps2, al dominio MIT de la enzima Vps4 (Obita et al., 2007).

El ser humano posee dos homólogos para esta proteína denominados CHMP2A y CHMP2B (Bajorek et al., 2009).

En la ameba existe una proteína putativa que comparte valores de similitud del 50%, identidad del 29% y valor de e de 2×10^{-5} comparada con la proteína de la levadura; comparada con la de humano presenta valores de similitud del 48%, identidad del 25% y valor de e de 7.9×10^{-16} (López-Reyes et al., 2011).

1.9 Dinámica de lípidos durante la endocitosis

A lo largo de la vía endocítica/secretoria, la composición proteica y lipídica de las membranas sufre varios cambios. Diversos estudios demuestran que los lípidos no se encuentran distribuidos de igual manera entre las distintas membranas celulares, esta heterogeneidad está relacionada a su vez con la distribución de las proteínas asociadas a la membrana (Bissig y Gruenberg, 2013).

En eucariontes, la membrana plasmática contiene cantidades relativamente altas de colesterol y glicoesfingolípidos y algunos lípidos se encuentran distribuidos asimétricamente en ambas caras de la membrana celular; tal es el caso de fosfatidiletanolamina (PE) localizada en la cara externa y fosfatidilserina (PS) localizada únicamente en la cara interna (Devaux, 1991). Por su parte, los endosomas tempranos, al ser un producto derivado de la membrana plasmática, poseen prácticamente la misma composición lipídica, siendo ricos en colesterol y PS

(Gagescu et al., 2000). La diferencia principal entre membrana plasmática y endosoma temprano, radica en la composición de fosfoinosítidos, ya que la primera posee PI(4,5)P₂ (Fosfatidilinositol 4,5-difosfato) y PI(3,4,5)P₃ (Fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato), mientras que en endosomas está presente PI(3)P (Fosfatidilinositol 3-fosfato). Finalmente, los endosomas tardíos son ricos en LBPA (Ácido lisofosfatídico), el cual no se detecta en ningún otro sitio de la célula (Kobayashi et al., 1998).

1.10 Modelos para el estudio de membranas biológicas

Debido a la naturaleza transitoria de la maquinaria ESCRT-III sobre las membranas del endosoma resulta difícil llevar a cabo estudios *in vivo* en la célula, por esta razón, se ha recurrido al uso de modelos *in vitro* que permiten delimitar las funciones de cada una de las proteínas que integran a esta maquinaria.

Existen varios métodos para el estudio de interacciones lípido-proteína *in vitro*, la elección de un método depende de la proteína de interés y el tipo de información que se desea obtener (Zhao y Lappalainen, 2012). Estas interacciones puede ser analizadas utilizando membranas aisladas; sin embargo, el aislamiento de cantidades suficientes de compartimientos membranales específicos es muy difícil. Además, las membranas biológicas aisladas poseen una composición compleja que incluye proteínas de membrana lo cual puede interferir con los ensayos. Por estas razones, se utilizan sistemas biomiméticos entre los que destacan las vesículas de lípidos (liposomas), bicapas lipídicas soportadas y monocapas lipídicas (Zhao y Lappalainen, 2012)

Entre los modelos disponibles, el más utilizado es el de liposomas, ya que estructuralmente se asemejan a compartimientos celulares en los cuales las moléculas individuales de lípidos son organizados en una bicapa lipídica esférica. Existen dos tipos principales de liposomas: unilamelares, compuestos de una sola bicapa lipídica y multilamelares, compuestos de varias bicapas lipídicas (Zhao y Lappalainen, 2012).

Las GUVs son una herramienta práctica para el estudio de las propiedades de membrana (Fenz y Sengupta, 2012). Este modelo ha sido utilizado previamente para estudiar propiedades membranales tales como rigidez, elasticidad, direccionamiento de lípidos y separación de fase (Bassereau y Goud, 2011; Dimova et al., 2006); ya que, debido a su tamaño, es posible su visualización mediante microscopía de luz y la micromanipulación de vesículas individuales (Dimova et al., 2006).

La visualización de estas vesículas permite observar procesos dinámicos, incluyendo interacciones lípido-proteína, formación de microdominios lipídicos, cambios en la morfología de la membrana y dinámica de lípidos (Bacia et al., 2011; Dimova et al., 2006; Saarikangas et al., 2009).

La preparación de GUVs se realiza mediante la hidratación de capas de lípidos bajo la influencia de un campo eléctrico, este método, conocido como electroformación, permite obtener vesículas uniformes en tamaño y forma (Angelova y Dimitrov, 1986). Las vesículas obtenidas mediante este método poseen la misma composición en la capa interna como en la externa y son libres hasta en un 80% de defectos en la membrana, lo cual podría interferir con los ensayos (Rodríguez et al., 2005).

Finalmente, Wollert et al utilizaron este modelo para profundizar en el entendimiento del mecanismo de acción de la maquinaria ESCRT en la levadura *S. cerevisiae*, probando la acción de esta maquinaria sobre el modelo de GUVs {Wollert, 2009 #34}.

2. JUSTIFICACIÓN

Los trofozoítos de *E. histolytica* son organismos altamente endocítico, siendo el tráfico vesicular indispensable para su nutrición y para procesos como la secreción de proteínas degradativas, lo cual resulta fundamental en la expresión de su virulencia.

En eucariontes, el complejo ESCRT, participa en el sistema endocítico durante la formación de los MVBs. Hasta el momento, en *E. histolytica* se han identificado homólogos putativos del sistema ESCRT. Además, experimentalmente se ha encontrado el transcrito de la mayoría de estos genes y se ha estudiado parcialmente la función de dos proteínas ESCRT accesorias, EhADH y EhVps4, así como de la proteína más abundante del complejo ESCRT-III, EhVps32.

Nuestros resultados anteriores demuestran que la proteína EhVps32 se relocaliza en la célula durante el proceso de eritrofagocitosis. Esto nos lleva a pensar que EhVps32, junto con el resto de los componentes ESCRT-III participan en la maduración del fagosoma cuando se internalizan los eritrocitos fagocitados.

Hasta el momento no existen estudios de la maquinaria ESCRT durante la fagocitosis, por lo que resulta de gran importancia analizar si *E. histolytica* expresa los cuatro componentes que integran al complejo ESCRT-III (EhVps2, EhVps20, EhVps24 y EhVps32), así como su participación en el proceso endocítico. Elucidar la función de cada una de estas proteínas nos ayudará a entender mejor los procesos de patogenicidad de *E. histolytica* que involucran a la endocitosis, ya que nos permitirá conocer si la maduración fagosomal se lleva a cabo en una forma similar a la endocitosis en eucariontes superiores.

3. HIPÓTESIS

En *Entamoeba histolytica*, el complejo ESCRT-III participa en los eventos de maduración de los fagosomas, el cual es esencial para la degradación de partículas fagocitadas.

4. OBJETIVOS

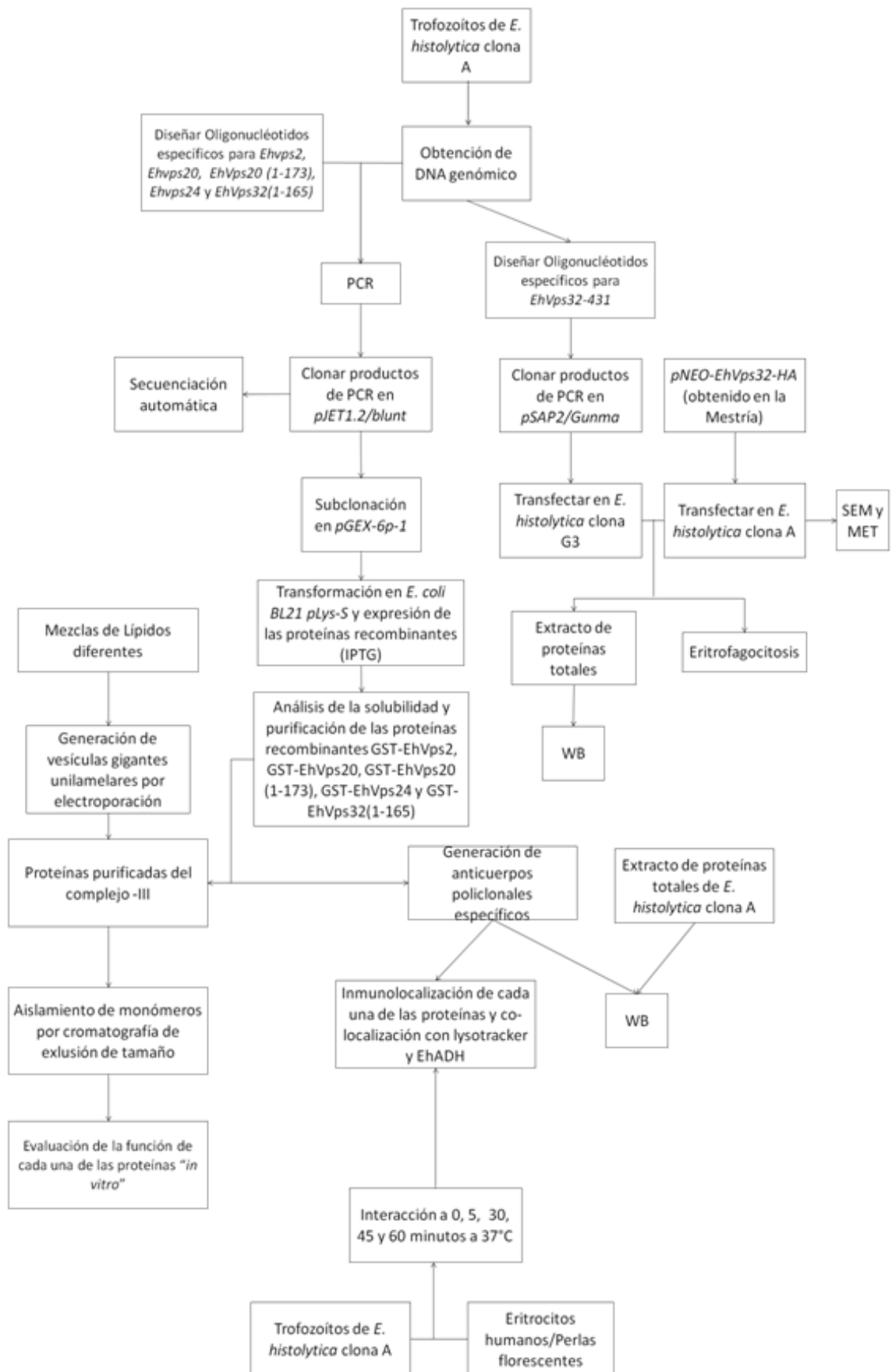
4.1 OBJETIVO GENERAL

Analizar la expresión del complejo ESCRT-III en *Entamoeba histolytica* y estudiar su participación durante la eritrofagocitosis de la amiba.

4.2 OBJETIVOS PARTICULARES

- ✓ Analizar la expresión de cada una de las proteínas del complejo ESCRT-III y determinar su localización subcelular en los trofozoítos de *E. histolytica*.
- ✓ Evaluar la localización de estas proteínas durante el proceso de eritrofagocitosis.
- ✓ Determinar la función de cada una de estas proteínas en el proceso endocítico *in vitro*.
- ✓ Analizar la participación de ESCRT-III en la eritrofagocitosis de *E. histolytica in vitro*.

5. DISEÑO EXPERIMENTAL



6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Cultivo de trofozoítos de *E. histolytica*

Trofozoítos de la clona A cepa HM1:IMSS (Orozco et al., 1982) fueron cultivados axénicamente a 37°C en el medio TYI-S-33 (Diamond et al., 1978), suplementado con 10% de suero bovino (ECHITEC-BIO; GIBCO, Invitrogen), 6% de la mezcla de vitaminas de Diamond (JRH, Biosciences), 1.2 U/ml de Penicilina (Lakeside) y 1.4 mg/ml de estroptomina (Lakeside).

La cepa G3, utilizada para llevar a cabo el silenciamiento epigenético en *E. histolytica*, fue obtenida al silenciar el gen del amebaporo A (*Ehap-a*) al transfectar trofozoítos de la cepa HM1:IMSS con el plásmido psAP-1 el cual posee el gen completo *Ehap-a* así como elementos reguladores río arriba y río abajo del gen. Al eliminar el plásmido de los trofozoítos transfectados, observaron que el silenciamiento del amebaporo A se mantenía y a esta nueva cepa generada se le denominó G3 {Mirelman, 2008 #606}. El cultivo de esta cepa se realiza de la misma manera que se mencionó arriba.

6.2 Obtención de ADN genómico de *E. histolytica*

La obtención del ADN genómico se realizó utilizando el kit “Wizard® Genomic DNA Purification Kit” (Promega). Trofozoítos (1×10^7) en fase logarítmica de crecimiento se cosecharon enfriando el cultivo a 4°C durante 10 min, después se colectaron en tubos cónicos de 50 ml y se centrifugaron a 500 x g durante 10 min a 4°C. La pastilla celular se lavó tres veces con PBS (1.4 M NaCl, 27 mM KCl, 100 mM Na₂HPO₄, 18 mM KH₂PO₄, pH 7.4) a 4°C para eliminar los remanentes del medio. El paquete celular se resuspendió en 1.5 ml de PBS frío y estéril y se transfirió a tubos Eppendorf de 1.5 ml. Nuevamente se centrifugó a 13,000 x g durante 10 s y el sobrenadante se eliminó; la pastilla resultante se resuspendió en 600 µl de solución de lisis nuclear y se mezcló cuidadosamente. Inmediatamente después se añadieron 3 µl de la solución de RNAsa (4mg/ml), mezclando vigorosamente y el tubo se incubó durante 30 min a 37°C. La mezcla se enfrió a temperatura ambiente (TA), se añadieron 200 µl de solución de precipitación de proteínas, se agitó en vórtex y se enfrió en hielo durante 5 min, y se centrifugó a 15,000 x g durante 6 minutos. El sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo que contenía 600 µl de isopropanol y se mezcló suavemente por inversión. La mezcla se centrifugó a 16,000 x g durante un minuto a TA. El sobrenadante se descartó y a la pastilla se le añadieron 600 µl de

etanol al 70%, se mezcló suavemente para lavar el ADN obtenido y se centrifugó durante 1 min a 16,000 x g a TA. El etanol se eliminó cuidadosamente y la pastilla se secó durante 15 min en la campana de flujo laminar {Miller, 1988 #564}. Para finalizar, la pastilla de ADN se rehidrató con 100 µl de agua inyectable estéril, el ADN fue cuantificado mediante espectrofotometría por Nanodrop (Thermo) a 260/280 nm, se hicieron alícuotas y se almacenaron a -20°C hasta su uso.

6.3 Extracción de ARN total

La extracción de ARN se realizó utilizando el reactivo comercial Trizol (Invitrogen), el cual consta de una solución monofásica de fenol e isotiocianato de guanidina con la que se obtiene un mejoramiento a la técnica de aislamiento de ARN de un solo paso (Chomczynski y Sacchi, 1987). Durante la lisis celular, los componentes del Trizol mantienen la integridad del ARN. La adición de cloroformo seguida de centrifugación, separa la solución en una fase acuosa y otra orgánica, en la fase acuosa se mantiene el ARN de donde se recupera y se precipita a temperatura ambiente mediante la adición de isopropanol. Mediante esta técnica se obtiene ARN libre de proteínas, carbohidratos, lípidos y ADN. La pastilla de ARN recuperada después de esta metodología se resuspendió en agua libre de ribonucleasas (agua DEPC). La obtención de ARN total se realizó utilizando cultivos de trofozoítos de la clona A de *E. histolytica* en condiciones basales. La cuantificación y visualización de la calidad del ARN fue realizada mediante la lectura espectrofotométrica por Nanodrop (Thermo) y mediante la electroforesis en geles de agarosa {Johansson, 1972 #565}.

6.4 Síntesis de la cadena complementaria de ADN (cADN)

Debido a que el análisis *in silico* reveló la presencia de intrones en nuestros genes de interés, es necesario obtener el amplificado libre de los mismos para proceder a su posterior clonación. De tal manera que empleamos la técnica de síntesis de ADN complementaria (cADN) mediante la transcripción reversa seguida por la amplificación por PCR.

En primer lugar, para eliminar el ADN remanente en las muestras de ARN, se tomó 1 µg del ARN obtenido y se adicionó 1 U de la enzima DNAsa I (Promega) y 2 µl de amortiguador 5 X completando con agua DEPC, hasta alcanzar un volumen de 20 µl. Esta mezcla se incubó durante 30 min a 25°C; posteriormente se adicionó 1 µl de

EDTA 50 mM y se incubó por 15 min a 65°C con la finalidad de desactivar a la enzima.

El ARN tratado con DNAsa se mezcló con 100 ng de oligo dT y se incubó durante 5 min. Posteriormente se agregó 1 µl de la mezcla de dNTPs 10 mM (10 mM de dATP, dCTP, dGTP y dTTP), se colocó inmediatamente en hielo y se agregó la siguiente mezcla: 4 µl de amortiguador de reacción Superscript II™ (Tris-HCl 250 mM pH 8.3, KCl 375 mM, MgCl₂ 1 mM), 2 µl de DTT 100 mM y 2 µl de inhibidor de RNAsas (RNAsin, Invitrogen) en un volumen final de 20.5 µl. La mezcla se incubó a 42 °C durante 2 min y después se adicionaron 200 U de la enzima Superscript™ II (Invitrogen) y se incubó nuevamente a 42°C durante 1 hora. Transcurrido este tiempo se adicionó 1 µl de RNAsaH con la finalidad de obtener un mayor rendimiento de la reacción de PCR debido a que se elimina el ARN molde y se impide la formación de moléculas dúplex de ADN-ARN. Las muestras se almacenaron a -70°C hasta su uso.

6.5 Diseño de oligonucleótidos específicos

Para los ensayos funcionales de las proteínas, se empleó una variante de EhVps20 y de EhVps32 recombinantes que carecían del extremo C-terminal [EhVps20(1-173) y EhVps32(1-165), respectivamente], lo que permitió obtener una proteína activa y de esta manera evitó el uso de los complejos ESCRT que se encuentran río arriba y que son necesarios para activar al complejo ESCRT-III.

El diseño del par de oligonucleótidos iniciadores para amplificar los genes de las proteínas EhVps2, EhVps20, EhVps20(1-173), EhVps24, EhVps32(1-165) se realizó empleando el programa DNABWORKS que se encuentra disponible en Internet (<http://helixweb.nih.gov/dnaworks/>). Además, en todos los casos a estos oligonucleótidos se les agregaron las secuencias reconocidas por las enzimas de restricción *BamHI* para el oligo en sentido y *Sall* para el oligo en antisentido (Tabla 1).

A los oligos diseñados se les realizó un análisis de BLAST en la base de datos de *E. histolytica* (Amoeba DB, <http://www.amoebadb.org>) con la finalidad de comprobar que las secuencias elegidas se localizaran exclusivamente en los genes de interés. Una vez comprobada la especificidad de los oligos, las secuencias se enviaron a sintetizar.

En el caso del silenciamiento, se sintetizó un par más de oligonucleótidos que amplificaran las primeras 431 pb del gen *Ehvps32*, además en el oligo en sentido se incluyó la secuencia reconocida por la enzima *SacI* y en el antisentido, la secuencia reconocida por *StuI*, para verificar la especificidad de los mismos se realizó un análisis BLAST como se describió previamente.

6.6 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La amplificación de los genes *Ehvps2*, *Ehvps20*, *Ehvps20(1-173)*, *Ehvps24*, *Ehvps32(1-165)* y *Ehvps32-431* se realizó mediante la técnica de PCR {Gibbs, 1991 #568} en la cual se utilizaron 100 ng de ADN genómico o cADN, 10 µM de cada uno de los oligonucleótidos sintetizados (sentido y antisentido), 10 mM de cada dNTP (dATP, dCTP, dTTP y dGTP), amortiguador GC 5X, 5.0 mM de cloruro de magnesio, 1 U de la enzima de alta fidelidad KAPA HiFi HotStart DNA polymerase (KAPABiosystems) y agua inyectable, a un volumen final de 25 µL. En el control negativo se añadió toda la mezcla de reacción excepto el ADN genómico, o bien, el ARN tratado con DNAsa, en el caso de emplear cADN.

La amplificación se llevó a cabo en un termociclador *Mastercycler personal* (Invitrogen), utilizando el siguiente programa: desnaturalización inicial a 95°C por 5 min, 30 ciclos a 95°C por 30 seg, alineamiento a la temperatura correspondiente a cada par de oligonucleótidos (ver tabla 1) por 30 seg, 72°C por 1 min y la extensión adicional se llevó a cabo a 72°C por 1 min. Los productos de PCR se analizaron en geles de agarosa al 1.5%, en solución de TAE (0.04 M Tris, 0.04 M Acetato 1 mM EDTA, pH 8.2-8.4).

6.7 Purificación del ADN a partir de geles de agarosa

Las bandas correspondientes a los genes *Ehvps2*, *Ehvps20*, *Ehvps20(1-173)*, *Ehvps24*, *Ehvps32(1-165)* y *Ehvps32-431* se purificaron con el kit "GeneJET Gel extraction Kit" (Fermentas). En primer lugar, los fragmentos de ADN se cortaron de los geles de agarosa y se pesaron dentro de un tubo de 1.5 ml. Después, se agregó un volumen 1:1 del amortiguador de unión y se incubó la mezcla a 50-60°C durante 10 min o hasta que el gel estuviera completamente disuelto. La mezcla se agitó suavemente por inversión y se agregaron dos volúmenes de isopropanol al 100% y se mezcló vigorosamente. La mezcla se cargó en la columna de purificación GeneJET, se centrifugó a 18,000 x g durante 1 min y se descartó lo que no se unió.

Tabla 1: Secuencia de cada uno de los oligos diseñados, tamaño del fragmento esperado por amplificación y Tm para los cuatro genes estudiados.

Nombre del gen	Tamaño del gen (pb)	Tm (°C)	Oligonucleótido en sentido	Oligonucleótido en antisentido
<i>Ehvps2</i>	741	58°C	5'-GCGGATCCATGTCAAGGTTATTTTC-3'	5'- CCAAGCTTTTAAAGATTGGCTATTCTTGAAACAATATCATC TTCATCTTC-3'
<i>Ehvps20</i>	621	61°C	5'GCGGATCCATGTAAATCGATTCA-3'	5'-CCAAGCTTTTAAATTGCAAATTTTTGCTATCTGGTT-3'
<i>EhVps20</i> (1-173)	522	60°C	5'- CCGGATCCATGTAAATCGATTCA -3'	5'-CGTCGACTTAAATATCTCCTTCAAACATTGAAT-3'
<i>Ehvps24</i>	618	61°C	5'- GCGGATCCATGGGCAACCTTAATAGCCAA ACAGTAGATAATAG-3'	5'- CCGTCGACTTAAAAGGTTTCTATTACAATATTTGTTTAGA TATTAACATTCACCTT-3'
<i>Ehvps32</i> (1-165)	495	72°C	5'- CCCCGGATCCATGTCTTGGTTCAGAAGAA ATACTAC-3'	5'- CCCCGTCGACTTATTCTTGTTCATCAAGAAGCTTGATCTTCT AAT-3'
<i>EhVps32-431</i>	431	65°C	5'AGCTAGGCCTATGTCTTGGTTCAGAAGA ATACT-3'	5'-GCATGAGCTCATGTCTTGAAATCTTCACCTAAA-3'

Con la finalidad de lavar el ADN unido a la columna, se colocaron 100 µl del amortiguador de unión, se centrifugó como se mencionó anteriormente y se lavó con 700 µl de amortiguador de lavado, nuevamente centrifugando en las condiciones establecidas. Finalmente, se realizó una centrifugación adicional para remover los residuos de etanol del amortiguador de lavado. Para eluir el ADN obtenido, la columna se colocó en un tubo de 1.5 ml nuevo y estéril, se adicionaron 50 µl de agua estéril en la columna a 50°C y se centrifugó a 14,000 x g durante 1 min. El ADN obtenido se cuantificó por espectrofotometría a 260/280 nm en un equipo Nanodrop (Thermo) y se almacenó a -20°C hasta su uso.

6.8 Clonación de *Ehvps2*, *Ehvps20*, *EhVps20(1-173)*, *Ehvps24*, *EhVps32(1-165)* y *Ehvps32-431* en el vector pJET1.2/blunt

Los genes amplificados y purificados fueron clonados en el vector *pJET1.2/blunt* (Fermentas) el cual permite clonar directamente productos de PCR que poseen extremos romos generados por la ADN polimerasa de alta fidelidad. Adicionalmente este vector contiene un gen letal que es interrumpido por la ligación de un inserto de ADN en el sitio de clonación, de manera que sólo las células que contienen los plásmidos recombinantes son capaces de propagarse, eliminando la necesidad de seleccionar clonas.

La ligación del amplificado y del vector se llevó a cabo en una proporción 1:3 (vector: inserto), con la siguiente mezcla de reacción: 10 µL de amortiguador de reacción 2X, 75 ng del producto de PCR purificado, 25 ng del vector de clonación pJET1.2/blunt, 1 µl de ADN ligasa T4 y se aforó a un volumen total de 20 µl con agua inyectable. A continuación, la preparación se mezcló en el vórtex por 5 segundos y se incubó a TA durante 5 min. La mezcla fue empleada para transformar bacterias competentes DH5α las cuales se sembraron en Luria Bertani-Agar (LB: 1% Triptona; 0.5% extracto de levadura; 1% g de NaCl y 15 g de agar por cada litro de medio) que contenía ampicilina a una concentración de 100 µg/ml. Las colonias resultantes fueron sembradas en LB-ampicilina y conservadas a 4°C hasta por una semana.

6.9 Digestión de los plásmidos *pGEX-6P-1*, *pJET1.2-EhVps2*, *pJET1.2-Ehvps20*, *pJET1.2-Ehvps20(1-173)*, *pJET1.2-Ehvps24* y *pJET1.2-Ehvps32(1-165)*,

Los plásmidos fueron restringidos con las enzimas de rápida digestión *BamHI* (Invitrogen) *Sall* (Invitrogen) en todos los casos para poder llevar a cabo la sub-

clonación en el vector de expresión *pGEX-6P-1*. La mezcla de reacción se realizó de la siguiente manera: 1 µg de vector, 10 U de cada enzima de restricción, 3 µl de amortiguador de reacción 4X y se aforó a un volumen final de 20 µl con agua estéril. La reacción se incubó durante 4 h a 37°C y los productos se analizaron por electroforesis de agarosa al 1.5%.

6.10 Subclonación de *Ehvps2*, *Ehvps20*, *Ehvps20(1-173)*, *Ehvps32(1-165)* y *Ehvps24* en el vector de expresión *pGEX-6P-1*

Para subclonar los genes en el vector de expresión *pGEX-6P-1* tanto el gen clonado como el plásmido sin inserto fueron sometidos a restricción enzimática, y purificados del gel como se mencionó anteriormente. El ensayo de ligación se realizó en una proporción 1:5 (vector: inserto) con la siguiente mezcla de reacción: 50 ng de plásmido digerido y purificado, X ng del inserto según sea el caso, proveniente del plásmido *pJet1.2/blunt* digerido y purificado, 100 U de la enzima T4 ADN ligasa (Invitrogen), 3 µl de amortiguador 5X (Invitrogen) y se aforó a un volumen final de 15 µl con agua estéril. La mezcla se incubó a 16°C durante 16 horas. Como control negativo se utilizó la misma mezcla de ligación pero sin el inserto. La mezcla de reacción se utilizó para transformar bacterias *DH5α* competentes y a las colonias bacterianas candidatas se les realizó la extracción de plásmidos, los cuales fueron analizados por digestión con las enzimas correspondientes.

6.11 Preparación de bacterias competentes

A partir de una colonia de bacterias *Escherichia coli DH5α* (cepa que carece de endonucleasas y resulta útil para expandir plásmidos) se inoculó un cultivo en 5 ml de medio LB, y se incubó a 37°C con agitación vigorosa, durante la noche. Al día siguiente, se inocularon 400 µl del cultivo inicial en 40 ml de medio LB y se incubó a 37°C con agitación moderada hasta que las células alcanzaran una densidad óptica de 0.5, a una longitud de onda de 600 nm. El cultivo se colectó en tubos cónicos de 50 ml y se centrifugó a 1,700 x g a 4°C durante 5 min, la pastilla fue resuspendida en 20 ml de amortiguador 1 frío (30 mM KOAc, 100 mM RbCl₂, 10 mM CaCl₂, 50 mM MnCl₂, pH 5.8) y se incubó durante 5 min a 4°C. Terminado este tiempo la muestra se centrifugó nuevamente a 1,700 x g a 4°C durante 5 min, la pastilla fue resuspendida en 2 ml de amortiguador 2 frío (10mM MOPS/KOH pH 6.5, 75 mM

CaCl₂, 10 mM RbCl₂, glicerol al 15%), se hicieron alícuotas y se almacenaron a -70°C hasta su uso.

La preparación de bacterias competentes *E. coli* BL21 pLys-S (usada para obtener grandes cantidades de proteína recombinante debido a que carece de proteasas) fue similar al procedimiento descrito anteriormente, excepto que las colonias se cultivaron en medio LB adicionado con cloranfenicol a una concentración de 34 µg/ml.

6.12 Transformación de células competentes

Para introducir los plásmidos deseados en las bacterias *E. coli*, se colocaron 200 µl de células competentes frescas y se agregaron 20 ng del plásmido, la mezcla se incubó durante 30 min a 4°C y posteriormente se dio un choque térmico durante 90 s a 42°C, seguido por una incubación de 3 min a 4°C. Al término de este tiempo se adicionaron 450 µl de medio LB y se incubó durante 1 h a 37°C con agitación vigorosa. Después de esta incubación, las células recién transformadas fueron espatuladas en cajas Petri que contenían medio LB/agar adicionado con ampicilina a (100 µg/ml) para las células DH5α, o bien con ampicilina y cloramfenicol (100 µg/ml y 34 µg/ml, respectivamente) en el caso de BL21 pLys-S. Finalmente estos cultivos se incubaron durante toda la noche a 37°C {Fox, 1957 #569}.

6.13 Conservación de bacterias transformadas

Una colonia de bacterias transformadas se cultivó en 5 ml de medio LB durante toda la noche, a 37°C con agitación vigorosa. Al día siguiente, el contenido de cada tubo se empastilló mediante centrifugación a 12,000 x g durante un minuto. El sobrenadante se decantó y la pastilla fue resuspendida en un volumen de 500 µl de glicerol diluido al 25% en medio LB en donde se adicionó ampicilina a una concentración final de 100 µg/ml. Posteriormente, la muestra se incubó a 4°C durante 10 minutos para que el glicerol pudiera penetrar bien a las células, terminado este tiempo las bacterias se almacenaron a -70°C hasta su uso.

En el caso de las bacterias de la cepa pLys-S transformadas, se adicionó cloranfenicol a una concentración de 34 µg/ml.

6.14 Purificación de plásmidos

Para realizar la extracción de plásmidos de las bacterias transformadas se utilizó el kit “*QIAGEN Plasmid Purification*” (QIAGEN). Las colonias resultantes de cada transformación se crecieron en 5 ml de medio LB y los respectivos antibióticos como se mencionó anteriormente durante toda la noche, a 37°C con agitación constante (200 rpm). Los cultivos iniciales fueron diluidos 1:500 en 500 ml de medio LB con antibiótico y se incubaron a 37°C por 12-16 h en agitación constante (150 rpm). A continuación, las bacterias se cosecharon por centrifugación a 6,000 x g, durante 15 min a 4°C y el sobrenadante se decantó. La pastilla fue resuspendida en 4 ml de amortiguador “P1”, posteriormente se le adicionaron 4 ml de amortiguador “P2”, se mezcló por inversión de 4 a 6 veces y se incubó a 4°C durante 15 min. La mezcla fue centrifugada a 20,000 x g durante 30 min a 4°C, se colectó el sobrenadante y se filtró para eliminar los detritus celulares no deseados. Al mismo tiempo, una columna QIAGEN-tip 100 fue equilibrada agregando 4 ml de amortiguador QBT y permitiendo que la columna se vaciara por la fuerza de gravedad. Una vez equilibrada la columna, se agregó el sobrenadante filtrado y se permitió su entrada a la resina mediante fuerza de gravedad. La columna se lavó con dos volúmenes de 10 ml de amortiguador QC y el ADN plasmídico fue eluido con 5 mL del amortiguador QF precalentado a 65°C. El ADN obtenido se precipitó adicionando 3.5 ml de isopropanol y se centrifugó a 2,500 x g durante 1.5 horas a 4°C. Al término de este tiempo, el sobrenadante se decantó cuidadosamente y la pastilla con el ADN se lavó con 2 ml de etanol al 70%, centrifugando a 2,500 x g durante 10 min. La pastilla se secó al aire durante 5-10 min o hasta que se evaporó completamente el etanol. Finalmente el ADN seco, fue resuspendido en un volumen apropiado de agua inyectable y se guardó a -20°C hasta su uso.

6.15 Secuenciación de las construcciones generadas

Para confirmar la ausencia de mutaciones en la secuencia de los genes *Ehvps2* y *Ehvps20*, *EhVps20(1-173)* y *Ehvps24* y para asegurarnos que se encontraban en el marco de lectura adecuado, se realizó la secuenciación nucleotídica de manera automatizada. Para estas secuenciaciones se utilizaron los oligonucleótidos iniciadores en sentido 5'- o en antisentido 3' que vienen detallados en el manual del usuario para el sistema *pGEX* (Amershan Biosciences).

6.16 Expresión de las proteínas recombinantes GST-EhVps2, GST-EhVps20 GST-EhVps20(1-173), GST-EhVps32(1-165) y GST-EhVps24

Los genes que codifican para las proteínas estudiadas en este proyecto fueron clonados en el vector de expresión *pGEX-6P-1*, el cual se encuentra bajo el control del promotor *Tac*, que es inducido por el isopropil- β -D-tio-galactósido (IPTG). Este vector presenta el gen *lacI^q* cuyo producto es una proteína represora que se une a la región del operador *tac* previniendo la expresión hasta la inducción por IPTG, manteniendo así un control riguroso sobre la expresión del inserto {Eron, 1971 #604}. Las construcciones *pGEX-6P-1-EhVps2*, *pGEX-6P-1-EhVps20*, *pGEX-6P-1-Ehvps20(1-173)*, *pGEX-6P-1-EhVps24* y *pGEX-6P-Ehvps32(1-165)* fueron transformadas en *E. coli BL21 pLys-S*. La inducción se realizó de acuerdo al manual del sistema *pGEX* (Amershan Biosciences) de la siguiente manera: una colonia de la cepa transformada se inoculó en 5 ml de medio LB adicionado con ampicilina (100 μ g/ml) y cloranfenicol (34 μ g/ml), las bacterias se crecieron en una incubadora con agitación orbital (*Lab-Line^R Incubator-Shaker*) a 37°C y 200 rpm. El cultivo se dejó crecer hasta alcanzar una densidad óptica de 0.8 a 600 nm de longitud de onda y entonces se llevó a cabo la inducción de la proteína recombinante mediante la adición de 0.1 mM de IPTG e incubándose a 16°C durante toda la noche. Un ml de cada cultivo se centrifugó a 12,000 x g durante 1 min y las pastillas se resuspendieron con 100 μ l de amortiguador de muestra 5X (Tris-HCl 0.5 M pH 6.8, glicerol 26%, SDS 10%, azul de bromofenol 0.05% y 5 μ l de β -mercaptoetanol). Las muestras se analizaron por medio de electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE) al 10 ó 12%.

6.17 Análisis de la solubilidad de las proteínas recombinantes

Para el análisis de la solubilidad de las proteínas recombinantes generadas, la biomasa de 100 ml de cultivo bacteriano donde se indujo la expresión de las proteínas recombinantes, se resuspendió en 2.5 ml de amortiguador de lisis (NaCl 300 mM, Tris-HCl pH 7.5 50 mM y EDTA 1 mM) y se sonicó en frío utilizando un sonicador ultrasónico de punta *Vibra-Cell Sonics^R* por 10 ciclos de 30 segundos cada uno. El lisado celular se centrifugó a 12,000 x g para separar la fracción soluble y la insoluble. Cada fracción se diluyó en amortiguador de muestra 5X, se hirvió por 5 min y se analizó por corrimiento electroforético para identificar la fracción en la cual se localizaban las proteínas recombinantes.

6.18 Purificación de las proteínas recombinantes

La purificación de las proteínas recombinantes se realizó de acuerdo al manual de acoplamiento y purificación de proteínas fusionadas a GST (Amersham Biosciences). Para ello, 1 ml de la resina correspondiente Glutación-Sefarosa “4 fast flow” se equilibró con 5 volúmenes de amortiguador PBS 1X frío y se centrifugó durante 1 min a 10,000 x g después de cada lavado. La purificación fue realizada siguiendo el protocolo “en *batch*”, en donde la resina correspondiente se incubó con los extractos proteicos de bacterias a 4°C con agitación constante durante 16 h y posteriormente se centrifugó a 10,000 x g durante 7 min a 4°C. La resina unida a la proteína recombinante fue lavada con 10 volúmenes de PBS 1X frío, centrifugando a 700 x g durante 1 min después de cada lavado. Las proteínas recombinantes fueron eluidas utilizando 500 µl de amortiguador de elución (50 mM Tris-HCl; 10mM glutatión reducido, pH 8.0) e incubando durante 30 min a 4°C en agitación constante. Posteriormente la muestra se centrifugó a 700 x g durante 1 min y se recuperó el sobrenadante en un tubo nuevo. Adicionalmente se realizaron tres eluciones más, siguiendo el mismo esquema. Las proteínas recombinantes fueron cuantificadas mediante el método de Lowry (Lowry et al., 1951). Finalmente, se tomó una alícuota de cada fracción de elución para su análisis mediante SDS-PAGE y por *Western-blot*.

6.19 Corte de la etiqueta de GST

Para determinar la función de cada una de las proteínas en el proceso de remodelación de membrana, fue necesario eliminar la etiqueta de GST de cada una de las proteínas recombinantes.

Para ello, las proteínas GST-EhVps2, GST-EhVps20, GST-EhVps20(1-173), GST-EhVps24 y GST-EhVps32(1-165) fueron dializadas en el amortiguador para la enzima *Precision Protease* (GE Healthcare) (50 mM Tris-Cl, 150 mM NaCl, 1mM EDTA, 1mM DTT, pH 7.5) y la proteína GST-Ehvps32 se dializó en el amortiguador para la enzima Factor Xa (GE Healthcare) (50 mM Tris-Cl, 150 mM NaCl, 1mM CaCl₂, pH 7.5) durante 24 h realizando dos recambios del amortiguador durante este tiempo. Posteriormente, se utilizaron 160 U de *Precision Protease* u 80 U de factor Xa según fuera el caso, dejando la reacción durante 4 h a TA. Finalizado este tiempo, la proteína recombinante sin etiqueta fue purificada al pasar la mezcla de reacción por la columna de GST 4B (GE Healthcare).

6.20 Obtención de anticuerpos policlonales

Para obtener anticuerpos policlonales mono-específicos que reconozcan a la proteína EhVps32 (purificada durante la maestría), se utilizaron 5 ratones machos de la cepa Balb/cJ de 4-6 semanas de edad y se inmunizó con 50 mg de la proteína recombinante emulsificada en un volumen igual de adyuvante Titer-Max Classic (Sigma). El volumen total de la mezcla se repartió en ambas piernas (vía muscular) y en la espalda (vía subcutánea) de cada animal. Previo al primer reto se obtuvo una muestra de sangre de cada animal para obtener el suero preinmune, el cual se utilizó como control negativo. Los animales se inmunizaron dos veces más utilizando la mitad de la concentración inicial del antígeno, con un intervalo de 20 días entre cada reto. La sangre se obtuvo 20 días después de cada reto y las muestras se incubaron a 37°C durante una hora para facilitar la separación del suero. Posterior a la incubación, la sangre se centrifugó a 2,000 x g durante 30 min para recuperar el suero, el cual se separó en alícuotas que se almacenaron a -20°C hasta su uso. El análisis de la especificidad y la titulación de los anticuerpos policlonales generados, se realizó mediante ensayos tipo *Western-blot*.

Los anticuerpos dirigidos contra la proteínas EhVps24 y EhVps20 fueron producidos en conejos Nueva Zelanda machos de aproximadamente medio Kg de peso, en donde se inmunizaron 100 µg de la proteína recombinante emulsificada en un volumen igual de adyuvante Titer-Max Classic (Sigma) y siguiendo el mismo esquema de inmunización que para los ratones.

Finalmente, la proteína recombinante EhVps2 fue inmunizada en ratas Wistar macho de 6 semanas de edad a una concentración de 60 µg emulsificada 1:1 con el adyuvante Titer-Max Classic (Sigma) y siguiendo el esquema descrito anteriormente.

6.21 Extracción de proteínas totales de *E. histolytica*

Para la extracción de proteínas totales, los trofozoítos se cosecharon cuando alcanzaron su fase logarítmica como se describió anteriormente. Posteriormente la pastilla fue resuspendida en p-hidroximercuribenzoato (PHMB); 1 ml por cada 15×10^6 de trofozoítos, en presencia de 20.5 µl de una mezcla de inhibidores de proteasas (PMSF 100 mM; Benzamidina 100 mM; Aprotinina 10 mg/ml; Pepstatina 1 mg/ml; leupeptina 10 mg/ml y E-64 1 mg/ml) por cada 500 µl de volumen final. La lisis celular se llevó a cabo congelando la muestra en nitrógeno líquido y descongelándola con agitaciones vigorosas en el vortex y realizando pases

consecutivos en hielo. Posteriormente, se cuantificaron las proteínas por el método de Bradford (Bradford, 1976) y los extractos amibianos se almacenaron en alícuotas a -70°C, hasta por un mes.

6.22 Electroforesis de proteínas en SDS-PAGE

Los extractos proteicos bacterianos y amibianos se analizaron en SDS-PAGE al 8 y 12% y la electroforesis se llevó a cabo a 70 V. Para determinar el peso molecular de las proteínas de interés, se utilizaron marcadores de peso molecular conocidos y preteñidos (Bio-Rad Dual Color).

Los geles fueron teñidos con solución de Coomassie (azul de Coomassie R-250 al 0.05%; metanol al 5% y ácido acético al 10%) durante 15 min. Posteriormente, los geles se destiñeron con una solución de metanol al 5% y ácido acético al 7%, haciendo varios cambios de esta solución hasta que se visualizaran las bandas de proteínas. Finalmente, los geles se secaron en un secador de geles (Bio-Rad) durante dos horas.

6.23 Ensayo de *Western-blot*

Los geles conteniendo las proteínas separadas por electroforesis se equilibraron en solución de transferencia (Tris 9 M; Glicina 1 M y metanol 20%). Posteriormente se armó la unidad de transferencia tipo “sándwich” de la siguiente manera: base negra, esponja, papel filtro, gel, membrana de nitrocelulosa, papel filtro, esponja y base blanca, el folder se cerró y la parte negra se colocó hacia el ánodo, dejando de esta manera, la membrana de nitrocelulosa orientada hacia el cátodo. El folder se colocó en una cámara de electrotransferencia (Mini Trans-Blot[®], Bio-Rad) que se llenó con solución de transferencia fría y se colocó en un baño de hielo. La transferencia se realizó a 400 mA, durante 75 min. Transcurrido este tiempo, los componentes de la cámara se desmontaron y la membrana se tiñó con solución de rojo de Ponceau (rojo de Ponceau 0.1% v/v y ácido acético 1% v/v), para verificar la correcta transferencia de las proteínas desde el gel hacia la membrana. La membrana fue desteñida rápidamente con solución de transferencia y se incubó con la solución bloqueadora (albúmina 1%; leche baja en grasas 3%; tritón-X100 0.05%, suero fetal bovino 2% y azida de sodio 0.02%), durante toda la noche a 4°C. Posteriormente, las membranas que contenían extractos bacterianos se incubaron con diferentes anticuerpos disueltos en solución bloqueadora durante 3 h a TA. A continuación, se realizaron 10

lavados con PBS-Tween al 0.1% durante 5 min cada uno y las membranas se incubaron con los anticuerpos secundarios correspondientes acoplados a la enzima peroxidasa de rábano picante (HRP por sus siglas en inglés *Horseradish peroxidase*) diluidos 1:2000 en PBS-Tween 0.1% y leche al 3% durante 1 hora a TA. Después de tres lavados con PBS-Tween 0.1%, dos lavados con PBS 20mM, un lavado con PBS 50 mM, de 5 min cada uno, la unión antígeno-anticuerpo en el caso de las proteínas recombinantes obtenidas de extractos bacterianos, se reveló con la adición de solución reveladora de 4-Cl-Naftol (PBS 50mM, H₂O₂ 30%, 4-Cl-Naftol) y se mezcló hasta observar la aparición de bandas, para detener la reacción se utilizó agua destilada.

Para analizar la unión antígeno-anticuerpo en el caso de extractos proteicos de trofozoítos se utilizó la técnica de quimioluminiscencia. Para ello, se realizaron los lavados como se detalló anteriormente omitiendo los lavados con PBS 20 y 50 mM y se utilizó el kit *ECLTM Prime Western blotting detection reagent* (GE-Healthcare) para revelar las proteínas inmunodetectadas en el equipo MicroChemi 4.2 (DNR bio-imaging Systems).

6.24 Obtención de eritrocitos humanos

Eritrocitos humanos de tipo O+ se aislaron a partir de 3 ml de sangre periférica obtenida por punción venosa, a los cuales se le agregaron 3 ml de solución Alsever (0.275 g de ácido cítrico, 4 g de citrato de sodio, 2.1 g de cloruro de sodio, 10.25 g de dextrosa, pH 6.1) utilizado como anticoagulante. La sangre fue centrifugada a 2,000 x g durante 10 min y la pastilla se lavó tres veces con la solución Alsever. Los eritrocitos obtenidos fueron resuspendidos en medio TYI sin suero quedando a una concentración final de 1×10^8 cel/ml. En caso de usarse inmediatamente se incubaron a 37°C o bien, fueron guardados a 4°C hasta por un mes.

6.25 Ensayos de inmunofluorescencia

1×10^6 trofozoítos de *E. histolytica* se cosecharon en frío y se resuspendieron en 12 ml de medio TYI sin suero, 2 ml de la suspensión celular se colocó en placas de cultivo que contenían un cubreobjetos estéril y se incubó a 37°C durante 3 h para permitir la adhesión de los trofozoítos al vidrio. Para los ensayos de eritrofagocitosis, se añadieron 500 µl de eritrocitos (a una concentración de 1×10^8) y ambas células se incubaron durante 5, 10, 15, 30, 45 y 60 min, a 37°C. Las preparaciones se

lavarón rápidamente con PBS frío para eliminar los eritrocitos no fagocitados. Posteriormente, la preparación se fijó con paraformaldehído al 4% a 37°C durante 30 min, se lavó 4 veces con PBS y se permeabilizó con tritón X-100 al 0.2% durante 7 min. Después de un lavado con PBS estéril, las muestras se bloquearon con 100 µl de suero fetal bovino al 10%, durante 1 h a TA. En el caso de ensayos de colocalización con Lysotracker, previo a la fagocitosis, los trofozoítos fueron incubados con 2 µM de Lysotracker red (Molecular probes) durante toda la noche. Este compuesto permite marcar organelos de naturaleza ácida.

A continuación, se incubó el anticuerpo primario policlonal o el suero pre-inmune durante 1 h a 37°C. Después de tres lavados con PBS 1X, se incubó con el anticuerpo secundario (en caso de ser necesario) acoplado a un fluorocromo (FITC o TRITC) durante 40 min a 37°C y nuevamente se realizaron tres lavados con PBS. Para teñir los núcleos las muestras se incubaron con DAPI (diclorhidrato de 4',6-diamidino-2-fenilindol) a una concentración de 0.25 mg/ml durante 5 min a temperatura ambiente, seguido por cuatro lavados con PBS para eliminar el exceso de DAPI. El montaje de las muestras se realizó con "Vectashield" (Vector Lab) para preservar la fluorescencia. Finalmente las muestras se colocaron sobre portaobjetos y se sellaron con barniz alrededor de cada cubreobjeto. Las preparaciones se almacenaron a -20°C hasta que fueron analizadas.

Para examinar las muestras se utilizó un microscopio Carl Zeiss LSM 700 Imager.Z2 donde secciones ópticas de grosor variable fueron documentadas para analizarlas utilizando el software proporcionado por el fabricante (ZEN 2009 Light Edition de Zeiss).

6.26 Microscopia electrónica de transmisión.

Muestras de trofozoítos transfectados con el vector *pNEO* o *pNEO-EhVps32-HA* fueron fijadas con glutaraldehído al 2.5% (v/v) diluido en un amortiguador de cacodilato de sodio 0.1 M pH 7.2. Después, las muestras se post-fijaron durante 60 min con tetraóxido de sodio 1% (p/v) en el mismo amortiguador usado en la fijación. Posteriormente, se realizó la deshidratación utilizando concentraciones crecientes de etanol y óxido de propileno y las muestras fueron embebidas en resinas epóxicas Polybed y polimerizadas a 60°C durante 24 horas. Finalmente secciones delgadas de aproximadamente 60 nm fueron contrastadas con acetato de uranilo y citrato de

plomo, las muestras se examinaron en un microscopio electrónico de transmisión Joel JEM-1011.

En el caso de los experimentos con marcaje de oro coloidal, los trofozoítos se fijaron con PFA al 4% y glutaraldehído al 0.5% en PBS durante 1 h a TA. Las muestras se embebieron en resina LR White (London Resin Co) y se polimerizaron en UV a 4°C durante toda la noche. Finalmente, se obtuvieron secciones delgadas que fueron montadas en rejillas de níquel recubiertas con formvar (Agar Scientific). Una vez montadas las muestras se adicionó el anticuerpo policlonal correspondiente y se incubó durante toda la noche a TA, a continuación se incubó el anticuerpo secundario acoplado a partículas de oro coloidal de 20 nm (Ted Pella Inc) durante toda la noche a TA. Las muestras se analizaron en el microscopio de transmisión electrónica Joel JEM-1011.

6.27 Tinción negativa

Cinco mililitros de proteína recombinante purificada a una concentración de 1 mg/ml fueron colocados con una pipeta en la superficie de una rejilla de níquel cubierta con formvar. Después de 5 min, el exceso fue removido con papel filtro y se hizo la tinción con acetato de uranilo al 2.5%. Las rejillas fueron colocadas al aire para secarse completamente y después se sometieron a un baño con carbono. Las muestras se analizaron en el microscopio de transmisión electrónica Joel JEM-1011.

6.28 Microscopía electrónica de barrido

Muestras fijadas con glutaraldehído al 2.5% fueron deshidratadas con concentraciones crecientes de etanol y secadas al punto crítico con CO₂ dentro de un aparato Samdri-795. Después, la muestra se recubrió con oro en un dispositivo de pulverización de iones (Jeol-JFC-1100). Las muestras se examinaron en el microscopio de barrido Jeol JSM-7100F.

6.29 Generación de Vesículas Unilamelares Gigantes (GUVs)

Los liposomas son estructuras en las que las moléculas de lípidos se encuentran dispuestas en una bicapa lipídica esférica. Estas estructuras representan un buen modelo de membrana utilizado para analizar las interacciones lípido-proteína y proveen una información más viable comparado con las micelas (Zhao y Lappalainen, 2012). Entre los liposomas se encuentran las vesículas multilamelares y

unilamelares. Las GUVs son agregados de gran tamaño compuestas por una bicapa lipídica única y esférica, lo cual nos permite estudiar aspectos físicos de las membranas biológicas a través de técnicas de microscopía. Además, el tamaño y el radio de curvatura de estas vesículas son muy similares al de las células, razón por la cual estos sistemas son considerados ideales para el estudio de interacciones lípido-lípido, lípido-proteína y lípido-ADN (Percot y Lafleur, 2001; Sanchez y Gratton, 2005).

Uno de los métodos para obtener GUVs es la electroformación, el cual nos permite obtener poblaciones de vesículas relativamente homogéneas en tamaño (entre 30 y 60 μm de diámetro), con alto porcentaje de vesículas unilamelares (~95%), a diferencia de otros métodos que sólo nos permite alcanzar un poco más de 20% de vesículas unilamelares (Angelova y Dimitrov, 1986). La técnica se basa en colocar una mezcla de lípidos entre dos alambres de platino o en una superficie de vidrio recubierta con óxido de indio y estaño. La película de lípidos se seca en presencia de un campo eléctrico que hace vibrar el alambre con la película de lípidos, a una frecuencia y amplitud predeterminadas, permitiendo así la formación de vesículas al hidratar la película seca de lípidos. Dicho procedimiento debe realizarse a una temperatura superior a la de transición de fase del lípido (o mezcla de ellos), ya que si se realizara a una temperatura menor, la alta viscosidad de la membrana rígida evitaría la formación de las vesículas (Angelova y Dimitrov, 1986; Zhao y Lappalainen, 2012).

Para preparar las GUVs, se colocaron diferentes mezclas de lípidos

- A) 62 mol% de POPC (1-palmitoil-2-oleoil-*sn*-glicero-3-fosfocolina), 10 mol% de POPS (1,2-palmitoil-oleoil-*sn*-glicero-3-fosfoserina), 3 mol% de Ptlns(3)P y 0.1 mol% de TexasRed-PE (1,2-palmitoil-*sn*-glicero-3-fosfoetanolamina-N-(lissamina TexasRed sulfonil) (Wollert et al., 2009)
- B) Sólo DOPG (1,2-Dioleoyl-*sn*-glicero-3-fosfoglicerol)
- C) Sólo DOPC (1,2-Dioleoyl-*sn*-glicero-3-fosfocolina)
- D) 65 mol% esfingomielina, 25 mol% colesterol, 10 mol% DOPG y 0.1 mol% Dil-PE (GUVs líquido-ordenadas)

en un vidrio cubierto con óxido de indio y estaño, el exceso de solvente, que en este caso era cloroformo, fue evaporado en un desecador conectado al vacío durante 2 h a temperatura ambiente. A continuación, se realizó el montaje del sistema colocando dos vidrios separados por un espaciador en donde se colocó una solución de

sacarosa 600 mM y se aplicó un campo eléctrico de aproximadamente 2.5 V (10 Hz). La duración total de la aplicación del campo eléctrico fue de 2 h a TA. Después de enfriar, las GUVs fueron recolectadas y utilizadas inmediatamente para los ensayos de reconstrucción de la maquinaria ESCRT-III *in vitro*.

6.30 Marcaje de proteínas recombinantes EhVps20, EhVps20 (1-173), EhVps32 y EhVps32 (1-165) con Alexa 488

Con la finalidad de analizar el mecanismo por el cual funciona la maquinaria, se procedió al marcaje fluorescente de las proteínas recombinantes de tal manera que pudiéramos visualizar cuáles proteínas se encontraban en contacto directo con los lípidos en el modelo de GUVs y delimitar la proteína que desencadena el inicio de la polimerización de la maquinaria ESCRT-III.

El marcaje de proteínas se realizó utilizando Alexa Fluor 488 Succinimidil Ester (Molecular Probes) que a través del grupo éster succinimidil se une a aminas primarias localizadas en la proteína. Para ello, la proteína purificada fue diluida a una concentración final de 2 mg/ml y posteriormente dializada en amortiguador de bicarbonato de sodio 0.2 M, pH 8.3, después se incubó junto con el fluorocromo durante 4 h a 4°C protegiendo de la luz en todo momento a la reacción. La purificación de la proteína marcada fue llevada a cabo mediante cromatografía de exclusión de tamaño molecular utilizando una columna HiLoad 16/60 Superdex (GE healthcare) en un aparato ÄKTApurifier (GE Healthcare).

6.31 Análisis funcional de ESCRT-III en GUVs

Una cámara de observación de 200 μ l (cámara Lab-Tek #1.0 borosilicio) fue recubierta con 1 mg/ml de BSA para evitar la distorsión de las GUV's cuando toquen el fondo de la cámara la cual se llenó con amortiguador (Tris-HCl 50 mM pH 7.4, NaCl 300 mM). A continuación, 100 μ l de GUV's fueron mezcladas con el amortiguador de la cámara y se incubó durante 5 min. El amortiguador y todas las proteínas recombinantes poseían la misma osmolaridad que la solución de las GUVs. Posteriormente se agregó EhVps20 (completa) o EhVps20(1-173) para tener una concentración final de 125 nM. La solución se mezcló suavemente y 5 min después de incubarla a TA, se agregaron cada 5 min y en ese orden las proteínas EhVps32, EhVps24 y EhVps2 (a una concentración final de 300 nM, 100 nM y 100 nM, respectivamente). Para visualizar la formación de ILVs, la membrana de las GUVs

fue marcada con un lípido acoplado a TexasRed. Como control negativo se realizaron los ensayos empleando únicamente el amortiguador en el cual estaban disueltas las proteínas. Las muestras fueron analizadas mediante microscopía confocal.

6.32 Sobre-expresión de la proteína EhVps32

Con el objetivo de sobre-expresar a la proteína EhVps32, se realizó una transfección del vector *pNEO-EhVps32-HA* (obtenido durante el proyecto de Maestría) en trofozoítos de *E. histolytica*. Para esto, un inóculo de 3×10^5 amibas se cultivaron en palcas de cultivo de seis pozos durante toda la noche y con una presión parcial al 5% de CO₂, al día siguiente, las amibas se lavaron con 5 ml de medio M199 (Sigma) precalentado y se cultivaron con 1.8 ml de medio M199 suplementado con 15% de suero bovino adulto (Microlab). Posteriormente se añadió lentamente la mezcla de transfección (20 µg del plásmido, 100 µl de medio M199 precalentado y 20 µl de Superfect [Qiagen]) que se incubaron 10 min a TA) y las amibas se colocaron en una incubadora con 5% de CO₂ durante 3 h a 37°C. Después, las amibas se enfriaron y se transfirieron a un tubo con 10 ml de medio LB precalentado y se colocaron a 37°C en una incubadora sin CO₂. Doce horas después de realizada la transfección se realizaron los ensayos correspondientes de microscopías electrónicas y eritrofagocitosis.

6.33 Silenciamiento de la proteína EhVps32

Para silenciar la proteína EhVps32, las primeras 431 pares de bases del extremo 5' del gen *Ehvps32* fueron amplificadas mediante PCR y clonadas en el vector *pJET1.2/blunt*. Después, el fragmento se subclonó en el vector *pSAP/Gunma* rio abajo del segmento 5' del gen *EhAp-A* (Mirelman et al., 2006), empleando los sitios de restricción 5' *StuI* y 3' *SacI* con los oligonucleótidos descritos en la tabla 1. Trofozoítos de la clona G3 fueron transfectados con la construcción *pSAP2/GunmaEhVps32-431*, utilizando el método descrito anteriormente. Los ensayos fueron realizados 12 h posteriores a la transfección.

6.34 Ensayos de eritrofagocitosis

Para medir la capacidad de ingesta de eritrocitos de las clonas generadas, los trofozoítos transfectados fueron incubados con eritrocitos humanos (relación 1:25)

durante 2, 5 y 30 min a 37°C. Posteriormente, los trofozoítos fueron lisados y la concentración de hemoglobina fue cuantificada por espectrofotometría a una DO de 400 nm. En paralelo, muestras de todos los tiempos de interacción fueron teñidas con 2 mg/ml de 3,3'-diaminobencidina (Sigma) y visualizadas mediante microscopía de luz.

7. RESULTADOS

7.1 Análisis *in silico* de los miembros de la maquinaria ESCRT-III en *Entamoeba histolytica*.

El objetivo general de este proyecto fue la caracterización de la maquinaria ESCRT-III en el parásito protozoario *E. histolytica* así como su participación en el proceso fagocítico de este microorganismo. Los miembros putativos de la maquinaria ESCRT en *E. histolytica* fueron descritos en el 2010 por López-Reyes y colaboradores quienes encontraron el transcrito de al menos 15 miembros de esta maquinaria (López-Reyes et al., 2010). En relación al complejo ESCRT-III, López-Reyes identificó a las proteínas EhVps2, EhVps32 y EhVps24. Sin embargo, debido a que no se contaba aún con un adecuado refinamiento en la secuenciación del genoma de *E. histolytica*, encontró varios genes candidatos para la proteína EhVps20.

Al momento de realizar este trabajo de doctorado, el genoma amibiano ya se encontraba más depurado, lo cual nos permitió identificar el homólogo amibiano de Vps20. La búsqueda del homólogo fue realizada por dominio, introduciendo el dominio SNF7, presente en todos los miembros de la maquinaria ESCRT-III (Winter y Hauser, 2006), en el motor de búsqueda de la base de datos de amibas (<http://www.amoebadb.org>). Esta búsqueda arrojó 4 proteínas putativas, las 3 descritas previamente y EhVps20. Los valores de homología, similitud y valor de *e* se muestran en la Tabla 2.

Los resultados obtenidos demuestran que las proteínas presentan mayor similitud en su secuencia de aminoácidos a las que posee la levadura *S. cerevisiae* (45%) en comparación con las presentes en *H. sapiens* (36%). Como podemos observar, los valores de Identidad son bajos en comparación con otras proteínas homólogas que se encuentran en la amiba (23% en ambos casos), aún así los porcentajes de similitud y valor de *e* parecen ser suficientes para clasificar a estas proteínas como miembros de la maquinaria ESCRT-III.

Tabla 2: Comparación de la maquinaria ESCRT-III de *E. histolytica*, *S. cerevisiae* y *H. sapiens*

<i>Entamoeba histolytica</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>				<i>Homo Sapiens</i>			
Proteína putativa	Proteína	Valor e	S (%)	I (%)	Proteína	Valor e	S (%)	I (%)
EhVps2	Vps2	2e - 05	50	29	CHMP2A	8,9e - 24	55	29
	-	-	-	-	CHMP2B	7,9e - 16	48	25
EhVps20	Vps20	0,008	45	23	CHMP6	9e - 08	36	23
EhVps24	Vps24	2,2e - 05	48	22	CHMP3	0,07	19	25
EhVps32	Vps32	2,5e - 12	48	25	CHMP4A	0,0012	48	24
	-	-	-	-	CHMP4B	9,6e - 07	43	20
	-	-	-	-	CHMP4C	1,4e - 06	43	20

S = similitud

I = identidad

7.2 Estructura de las proteínas ESCRT-III.

Además de la presencia del dominio SNF7 en todos los miembros de la maquinaria ESCRT-III, otra característica compartida por estas proteínas es la presencia de al menos 5 hélices α en su estructura secundaria, lo cual favorece la formación de dominios *coiled-coil* necesarios para la unión hacia lípidos y otras proteínas (Muziol et al., 2006; Shen et al., 2014). Para verificar si los miembros de la maquinaria ESCRT-III del parásito *E. histolytica* conservan estas estructuras, la secuencia de aminoácidos de cada proteína fue analizada mediante el servidor Phyre2 (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2/html/page.cgi?id=index>), el cual utiliza proteínas cristalizadas previamente como molde para predecir la estructura secundaria y 3D de las proteínas analizadas.

En todos los casos, los resultados mostraron la presencia de las 5 α -hélices, así como del *k-linker*, una región altamente hidrófoba que funciona como bisagra para generar las formas activas y autoinhibidas de estas proteínas (Fig. 6, panel A). A partir de esta información, el programa Phyre 2 generó los posibles modelos tridimensionales para cada proteína (Fig. 6, paneles B, C, D y E). A simple vista observamos que, al igual que EhVps32 (López-Reyes et al., 2011), las proteínas de amiba son más similares a las de humano que a las de la levadura *S. cerevisiae* (Fig. 6, paneles B, C, D y E).

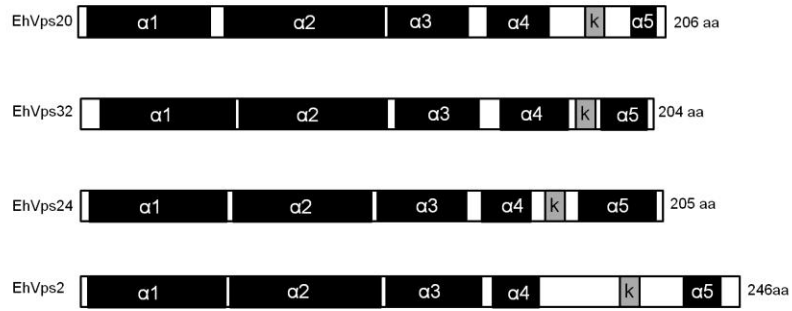
7.3 Clonación de EhVps2, EhVps20, EhVps20 (1-173) y EhVps24

7.3.1 Clonación en pJET1.2/blunt

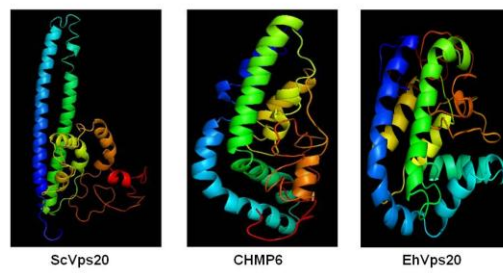
Para llevar a cabo la clonación de las proteínas del ESCRT-III en el vector de expresión, utilizamos previamente el vector de transición denominado *pJET1.2/blunt*, el cual permite la clonación directa de productos de PCR a partir de los extremos romos dejados por la polimerasa de alta fidelidad durante la reacción de PCR. Para lograr este objetivo se diseñaron y sintetizaron oligonucleótidos en sentido y en antisentido que amplificaran específicamente el gen que codifica cada una de las proteínas estudiadas (Tabla 1). Estos oligonucleótidos se emplearon para amplificar el gen que codifica para cada proteína a partir de ADN genómico con el objetivo de evaluar si los genes se encontraban presentes y si poseían el tamaño reportado en las bases de datos.

Figura 6. Predicción estructural de las proteínas del complejo ESCRT-III. La secuencia de aminoácidos de las diferentes proteínas fue analizada en el servidor Phyre 2 **(A)** Representación de la estructura secundaria para EhVps20, EhVps32, EhVps24 y EhVps2. *k*: dominio k-linker. **(B)** Predicción de las estructuras terciarias de EhVps20 y sus homólogos ScVps20 y CHMP6. **(C)** Predicción de las estructuras terciarias de EhVps32 y sus homólogos Snf7 y CHMP4 A-C. **(D)** Predicción de las estructuras terciarias de EhVps24 y sus homólogos ScVps24 y CHMP3. **(E)** Predicción de las estructuras terciarias de EhVps2 y sus homólogos ScVps2 y CHMP2 A y B.

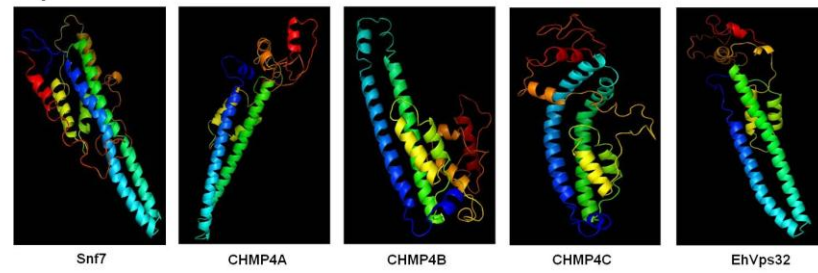
A)



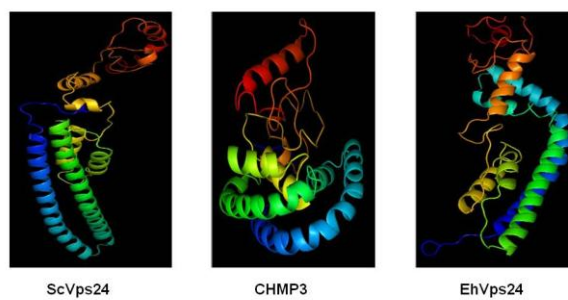
B)



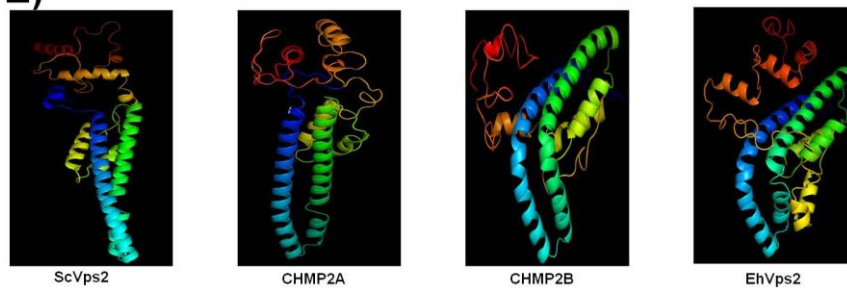
C)



D)



E)



Mediante PCR y empleando los pares de oligonucleótidos correspondientes para cada gen, obtuvimos amplificados de 833, 674 y 755 pb (Fig. 7, panel A, carriles 3, 5 y 7), que corresponden a los tamaños esperados para los genes *Ehvps2*, *Ehvps24* y *Ehvps20*, respectivamente. Como control negativo se llevó a cabo la reacción de PCR en ausencia de ADN molde (Fig. 7, carriles 2, 4 y 6). Una vez que se estandarizaron las condiciones para la reacción de PCR se procedió a la amplificación de cada uno de los genes a partir de cADN. Esto se realizó debido a que los tres genes presentan una secuencia no codificante. Mediante ensayos de PCR obtuvimos amplificados de 741 pb para *Ehvps2* (Fig. 7 panel B, carril 3); 621 pb para *Ehvps20* (Fig. 7, panel B, carril 5); 522 pb para *Ehvps20(1-173)* (Fig. 7, panel C, carril 3); 498 pb para *EhVps32(1-165)* (Fig. 7 panel E, carril 2). En el caso de *Ehvps24* encontramos dos amplificados, uno de 618 pb, del tamaño esperado y otro un poco mayor a 700 pb que parece que aún retiene el intrón (Fig. 7, panel D, carril 3). En todos los casos, los amplificados poseen el tamaño esperado. Como control negativo, se realizó la reacción de PCR empleando ARN tratado con DNAsa para verificar que el material utilizado para la retro-transcripción no estuviera contaminado con ADN genómico (Fig. 7, panel B, carriles 2 y 4; paneles C y D, carril 2; panel E, carril 3).

El producto amplificado se purificó, se cuantificó y se clonó directamente en el vector de transición *pJET1.2/blunt* (Fig. 8) en una proporción 1:3 (vector : inserto).

Las construcciones generadas fueron denominadas *pJET1.2-Ehvps2*, *pJET1.2-Ehvps20*, *pJET1.2-Ehvps20(1-173)*, *pJET1.2-Ehvps24* y *pJET1.2-EhVps32(1-165)*. Todas las construcciones generadas fueron transformadas por separado en bacterias y las colonias seleccionadas se emplearon para extraer el ADN plasmídico. Adicionalmente, cada uno de los plásmidos purificados se analizó por restricción enzimática con *BamHI*, para verificar que el plásmido linearizado fuera del tamaño correcto (Fig. 9, paneles A-E, carril 2); y con *BamHI* y *Sall*, para corroborar la presencia del inserto en los tamaños esperados (Fig. 9, paneles A-E, carril 3).

Figura 7. Amplificación de los genes *Ehvps2*, *EhVps20*, *EhVps20(1-173)*, *EhVps24* y *Ehvps32(1-165)* (A) Amplificación de los genes *Ehvps2*, *EhVps20* y *EhVps24* empleando oligonucleótidos específicos para amplificar los genes completos y utilizando como molde ADN genómico. El producto de las reacciones de PCR se analizó mediante un gel de agarosa al 1%. Carril 1: marcadores de número de pares de bases. Carril 2, 4 y 6: control negativo donde no se utilizó ADN como molde. Carril 3: gen amplificado *Ehvps2*. Carril 5: gen amplificado *Ehvps20*. Carril 7: gen amplificado *Ehvps24*. (B) Amplificación de *EhVps2* y *Ehvps20* utilizando ADN de cadena complementaria. Los productos de las reacciones se analizaron en gel de agarosa al 1.5%. Carril 1: marcadores de pares de bases. Carril 2 y 4: control negativo donde se empleó ARN como molde. Carril 3: amplificación de *Ehvps2* sin la presencia del intrón. Carril 4: amplificación de *Ehvps20* sin el intrón. (C) Amplificación de *Ehvps20 (1-173)* a partir de ADN de cadena complementaria. Carril 1: marcadores de pares de bases. Carril 2: control negativo donde se utilizó ARN como molde. Carril 3: producto amplificado. (D) Amplificación de *Ehvps24* a partir de ADN de cadena complementaria. Carril 1: marcadores de pares de bases. Carril 2: control negativo en el que se utilizó ARN como molde. Carril 3: producto amplificado. Kb: kilobases. (E) Amplificación de *EhVps32(1-165)* a partir de ADN de cadena complementaria. Carril 1: marcadores de pares de bases. Carril 2: producto amplificado. Carril 3: control negativo. Flechas: tamaño de los amplificados.

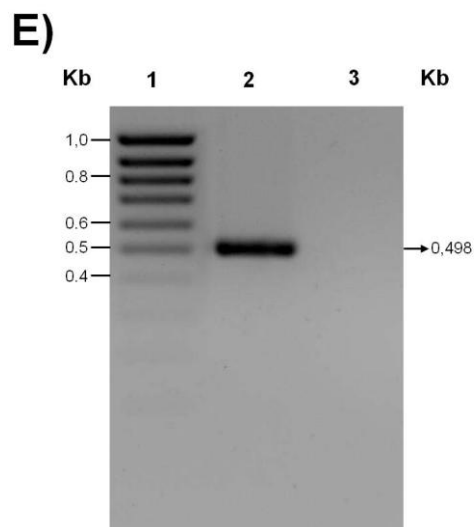
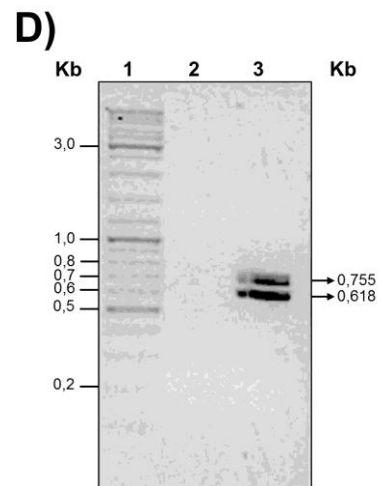
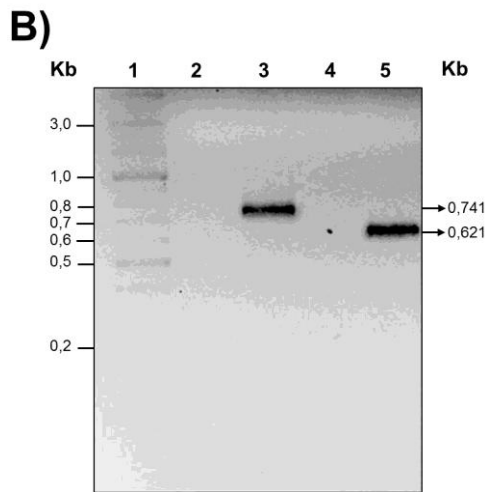
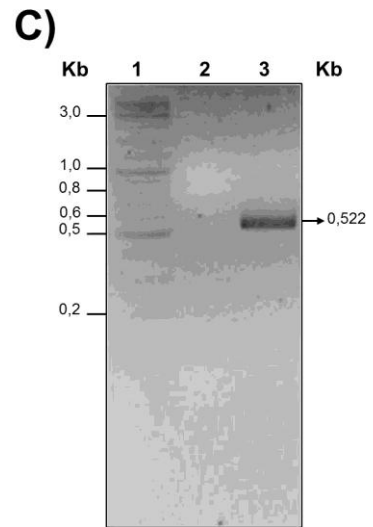
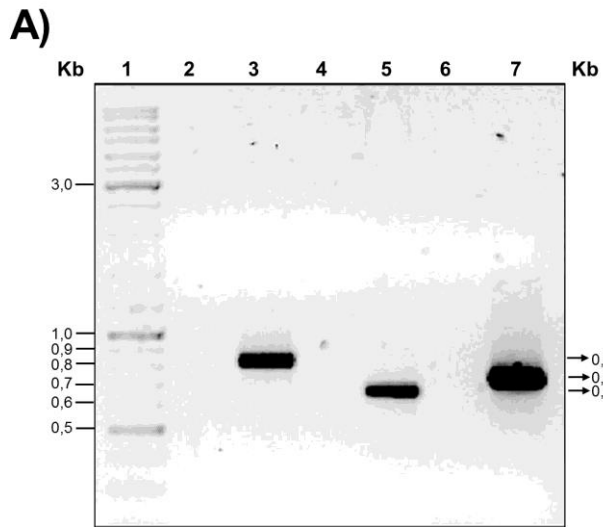


Figura 8. Mapa del vector *pJET1.2/blunt*. Este vector se empleó para la clonación directa de los genes *Ehvps2*, *Ehvps20*, *Ehvps20(1-173)*, *Ehvps24* y *Ehvps32(1-165)*, usando los extremos romos dejados por la polimerasa de alta fidelidad.

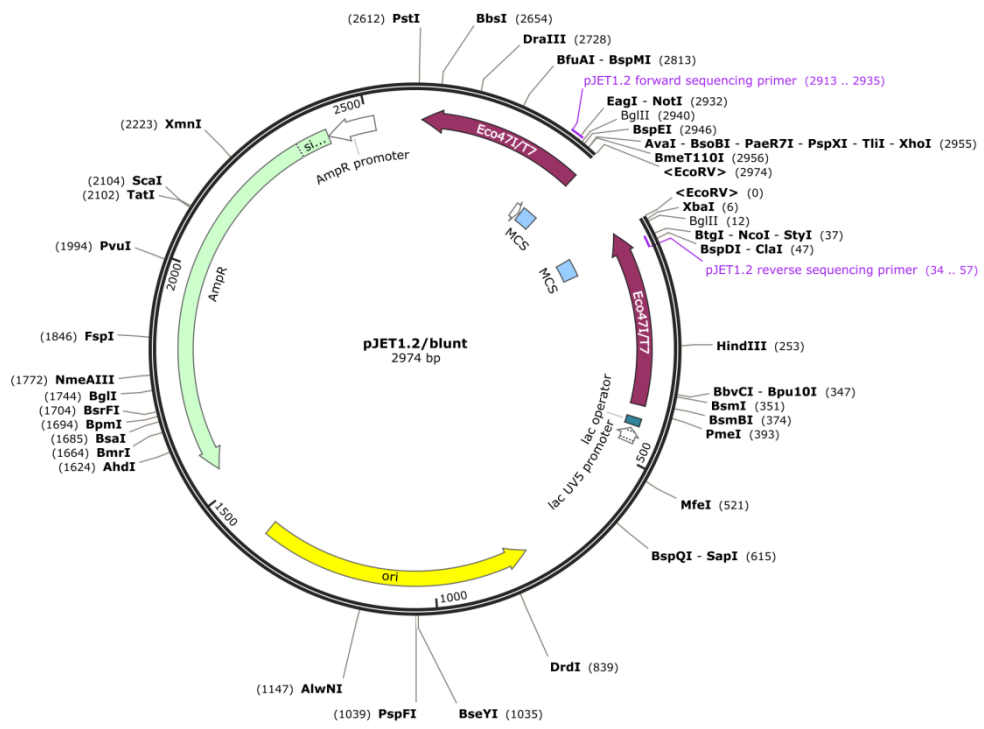
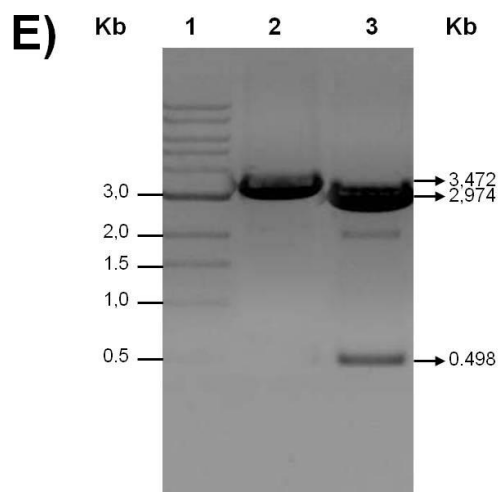
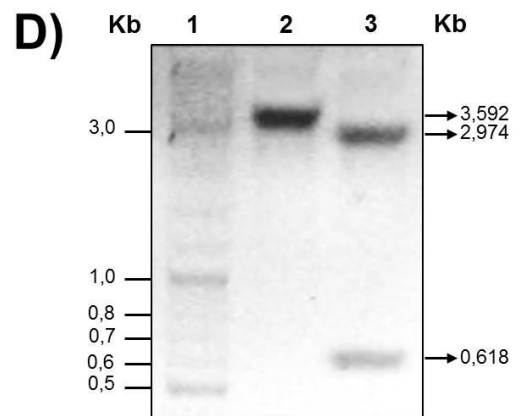
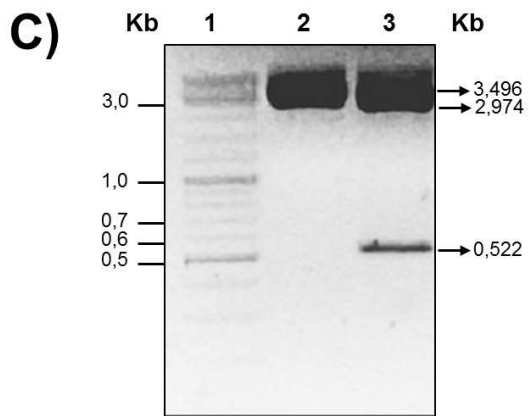
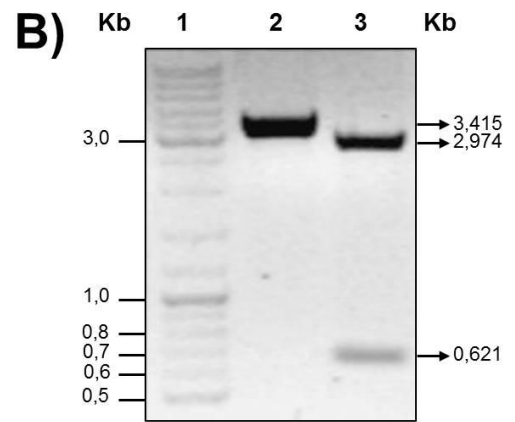
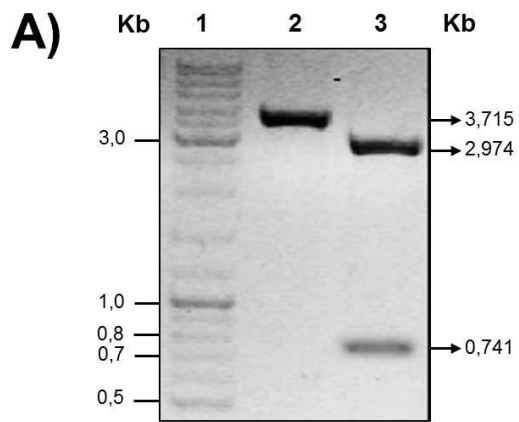


Figura 9. Clonación de los genes *Ehvps2*, *Ehvps20*, *Ehvps20(1-173)*, *Ehvps24* y *Ehvps32(1-165)* en el vector de transición *pJET1.2/blunt*. Análisis por restricción enzimática de los plásmidos purificados. Los plásmidos **(A)** *pJET1.2-Ehvps2*, **(B)** *pJET1.2-Ehvps20*, **(C)** *pJET1.2-Ehvps20(1-173)*, **(D)** *pJET1.2-Ehvps24* y **(E)** *pJET1.2-Ehvps32(1-165)* fueron procesados con las enzimas *BamHI* o bien, con *BamHI* y *Sall* y los productos de estas reacciones se analizaron en geles de agarosa al 1.5%. Carril 1: marcadores de pares de bases. Carril 2: plásmido digerido con la enzima *BamHI*. Carril 3: plásmido digerido con las enzimas *BamHI* y *Sall*. Kb: kilobases. Flechas: tamaño de los productos.



7.3.2 Clonación en *pGEX-6P-1*

Para poder llevar a cabo la purificación de cada una de las proteínas recombinantes se utilizó el vector de expresión *pGEX-6P-1* (Fig. 10). Este vector, otorga una etiqueta de GST en el extremo amino terminal de la proteína generada la cual nos permite identificarla y purificarla de acuerdo al manual del proveedor. Nuestros genes de interés fueron clonados entre los sitios de restricción *BamHI* y *Sall* en el vector *pGEX-6P-1*. Para obtener las distintas construcciones, se realizó una doble digestión enzimática de *pGEX-6P-1* con las enzimas mencionadas que junto con los genes liberados provenientes de las construcciones en *pJET1.2* fueron purificados y cuantificados. Posteriormente se realizó la ligación con la proporción 1:5 (vector: inserto), cuyo producto fue transformado en bacterias competentes y a las clonas resultantes se les extrajo el ADN plasmídico. Cada uno de los plásmidos obtenidos fue analizado mediante restricción con la enzima *BamHI*, donde observamos los plásmidos linearizados de los tamaños esperados (Fig. 11, paneles A-E, carril 2); o bien, por medio de una doble restricción con *BamHI* y *Sall* que catalizaron la liberación de los insertos en los tamaños esperados, respectivamente (Fig. 11, paneles A-E, carril 3). Asimismo, encontramos el fragmento de ~5,000 pb que corresponde al vector *pGEX-6P-1* vacío (Fig. 11, paneles A-E, carril 3).

El inserto en cada una de las construcciones obtenidas fue secuenciado de manera automática y el resultado fue sometido a un análisis “*blast*” en la bases de datos AmoebaDB, donde presentó un 100% de identidad con las proteínas EhVps2 (Fig. 12), EhVps20 (Fig. 13), EhVps20(1-173) (Fig. 14) y EhVps24 (Fig. 15).

Estos hallazgos nos confirmaron que todas las proteínas fueron clonadas en marco de lectura y sin mutaciones; por lo cual pudimos proceder a realizar la expresión de las proteínas recombinantes.

7.4 Expresión y purificación de las proteínas recombinantes GST-EhVps2, GST-EhVps20, GST-EhVps20(1-173) y GST-EhVps24

Para expresar las proteínas recombinantes, cada una de las construcciones plasmídicas en *pGEX-6P-1* fue transformada en bacterias competentes *E. coli* BL21 (DE3) *pLys-S* debido a que esta cepa es deficiente de proteasas y representa un buen recurso para la producción de proteínas recombinantes. En todos los casos la inducción se realizó utilizando 0.1 mM de IPTG durante toda la noche a 16°C.

Figura 10. Mapa del vector *pGEX-6P-1*. Este vector se empleó para la subclonación de los genes *Ehvps2*, *Ehvps20*, *Ehvps20(1-173)*, *Ehvps24* y *Ehvps32(1-165)*.

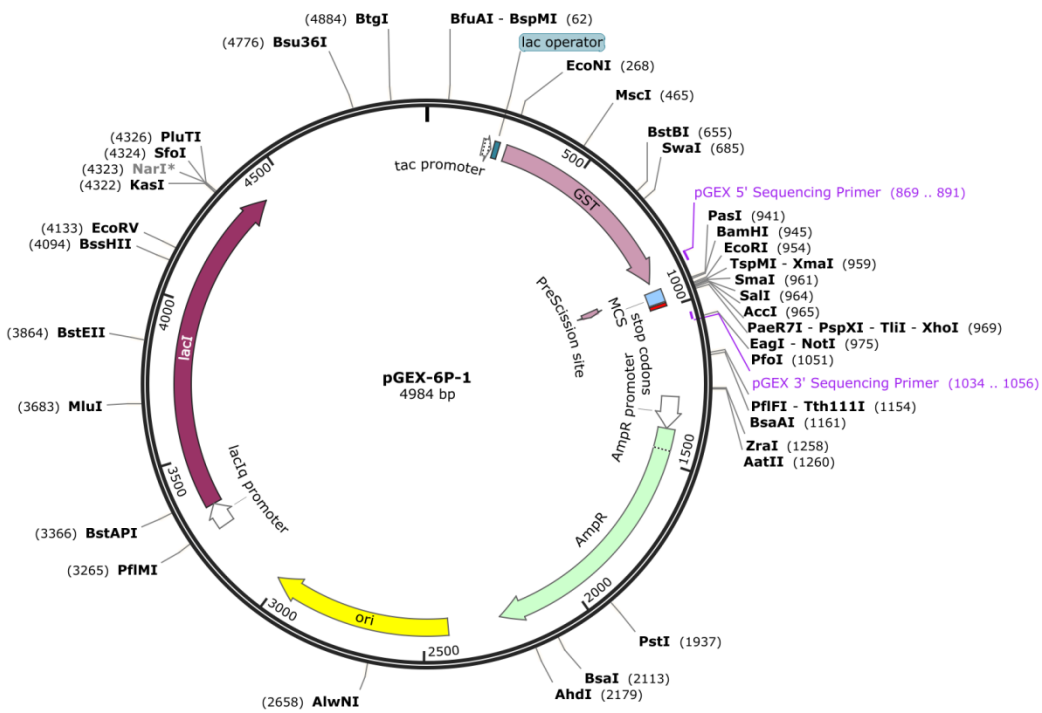


Figura 11. Sub-clonación en el vector de expresión pGEX-6P-1. Análisis por restricción enzimática de los plásmidos purificados. Los plásmidos **(A)** *pGEX6P-Ehvps2*, **(B)** *pGEX6P-EhVps20*, **(C)** *pGEX6P-Ehvps20(1-173)*, **(D)** *pGEX6P-Ehvps24* y **(E)** *pGEX6P-EhVps32(1-165)* fueron procesados con la enzima *BamHI*, o bien, sujetos a doble restricción enzimática con *BamHI* y *Sall*. Los productos fueron analizados en geles de agarosa al 1.5%. Carril 1: marcadores de pares de bases. Carril 2: plásmidos restringidos con la enzima *BamHI*. Carril 3: productos de la doble restricción enzimática de los plásmidos con *BamHI* y *Sall*. Kb: kilobases. Flechas: tamaño de los productos.

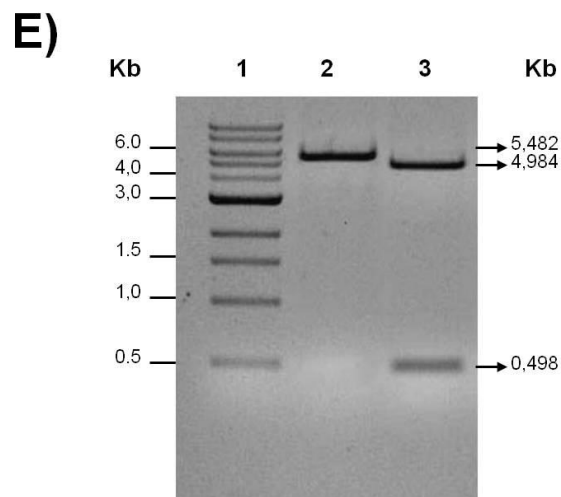
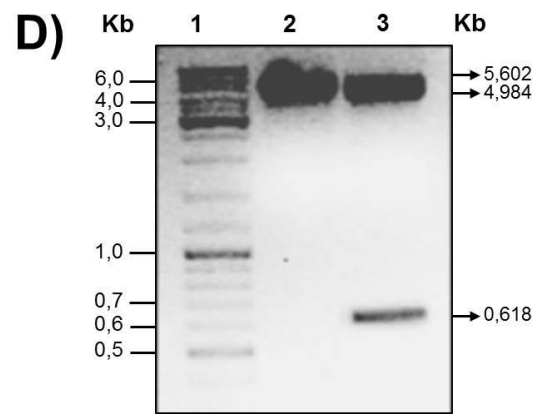
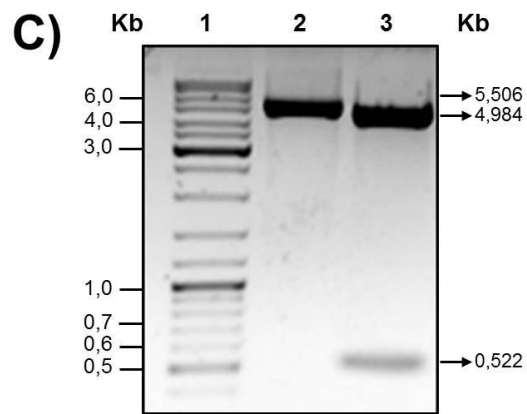
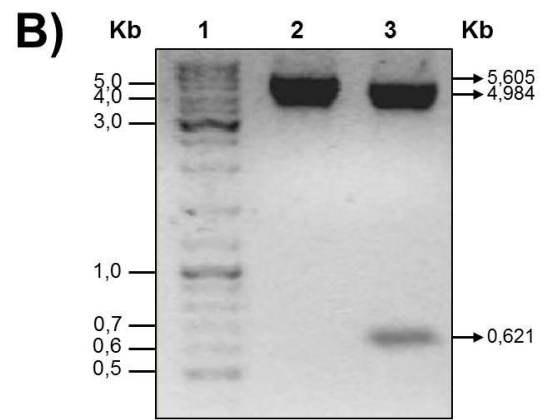
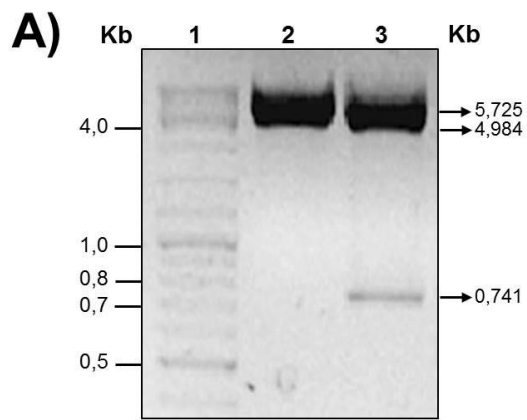


Figura 12. Electroferograma de la secuencia nucleotídica del gen *Ehvps2*. La construcción *pGEX6P-Ehvps2* se secuenció por electroforesis capilar en un secuenciador automático de ADN. La secuencia de nucleótidos se tradujo para confirmar la identidad del gen *Ehvps2*. La secuencia de nucleótidos está denotada en mayúsculas sobre el electroferograma y se analizó mediante el programa Chromas 2.33. A la secuencia se le realizó un “*blast*” y los resultados muestran que la secuencia se alinea al 100% a la reportada en la base de datos de AmoebaDB con número de acceso EHI_194400, denotada en esta base de datos como un miembro de la familia SNF7.

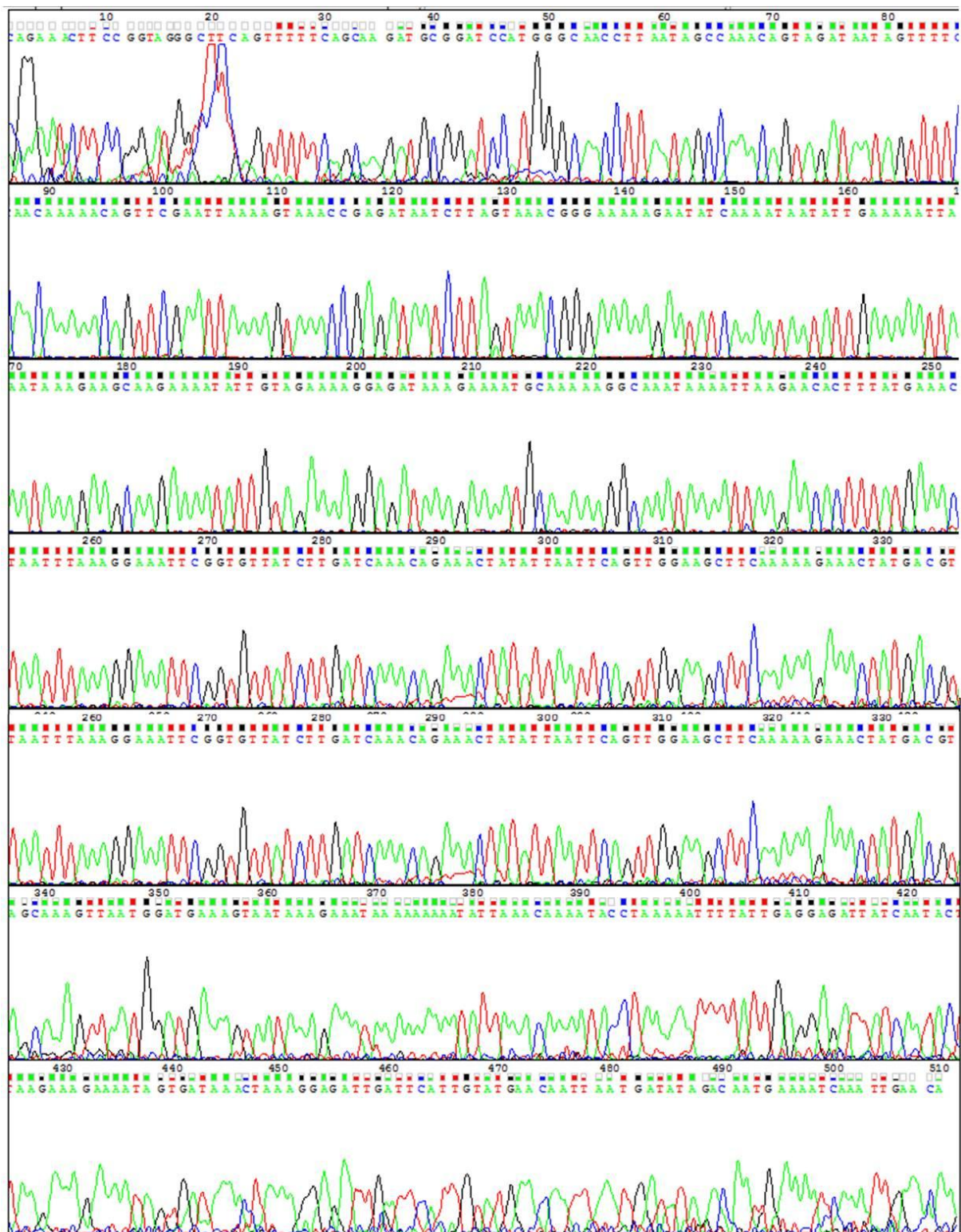


Figura 13. Electroferograma de la secuencia nucleotídica del gen *Ehvps20*. La construcción *pGEX6P-Ehvps20* se secuenció por electroforesis capilar en un secuenciador automático de ADN. La secuencia de nucleótidos se tradujo para confirmar la identidad del gen *Ehvps20*. La secuencia de nucleótidos está denotada en mayúsculas sobre el electroferograma y se analizó mediante el programa Chromas 2.33. A la secuencia se le realizó un “*blast*” y los resultados muestran que la secuencia se alinea al 100% a la reportada en la base de datos de AmoebaDB con número de acceso EHI_114790, denotada en esta base de datos como un miembro de la familia SNF7.

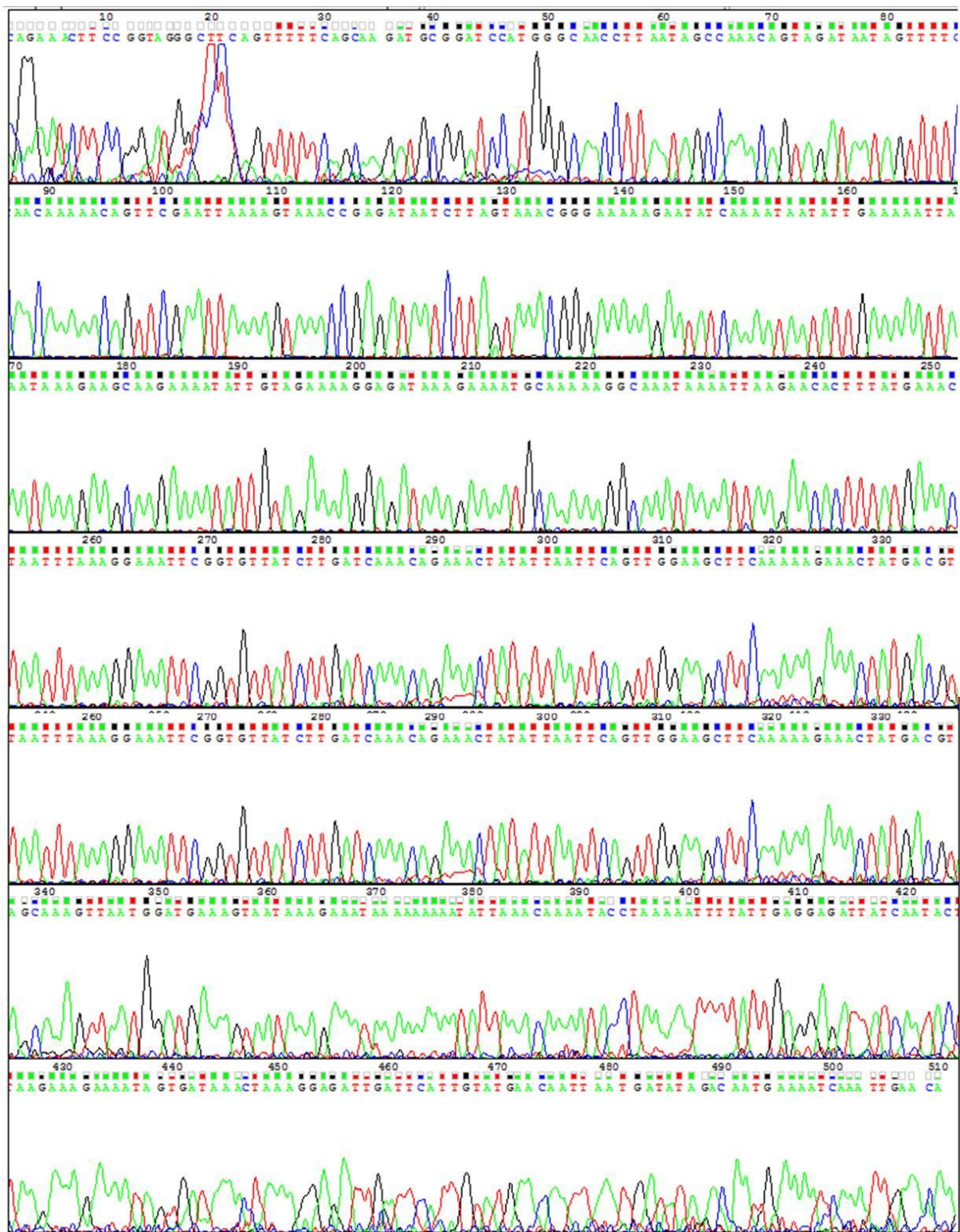


Figura 14. Electroferograma de la secuencia nucleotídica del gen *Ehvps20(1-173)*. La construcción *pGEX6P-Ehvps20(1-173)* se secuenció por electroforesis capilar en un secuenciador automático de ADN. La secuencia de nucleótidos se tradujo para confirmar la identidad del gen *Ehvps20(1-173)*. La secuencia de nucleótidos está denotada en mayúsculas sobre el electroferograma y se analizó mediante el programa Chromas 2.33; a la secuencia se le realizó un “*blast*” y los resultados muestran que la secuencia se alinea al 100% con los primeros 522 aminoácidos de la proteína reportada en la base de datos de AmoebaDB con número de acceso EHI_114790, denotada en esta base de datos como un miembro de la familia SNF7.

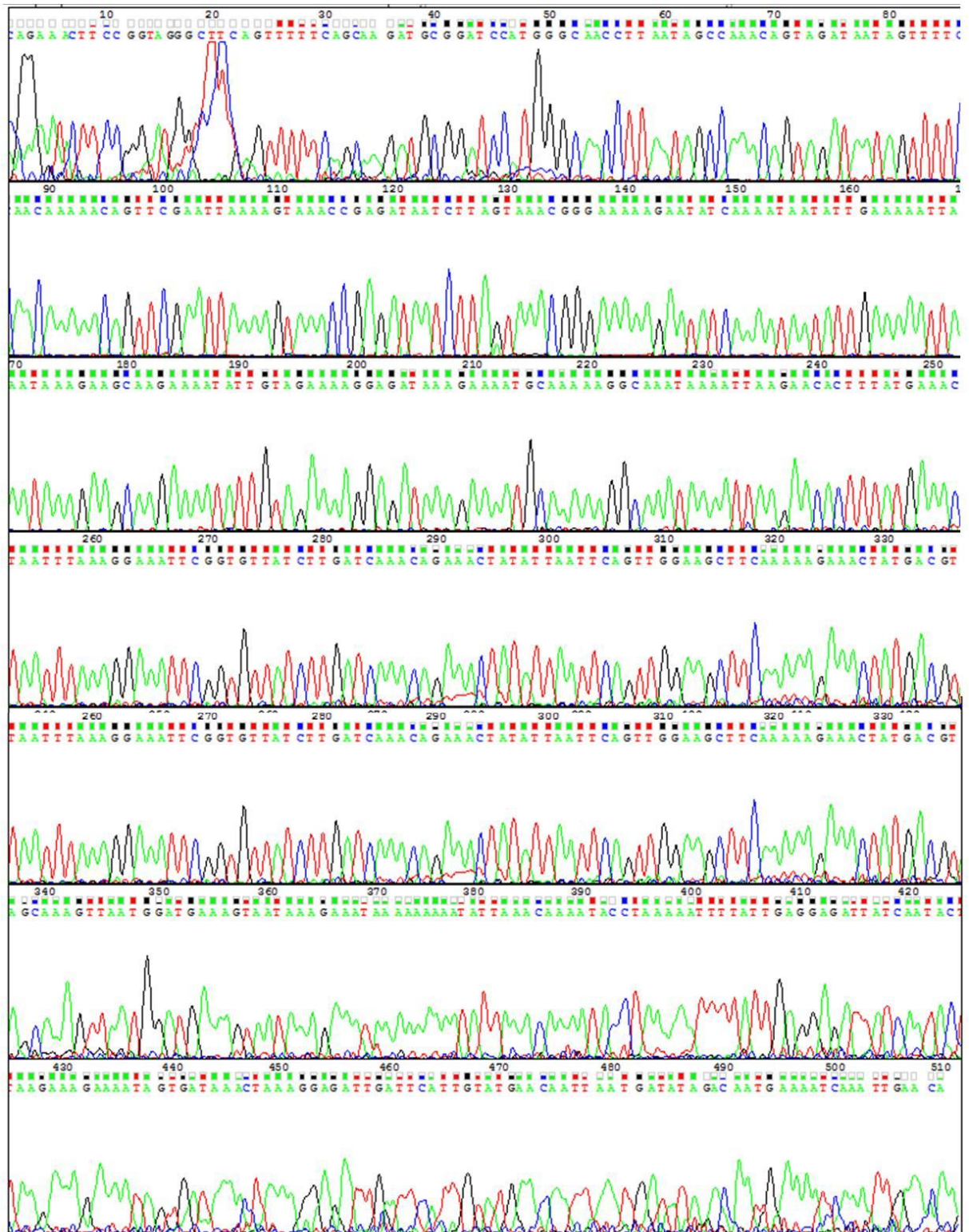
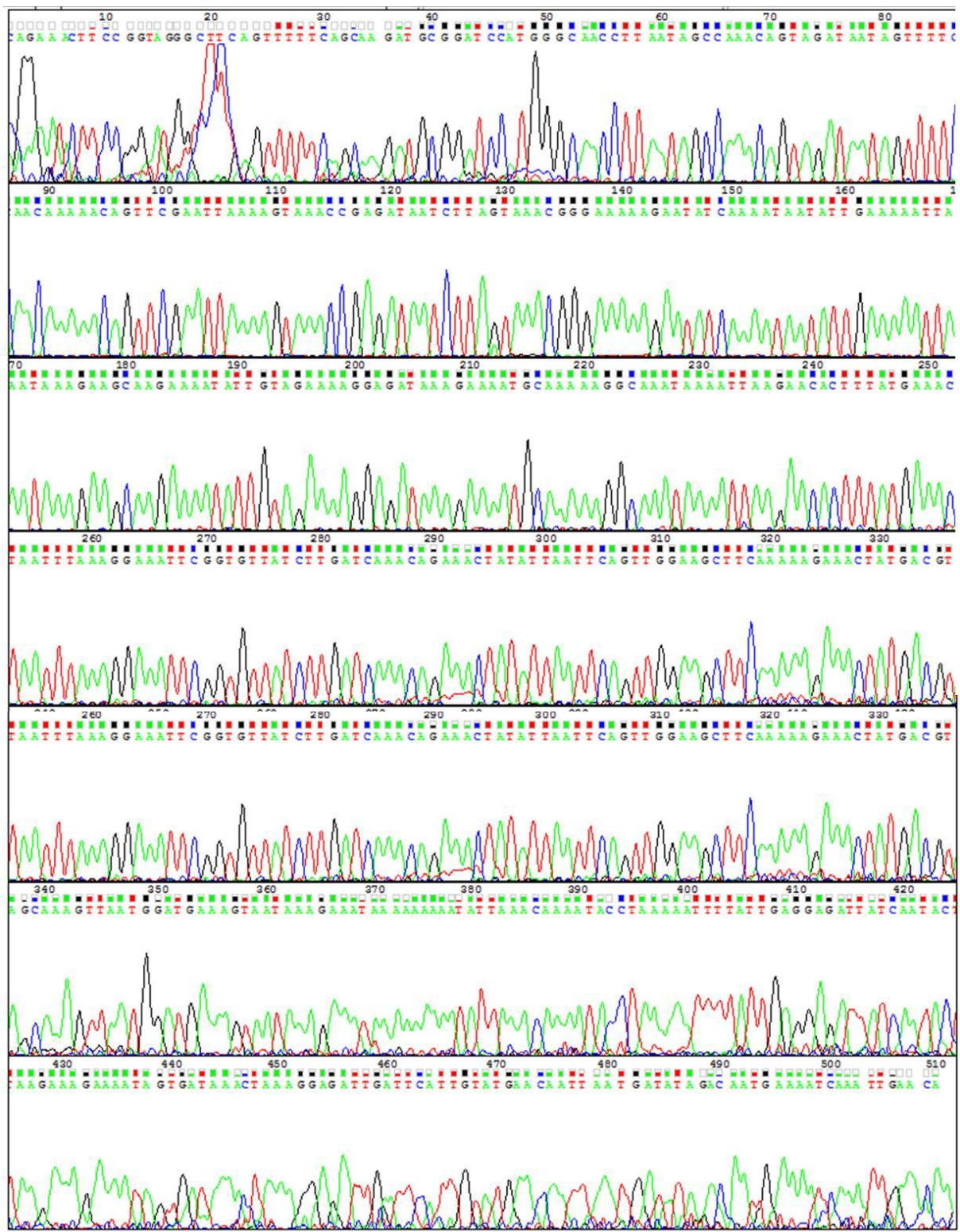


Figura 15. Electroferograma de la secuencia nucleotídica del gen *Ehvps24*. La construcción *pGEX6P-Ehvps24* se secuenció por electroforesis capilar en un secuenciador automático de ADN. La secuencia de nucleótidos se tradujo para confirmar la identidad del gen *Ehvps24*. La secuencia de nucleótidos está denotada en mayúsculas sobre el electroferograma y se analizó mediante el programa Chromas 2.33; a la secuencia se le realizó un “*blast*” y los resultados muestran que la secuencia se alinea al 100% a la reportada en la base de datos de AmoebaDB con número de acceso EHI_048690, denotada en esta base de datos como un miembro de la familia SNF7.



Una vez que se confirmó la inducción de la proteína recombinante, se analizó la solubilidad de la proteína. Para ello, las bacterias transformadas e inducidas se lisaron y posteriormente, se analizaron las fracciones soluble (sobrenadante) e insoluble (pastilla). En todos los casos encontramos que las proteínas de interés estaban presentes en la fracción soluble por lo que a partir de esta fracción se procedió a la purificación. Las proteínas recombinantes fueron purificadas con perlas de glutatión-sefarosa, ya que el glutatión es el sustrato para la enzima GST y muestra unión específica a la misma. Cada una de las inducciones y purificaciones se comprobaron en geles de poliacrilamida, en condiciones desnaturalizantes, teñidos con azul de Coomassie. La identidad de las proteínas inducidas fue confirmada mediante ensayos de *Western blot* (Fig. 16).

7.4.1 Expresión y purificación de la proteína GST-EhVps2

Después de la inducción con IPTG, en bacterias transformadas con el vector *pGEX-6P-Ehvps2*, se puede observar la aparición de una banda de 54 kDa (Fig. 16, panel A, carril 3, flecha). El peso obtenido fue igual al peso esperado, calculado a partir del peso teórico de la proteína EhVps2 (28 kDa) más el peso de la etiqueta de GST (26 kDa). Esta proteína fue localizada en la fracción soluble de los extractos bacterianos (Fig. 16, panel A, carril 4, flecha) a partir de los cuales se llevó a cabo la purificación de la proteína recombinantes (Fig. 16, panel A, carril 5, flecha). Para comprobar que la banda de 54 kDa correspondía a la proteína EhVps2 fusionada a GST, se realizó un ensayo de *Western blot* y se utilizó el anticuerpo anti-GST producido en cabra. Los resultados de la inmunodetección muestran que la proteína de 54 kDa observada en los geles teñidos con Coomassie (Fig. 16, panel A), corresponde a la proteína GST-EhVps2 (Fig. 16, panel B, flecha).

7.4.2 Expresión y purificación de la proteína GST-EhVps20

La proteína GST-EhVps20 aparece en los extractos bacterianos posterior a la inducción con IPTG en bacterias transformadas con el vector correspondiente. Esta proteína se encontró en el peso de 65 kDa (Fig. 16, panel C, carril 3, flecha), el cual es mayor al esperado tomando en consideración 26 kDa de la etiqueta de GST y 24 kDa de la secuencia de EhVps20 (50 kDa). Nuevamente, la proteína se localizó en la fracción soluble (Fig. 16, panel C, carril 4, flecha) a partir de la cual se purificó la proteína GST-EhVps20 (Fig. 16, panel C, carril 5, flecha). Con la finalidad de

confirmar la identidad de la proteína inducida y purificada se realizó un ensayo Western-blot utilizando anticuerpos dirigidos contra la etiqueta de GST (Fig. 16, panel D), con lo que se confirmó que la proteína inducida correspondía a GST-EhVps20.

7.4.3 Expresión y purificación de la proteína GST-EhVps20 (1-173)

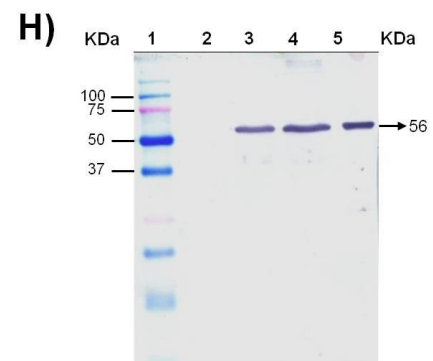
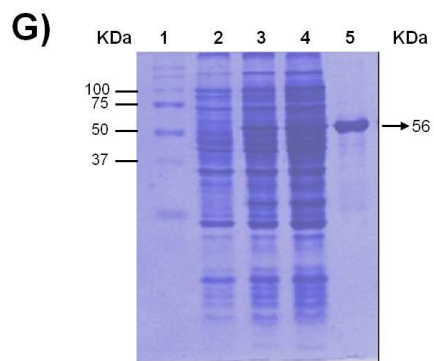
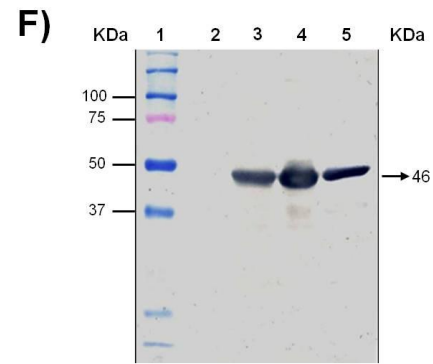
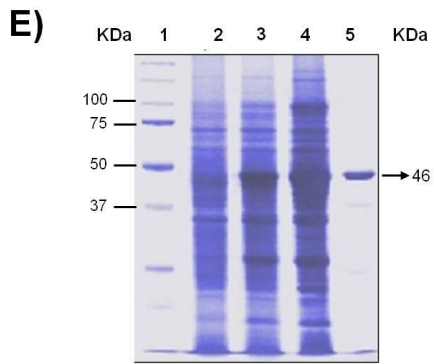
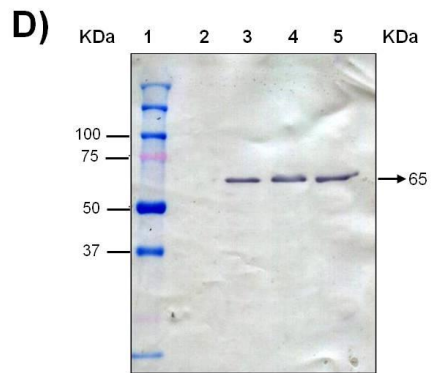
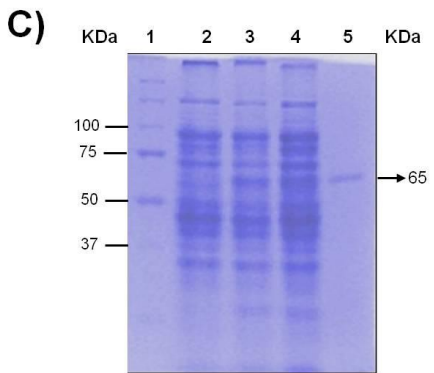
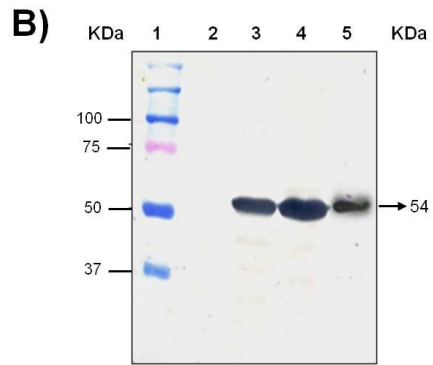
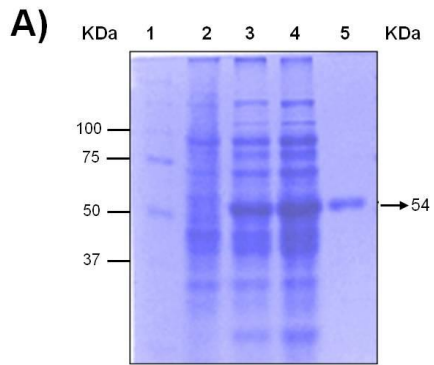
En otros organismos, la proteína Vps20 es la que desencadena la polimerización del resto de los miembros del complejo ESCRT-III. Con la finalidad de simplificar nuestro modelo, generamos una proteína EhVps20 que carece del sitio responsable de la auto-inhibición de la proteína de tal manera que podemos prescindir de señales que desencadenan la unión de EhVps20 hacia la membrana lipídica.

La proteína recombinante inducida mostró un peso de 46 kDa (Fig. 16, panel E, carril 3, flecha) que corresponde al tamaño esperado, ya que el peso predicho para esta construcción es de 20 kDa sumándole 26 kDa de la etiqueta de GST. Debido a que la proteína se encontró en la fracción soluble (Fig. 16, panel E, carril 4, flecha), la purificación se llevó a cabo de la manera convencional y se recuperó la proteína recombinante purificada (Fig. 16, panel E, carril 5, flecha). La identidad de la proteína fue probada con un ensayo *Western-blot* en el que se empleó un anticuerpo dirigido contra la etiqueta GST (Fig. 16, panel F).

7.4.4 Expresión y purificación de la proteína GST-EhVps24

De igual manera, se expresó y purificó la proteína GST-EhVps24, la cual apareció como una banda de 56 kDa en los extractos bacterianos (Fig. 16, panel G, carril 3, flecha). Esta proteína, al igual que GST-EhVps20 resultó con un peso mayor al esperado. El peso calculado era de 50 kDa, considerando 26 kDa de la etiqueta y 24 kDa el peso predicho para EhVps24. Debido a que la proteína se encontró de manera abundante en la fracción soluble (Fig. 16, panel G, carril 4, flecha), esta se purificó utilizando las perlas de glutatión-sefarosa obteniendo una banda única de 56 kDa (Fig. 16, panel G, carril 5, flecha). Nuevamente, la identidad de la proteína se corroboró mediante un ensayo de Western-blot lo cual confirmó que la proteína inducida correspondía a GST-EhVps24 (Fig. 16, panel H).

Figura 16. Inducción y purificación de las proteínas recombinantes GST-EhVps2, GST-EhVps20, GST-EhVps20(1-173) y GST-EhVps24. Bacterias competentes *E. coli* de la cepa *BL21(DE3) pLys-S* se transformaron con los diferentes plásmidos y la expresión de la proteína recombinante se indujo con 0.1 mM de IPTG durante toda la noche a 16°C. Los extractos bacterianos se sometieron a electroforesis en SDS-PAGE y se tiñeron con azul de Coomassie. En estos geles también se incluyó la fracción soluble de los extractos así como las proteínas purificadas **(A)** GST-EhVps2, **(C)** GST-EhVps20, **(E)** GST-Ehvps20(1-173) y **(G)** GST-EhVps24. **(B, D, F y H)** Réplicas de los geles anteriores se procesaron para su análisis mediante Western blot y se inmunodetectaron las proteínas unidas a la etiqueta de GST usando el anticuerpo anti-GST. Carril 1: marcadores de peso molecular. Carril 2: extracto proteico derivado de bacterias transformadas previo a la inducción con IPTG. Carril 3: extracto proteico de bacterias transformadas después de la inducción. Carril 4: proteínas de la fracción soluble de bacterias transformadas inducidas. Carril 5: proteína recombinante purificada. La flecha señala a la proteína recombinante unida a la etiqueta de GST.



7.4.5 Expresión y purificación de la proteína GST-EhVps32(1-165)

Vps32 al igual que Vps20 poseen la capacidad de unirse a membranas; con el objetivo de analizar la afinidad de esta unión en ausencia de activadores, generamos la proteína EhVps32 que carece del dominio de autoinhibición. La proteína GST-EhVps32(1-165) fue purificada y se encontró en un peso molecular de 46 kDa en los extractos bacterianos (Fig. 17, panel A, carril 3, flecha) que corresponde al tamaño esperado, ya que el peso predicho para esta secuencia es de 20 kDa sumándole 26 kDa de la etiqueta de GST. Debido a que esta proteína se encontró en la fracción soluble, la purificación se llevó a cabo de manera convencional y la proteína purificada fue recuperada (Fig. 17, panel A, carril 4, flecha). La identidad de esta proteína fue verificada mediante un ensayo de *Western-blot* en el que se emplearon anticuerpos dirigidos contra la etiqueta de GST (Fig. 17, panel B).

7.5 Detección de las proteínas EhVps2, EhVps20, EhVps32 y EhVps24 en extractos amibianos.

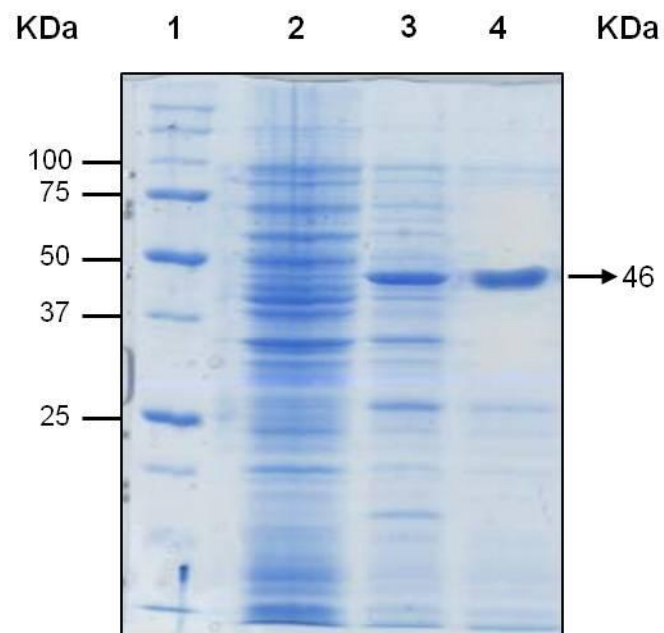
Debido a que los anticuerpos disponibles para la maquinaria ESCRT-III de otros organismos están sintetizados partiendo de regiones que no muestran homología con la secuencia aminoacídica de estas proteínas en *E. histolytica*, fue necesaria la producción de anticuerpos policlonales que reconocieran a cada una de las proteínas estudiadas.

7.5.1 Producción de anticuerpos policlonales α -EhVps2, α -EhVps20, α -EhVps24 y α -EhVps32.

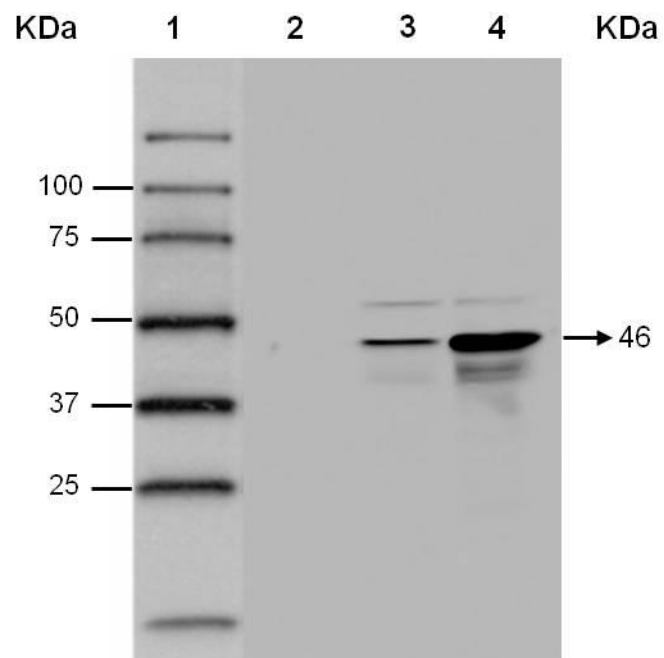
Para obtener anticuerpos α -EhVps2, se empleó la proteína recombinante GST-EhVps2 purificada y cuantificada, la cual se emulsificó junto con el adyuvante TiterMax y se utilizó para inmunizar ratas *Wistar* macho. En el caso de las proteínas recombinantes GST-EhVps20 y GST-EhVps24, fueron purificadas, emulsificadas e inmunizadas cada una en un conejo *New Zealand*. Finalmente, para los anticuerpos α -EhVps32, se empleó la proteína recombinante GST-EhVps32 generada en la Maestría (Avalos-Padilla, 2012), que se emulsificó en el adyuvante TiterMax y se inmunizó en ratones *balbc/j* y en un conejo *Wistar* macho. La especificidad de los anticuerpos policlonales generados, se evaluó en extractos de bacterias transformadas con los plásmidos correspondientes, donde la expresión de la proteína recombinante fue inducida.

Figura 17. Inducción y purificación de la proteína recombinante GST-EhVps32(1-165). (A) Bacterias competentes *E. coli* de la cepa *BL21(DE3) pLys-S* se transformaron con el plásmido *pGEX6P-Ehvps32(1-165)* y la expresión de la proteína recombinante se indujo con 0.1 mM de IPTG durante toda la noche a 16°C. Los extractos bacterianos se sometieron a electroforesis en SDS-PAGE al 12% y se tiñeron con azul de Coomassie. En estos geles también se incluyó la fracción soluble de los extractos así como las proteínas purificadas. (B) Una réplica del gel anterior se procesó para su análisis mediante *Western blot* y se inmunodetectó la proteína unida a la etiqueta de GST usando el anticuerpo anti-GST. Carril 1: marcadores de peso molecular. Carril 2: extracto proteico derivado de bacterias transformadas previo a la inducción con IPTG. Carril 3: extracto proteico de bacterias transformadas después de la inducción. Carril 4: proteína recombinante purificada. La flecha señala a la proteína recombinante unida a la etiqueta de GST.

A)



B)



Como se puede observar, los anticuerpos generados reconocen una sola banda de 54 kDa en el caso de α -EhVps2 (Fig. 18, panel A, carril 2), 65 kDa para α -EhVps20 (Fig. 18, panel B, carril 2), 56 kDa para α -EhVps24 (Fig. 18, panel C, carril 2) y 66 kDa para α -EhVps32 generado en conejo (Fig. 18, panel D, carril 2) y en ratón (Fig. 18, panel E, carril 3). En todos los casos los sueros preinmunes no reconocieron ninguna banda en estas muestras (Fig. 18, paneles A-E, carril 1).

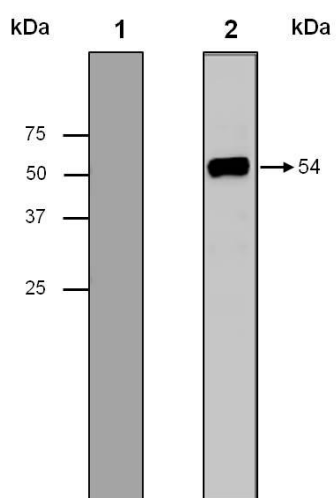
7.5.2 Expresión y localización subcelular de la proteína EhVps2 en trofozoítos

Una vez que se comprobó la especificidad de los anticuerpos α -EhVps2 generados, este anticuerpo se utilizó para explorar la localización de la proteína EhVps2 en trofozoítos de *E. histolytica*. Para lograr este objetivo se utilizaron extractos totales de *E. histolytica* que fueron transferidos a membranas de nitrocelulosa en donde se llevó a cabo el ensayo de *Western blot*. En este caso se detectó una proteína de 28 kDa, que corresponde al peso molecular esperado de la proteína y otra de aproximadamente 56 kDa (Fig. 19, panel A, carril 2, flecha). Como control se utilizó suero preinmune en la misma dilución estandarizada para el anticuerpo, el cual no detectó ninguna proteína en los extractos de trofozoítos (Fig. 19, panel A, carril 1).

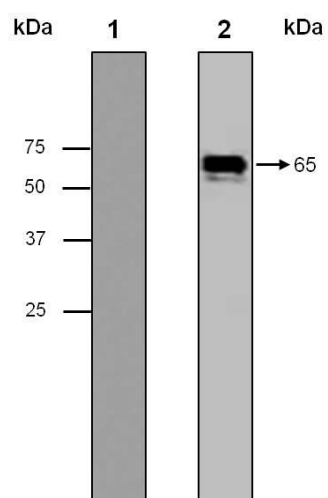
De igual manera, estos anticuerpos fueron empleados para detectar la localización subcelular de la proteína EhVps2 en trofozoítos mantenidos en cultivo, mediante la técnica de inmunofluorescencia indirecta. Los anticuerpos reconocieron a la proteína EhVps2 (rojo) dispersa en el citoplasma celular (Fig. 19, panel B). Al realizar un acercamiento de estas estructuras encontramos que la proteína se localiza en estructuras punteadas similares a vesículas (Fig. 19, panel B, magnificación). Como control negativo se empleó suero preinmune, el cual no dio reconocimiento en el citoplasma y únicamente se aprecian los núcleos teñidos con DAPI (Fig. 19, panel C).

Figura 18. Inmunodetección de las proteínas recombinantes utilizando los anticuerpos policlonales generados. Extractos proteicos de bacterias transformadas con los plásmidos correspondientes e inducidas fueron transferidos a membranas de nitrocelulosa para ser analizados mediante *Western blot* utilizando los anticuerpos **(A)** α -EhVps2, **(B)** α -EhVps20, **(C)** α -Ehvps24 o **(D)** α -EhVps32. Carril 1: inmunodetección empleando el suero preinmune correspondiente. Carril 2: inmunodetección utilizando los distintos anticuerpos. Flecha: peso molecular de la proteína detectada.

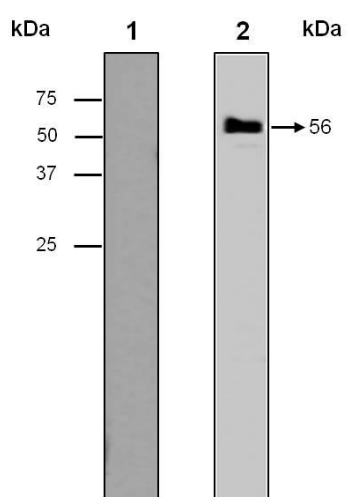
A)



B)



C)



D)

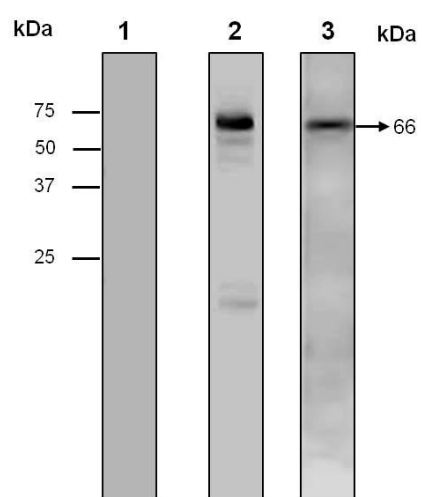
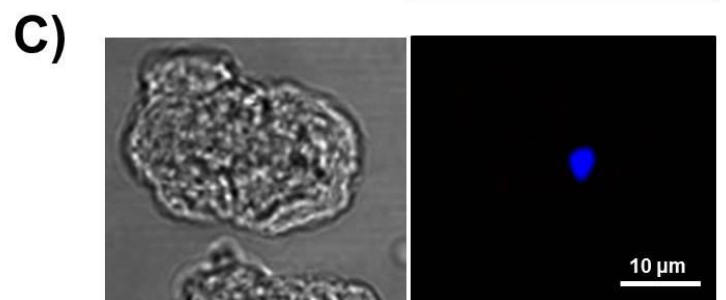
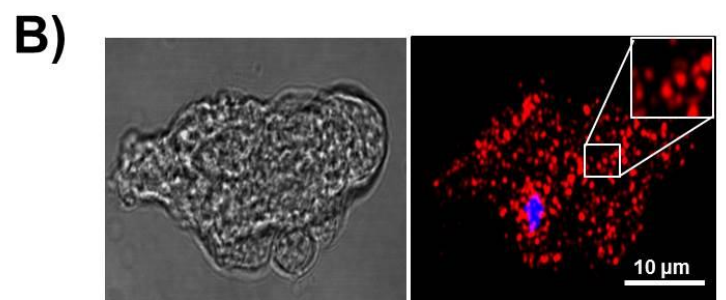
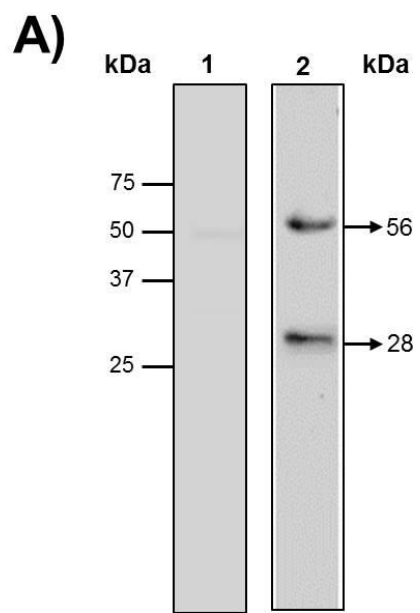


Figura 19. Inmunodetección de EhVps2 en *E. histolytica*. **(A)** Trofozoítos de *E. histolytica* fueron lisados para extraer las proteínas totales y utilizarlas en ensayos de *Western blot*. Carril 1: proteínas detectadas empleando suero preinmune. Carril 2: proteínas detectadas con el anticuerpo anti-EhVps2. Flecha: tamaño molecular de las proteínas inmunodetectadas. **(B) Inmunolocalización subcelular de la proteína EhVps2 en trofozoítos.** Trofozoítos de *E. histolytica* se fijaron, permeabilizaron y se incubaron con los anticuerpos de rata α -EhVps2 o bien, con **(C)** suero preinmune. Posteriormente se utilizaron anticuerpos secundarios anti-rata acoplados a TRITC (rojo) y los núcleos se tiñeron con DAPI (azul). Las muestras se analizaron por microscopía confocal.



7.5.3 Expresión y localización subcelular de la proteína EhVps20 en trofozoítos

Para reconocer a la proteína EhVps20 en trofozoítos de *E. histolytica*, extractos totales de trofozoítos fueron transferidos a una membrana de nitrocelulosa en donde mediante ensayos de *Western blot* se determinó el peso molecular de la proteína EhVps20 en la amiba. La banda reconocida por los anticuerpos generados se encuentra en el peso de 39 kDa, la cual posee un peso molecular mayor al calculado en base a su secuencia de aminoácidos (~24 kDa) (Fig. 20, panel A, carril 2, flecha). El suero preinmune de conejo fue utilizado como control y no se observó reconocimiento de ninguna banda a la misma dilución que se utilizaron los anticuerpos específicos (Fig. 20, panel A, carril 1). Por otro lado, los anticuerpos generados fueron utilizados para determinar la localización subcelular de la proteína EhVps20 en los trofozoítos de *E. histolytica*. Para ello, se empleó la técnica de inmunofluorescencia indirecta. En este caso, los anticuerpos localizaron a la proteína EhVps20 (verde) en la membrana plasmática y dispersa en el citoplasma celular (Fig. 20, panel B). Nuevamente al emplear suero preinmune, control negativo, no se observa marca en el citoplasma y únicamente observamos los núcleos teñidos con DAPI (Fig. 20, panel C). Para delimitar si la proteína se encontraba en la cara interna de la membrana o bien expuesta hacia el exterior de la célula, realizamos el mismo ensayo empleando trofozoítos no permeabilizados en los que únicamente observamos poca marca en el interior (Fig. 20, panel D).

7.5.4 Expresión y localización subcelular de la proteína EhVps24 en trofozoítos

Una vez que se confirmó la especificidad de los anticuerpos α -EhVps24 generados, estos fueron probados mediante *Western blot* en extractos totales de trofozoítos de *E. histolytica*. En este ensayo, los anticuerpos detectaron a la proteína EhVps24 con un peso molecular de 30 kDa (Fig. 21, panel A, carril 2), el cual es mayor al peso molecular predicho para esta proteína (~24 kDa). Para verificar que no se tratara de un reconocimiento inespecífico, el mismo ensayo fue realizado empleando el suero preinmune obtenido del conejo con el cual no observamos ningún reconocimiento (Fig. 21, panel A, carril 1). Los mismos anticuerpos fueron utilizados para analizar la localización de la proteína EhVps24; en este caso, encontramos que la proteína (verde) se encuentra localizada dispersa en el citoplasma de los trofozoítos mantenidos en cultivo (Fig. 21, panel B). Al utilizar el suero preinmune no observamos reconocimiento y únicamente son visibles los núcleos teñidos con DAPI (Fig. 21, panel C).

Figura 20. Inmunodetección de EhVps20 en *E. histolytica*. **(A)** Trofozoítos de *E. histolytica* fueron lisados para extraer las proteínas totales y utilizarlas en ensayos de *Western blot*. Carril 1: proteínas detectadas empleando suero preinmune. Carril 2: proteína detectada con el anticuerpo α -EhVps20. Flecha: tamaño molecular de las proteínas inmunodetectadas. **(B) Inmunolocalización subcelular de la proteína EhVps2 en trofozoítos.** Trofozoítos de *E. histolytica* se fijaron, permeabilizaron y se incubaron con los anticuerpos de conejo α -EhVps20 o con **(C)** suero preinmune. **(D)** Trofozoítos no permeabilizados incubados con anticuerpos específicos α -EhVps20. Posterior a la incubación con los anticuerpos primarios, se utilizaron anticuerpos secundarios anti-conejo acoplados a FITC (verde) y los núcleos se tiñeron con DAPI (azul). Las muestras se analizaron por microscopía confocal.

A)

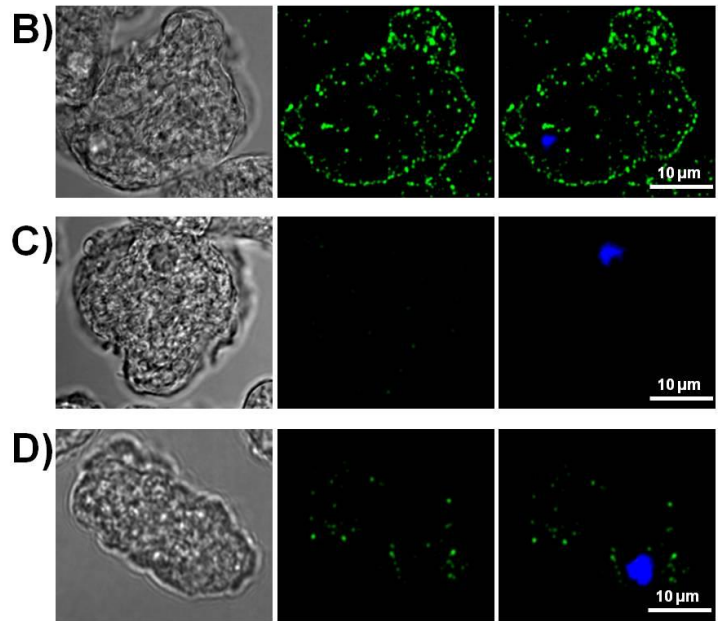
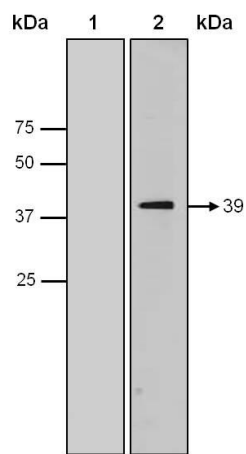
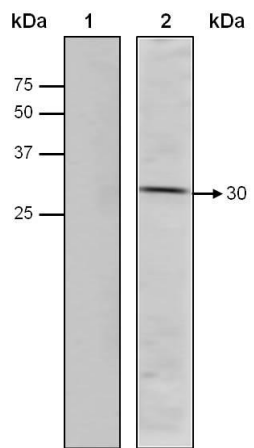
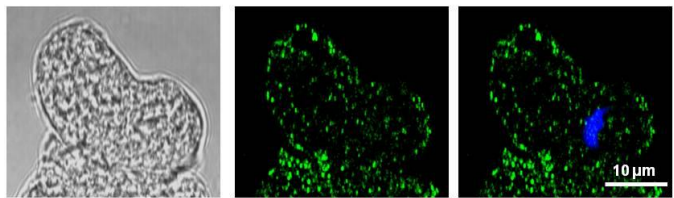


Figura 21. Inmunodetección de EhVps24 en *E. histolytica*. Proteínas totales obtenidas a partir de trofozoítos de *E. histolytica* fueron utilizadas en ensayos de *Western blot*. Carril 1: proteínas detectadas empleando suero preinmune. Carril 2: proteínas detectadas con el anticuerpo α -EhVps24. Flecha: tamaño molecular de la proteína inmunodetectada. **(B) Inmunolocalización subcelular de la proteína EhVps24 en trofozoítos.** Trofozoítos de *E. histolytica* se fijaron, permeabilizaron y se incubaron con los anticuerpos α -EhVps24 o bien, con **(C)** suero preinmune. Posteriormente se usó un anticuerpo secundario anti-conejo acoplado a FITC (verde) y los núcleos se tiñeron con DAPI (azul). Las muestras se analizaron por microscopía confocal.

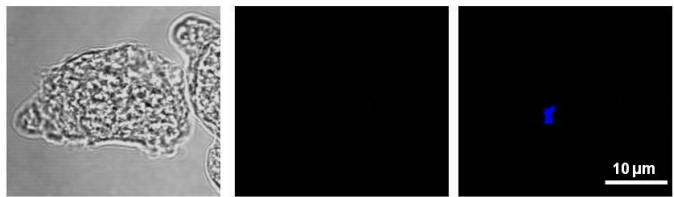
A)



B)



C)



7.6 Participación de las proteínas del complejo ESCRT-III durante la eritrofagocitosis.

Estudios anteriores han demostrado que los miembros de la maquinaria ESCRT participan en el proceso de eritrofagocitosis de *E. histolytica* (Avalos-Padilla, 2012; Bañuelos et al., 2011; López-Reyes et al., 2010). Para investigar si al igual que EhVps32 (Avalos-Padilla, 2012), el resto de los miembros del complejo ESCRT-III participan en el evento fagocítico, se llevó a cabo una cinética en la cual se emplearon eritrocitos humanos que fueron co-incubados con trofozoítos a tiempos diferentes. Una vez que transcurrió el tiempo, las distintas poblaciones de amibas fueron procesadas para inmunofluorescencia indirecta utilizando los anticuerpos específicos para cada una de las proteínas, como se describió en el apartado anterior. En todos los casos, trofozoítos que no fueron sometidos al proceso de fagocitosis, mostraron una localización similar para cada una de las proteínas como se definió anteriormente (Figs. 22-25, 0 min).

A los dos min de iniciada la fagocitosis, observamos que EhVps32 se relocaliza formando parches cercanos a la membrana plasmática (Fig. 22, 2 min). A los 5 min EhVps32 y EhVps24 se relocalizan alrededor de algunos eritrocitos ingeridos (Fig. 22 y 23, 5 min, cabezas de flecha vacías) mientras que otros fagosomas permanecen sin marca (Figs. 22 y 23, 5 min, cabezas de flecha rellenas). A este tiempo, EhVps20 migra desde la parte interna de la membrana plasmática hacia vesículas en el citoplasma de los trofozoítos, algunas de las cuales se encuentran rodeando a los eritrocitos ingeridos (Fig. 24, 5 min, cabezas de flecha vacías). EhVps2 no muestra cambios aparentes en su distribución a este tiempo (Fig. 25, 5 min). El siguiente tiempo evaluado fue 15 min. En este tiempo EhVps32 y EhVps24 muestran el mismo patrón de distribución que a los 5 min, el cual se mantiene hasta los 30 min (Figs. 22 y 23, 15-30 min, cabezas de flecha vacías). Por otro lado, EhVps20 a los 15 min recupera su localización en la membrana plasmática y además, se ve localizada en vesículas que rodean a eritrocitos ingeridos (Fig. 24, 15 min cabezas de flecha vacías). Finalmente, EhVps2 a los 15 min de fagocitar eritrocitos, se encuentra localizada alrededor de algunos fagosomas (Fig. 25, 15 min, cabezas de flecha rellenas) y en la región perinuclear de los trofozoítos (Fig. 25, 15 min, flecha). Después de 30 min de iniciada la fagocitosis, EhVps2 y EhVps20 muestran un patrón similar, dispersas en el citoplasma en vesículas pequeñas que se encuentran rodeando algunos de los eritrocitos ingeridos (Figs. 24 y 25, 30 min, cabezas de

flecha vacías). A los 45 min, EhVps32 y EhVps24 recuperan su localización citoplasmática (Figs. 22 y 23, 45 min, cabezas de flecha rellenas). Inesperadamente, EhVps32 también fue localizada en la región nuclear (Fig. 22, 45 min, flecha). EhVps20, se encontró localizada en la membrana plasmática y enriquecida en fagosomas que rodeaban algunos eritrocitos ingeridos (Fig. 24, 45 min, cabezas de flecha vacías) y en otras vesículas de gran tamaño que no correspondían a eritrocitos ingeridos (Fig. 24, 45 min, flechas). A los 45 min, EhVps2 se encontró localizada en vesículas dispersas en el citoplasma de los trofozoítos que, ocasionalmente, se encontraban rodeando algunos de los eritrocitos ingeridos (Fig. 25, 45 min, cabezas de flecha vacías).

El último tiempo realizado de esta cinética fue 60 min; a este tiempo EhVps32 recuperó la localización que se encontró en condiciones basales (Fig. 22, 60 min); EhVps24 se encontró dispersa en el citoplasma y de manera imprevista, en el núcleo de todos los trofozoítos observados (Fig. 23, 60 min, flecha). EhVps20 fue localizada formando parches alrededor de eritrocitos ingeridos (Fig. 24, 60 min, cabezas de flecha vacías) y rodeando algunos fagosomas que no corresponden a eritrocitos ingeridos (Fig. 24, 60 min, flechas). Finalmente, EhVps2 se encontró dispersa en vesículas en el citoplasma (Fig. 25, 60 min) así como en la región nuclear (Fig. 25, 60 min, flecha).

7.7 Polimerización *in vitro* de EhVps24 y EhVps32.

En otros sistemas se ha probado la capacidad de Vps24 y Vps32 de polimerizar *in vitro* formando filamentos, túbulos, hojas y anillos. A esta polimerización se le ha adjudicado la capacidad de escisión de membranas por parte del complejo ESCRT-III. Debido a la importancia de esta propiedad, decidimos analizar si las proteínas de la ameba eran capaces de polimerizar. Para ello, realizamos la técnica conocida como tinción negativa utilizando las proteínas GST-EhVps24 y GST-EhVps32 purificadas, las cuales fueron visualizadas en un microscopio electrónico de transmisión. En el caso de GST-EhVps24 encontramos polímeros en forma de filamentos con un grosor entre 12 y 13 nm (Fig. 26, panel A y B, flechas); y anillos que poseían un diámetro aproximado de 40 nm (Fig. 26, panel C, cabezas de flecha). En el caso de GST-EhVps32, también observamos polímeros en forma de filamentos con un grosor aproximado de 25 nm (Fig. 26, paneles D y E, flechas) y anillos con un diámetro de 96-100 nm (Fig. 26, paneles E y F, cabezas de flecha).

Figura 22. Localización de EhVp32 durante el proceso de eritrofagocitosis.

Trofozoítos de *E. histolytica* se co-incubaron a 37°C con eritrocitos humanos de tipo O+ en una relación 1:25 a diferentes tiempos. Las preparaciones se incubaron con los anticuerpos específicos α -EhVps32, seguido por los anticuerpos secundarios acoplados a FITC (verde); los núcleos fueron teñidos con DAPI (azul), para su posterior análisis mediante microscopía confocal. Carril 1: campo claro. Carril 2: canal azul, DAPI. Carril 3: canal verde, FITC. Carril 4: Empalme. Cabezas de flecha rellenas: fagosomas marcados con EhVps32. Cabeza de flecha vacías: fagosomas sin marca. Flecha: EhVps32 en el núcleo. Barra: 10 μ m

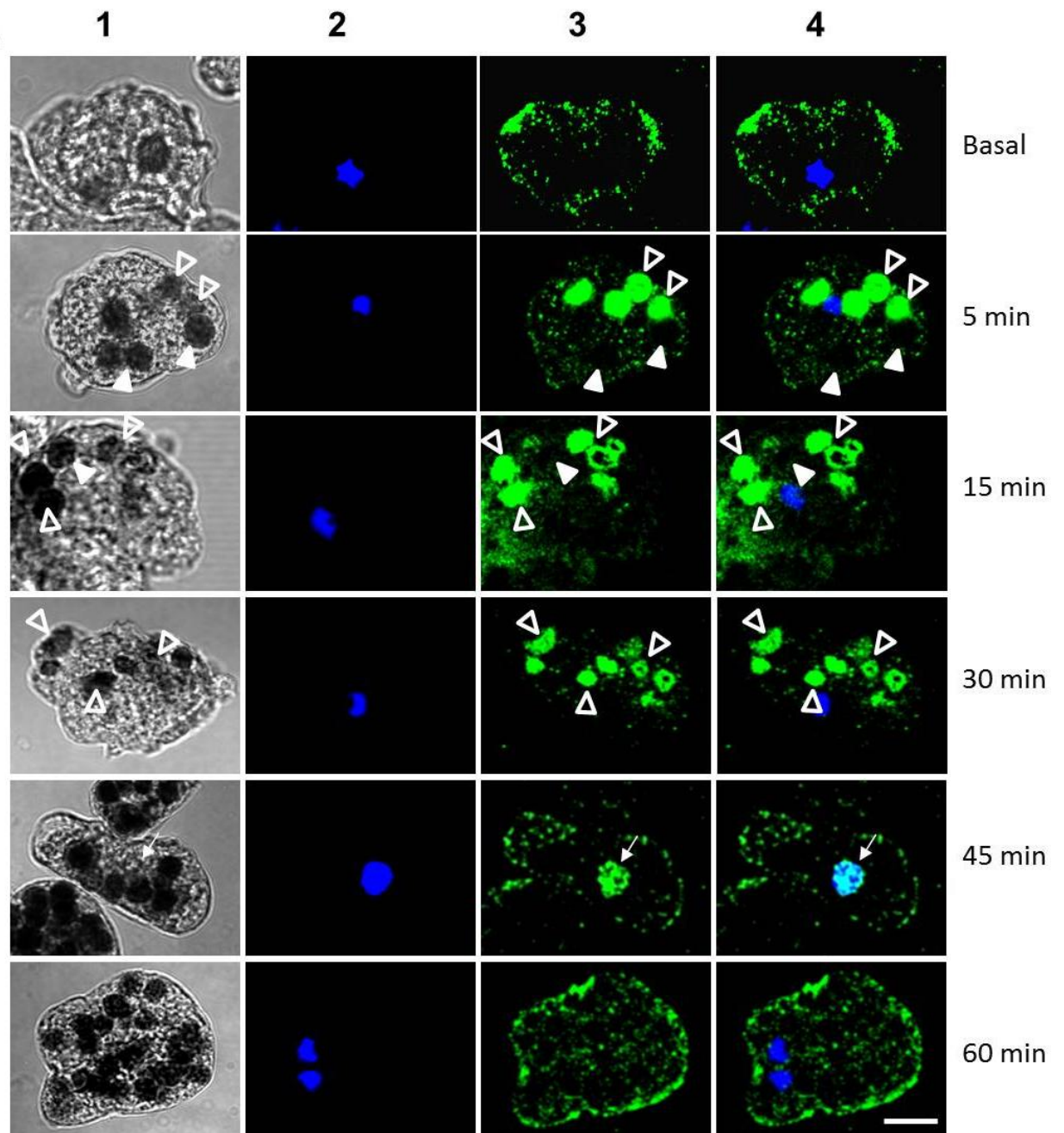


Figura 23. Localización de EhVps24 durante el proceso de eritrofagocitosis.

Trofozoítos de *E. histolytica* se co-incubaron a 37°C con eritrocitos humanos de tipo O+ en una relación 1:25 a diferentes tiempos. Las preparaciones se incubaron con los anticuerpos específicos α -EhVps24, seguido por los anticuerpos secundarios acoplados a FITC (verde); los núcleos fueron teñidos con DAPI (azul), para su posterior análisis mediante microscopía confocal. Carril 1: campo claro. Carril 2: canal azul, DAPI. Carril 3: canal verde, FITC. Carril 4: Empalme. Cabezas de flecha rellenas: fagosomas marcados con EhVps24. Cabezas de flecha vacías: fagosomas sin marca. Flecha: EhVps24 en el núcleo. Barra: 10 μ m

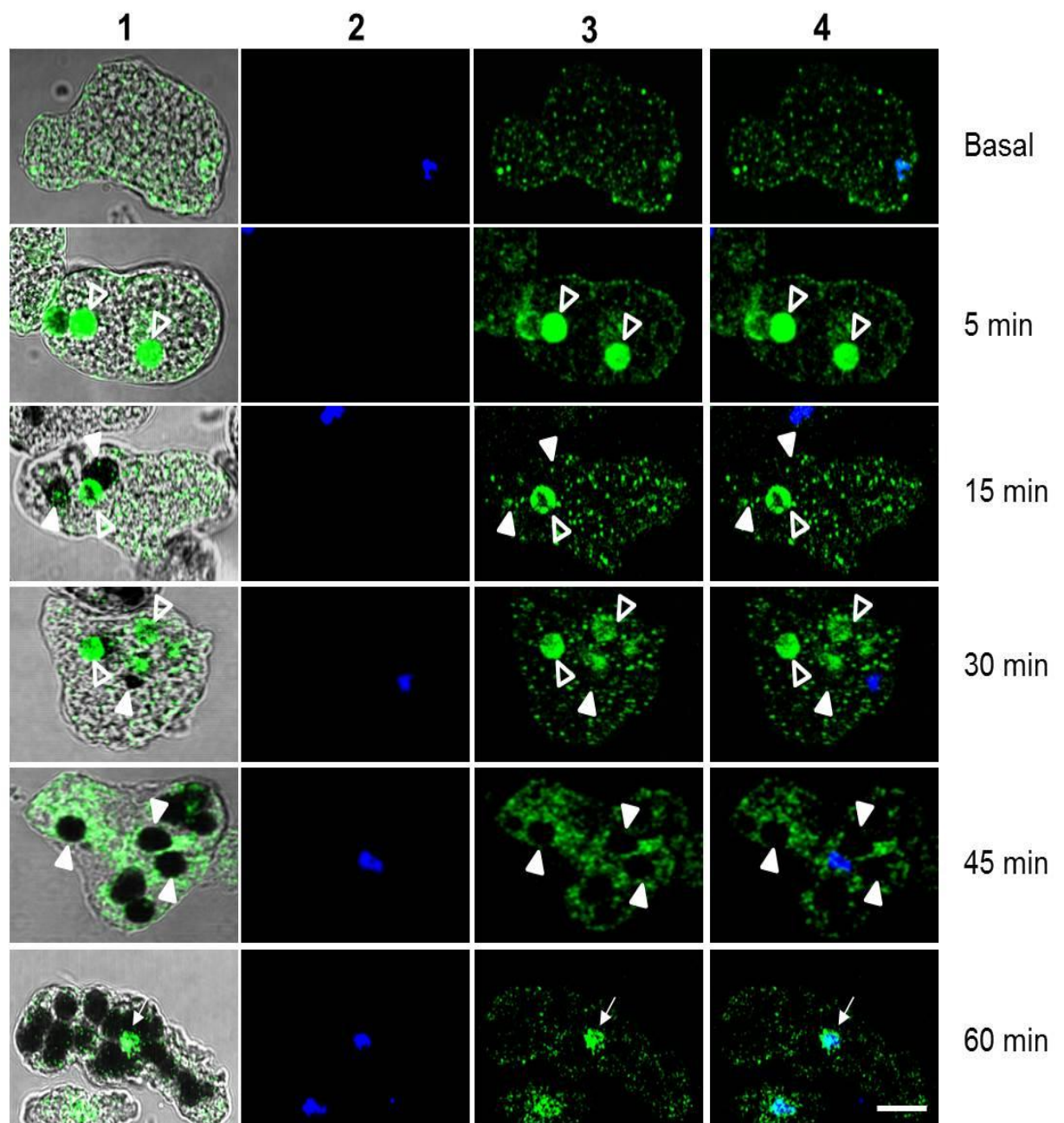


Figura 24. Localización de EhVps20 durante el proceso de eritrofagocitosis.

Trofozoítos de *E. histolytica* se co-incubaron a 37°C con eritrocitos humanos de tipo O+ en una relación 1:25 a diferentes tiempos; las preparaciones se incubaron con los anticuerpos específicos α -EhVps20, seguido por los anticuerpos secundarios acoplados a FITC (verde); los núcleos fueron teñidos con DAPI (azul), para su posterior análisis mediante microscopía confocal. Carril 1: campo claro. Carril 2: canal azul, DAPI. Carril 3: canal verde, FITC. Carril 4: Empalme. Cabezas de flecha rellenas: fagosomas marcados con EhVps20. Cabezas de flecha vacías: fagosomas sin marca. Barra: 10 μ m

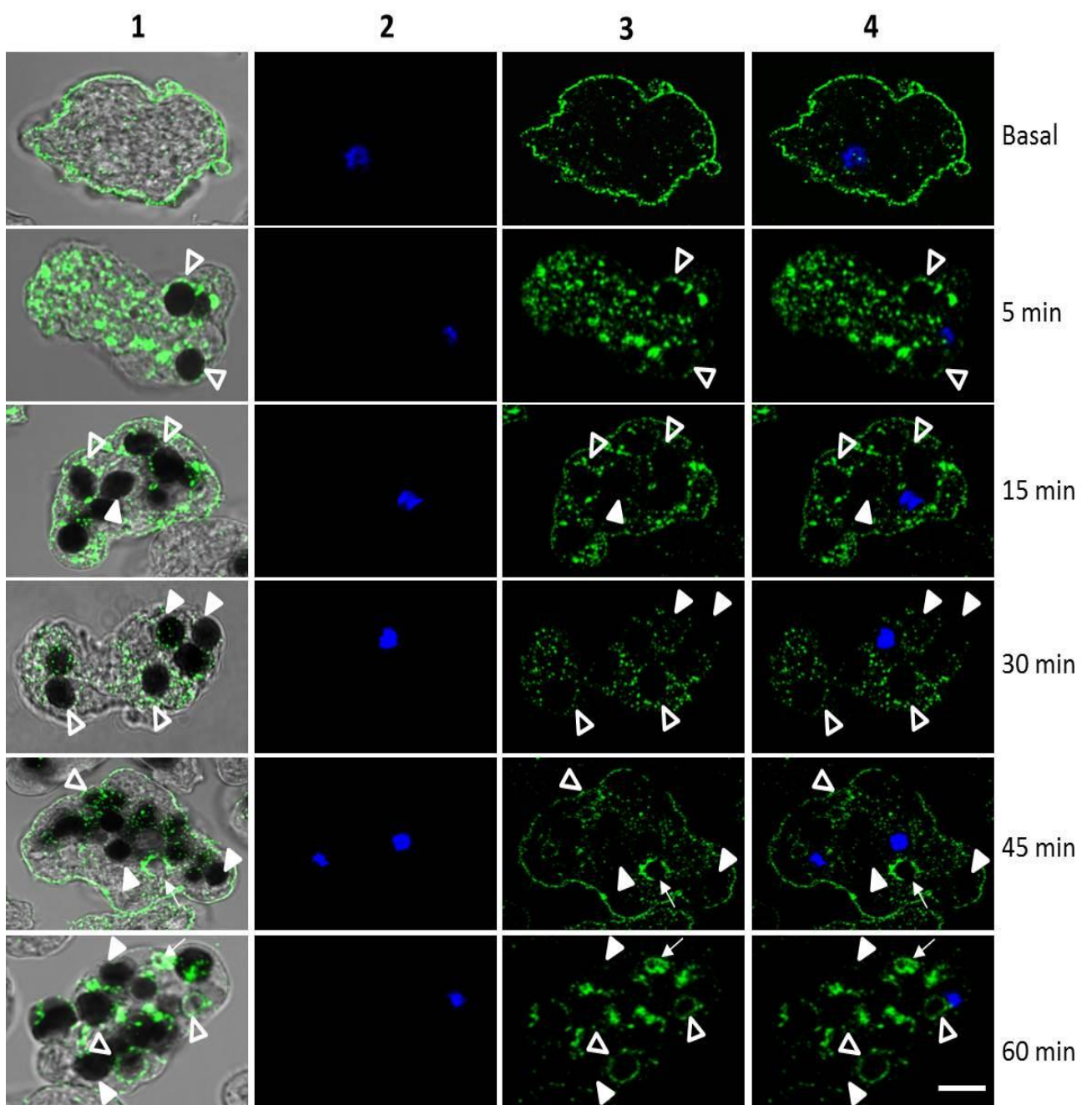


Figura 25. Localización de EhVps2 durante el proceso de eritrofagocitosis. Trofozoítos de *E. histolytica* se co-incubaron a 37°C con eritrocitos humanos de tipo O en una relación 1:25 a diferentes tiempos; las preparaciones se incubaron con los anticuerpos específicos α -EhVps2, seguido por los anticuerpos secundarios acoplados a TRITC (rojo); los núcleos fueron teñidos con DAPI (azul), para su posterior análisis mediante microscopía confocal. Carril 1: campo claro. Carril 2: canal azul, DAPI. Carril 3: canal rojo, TRITC. Carril 4: Empalme. Barra: 10 μ m

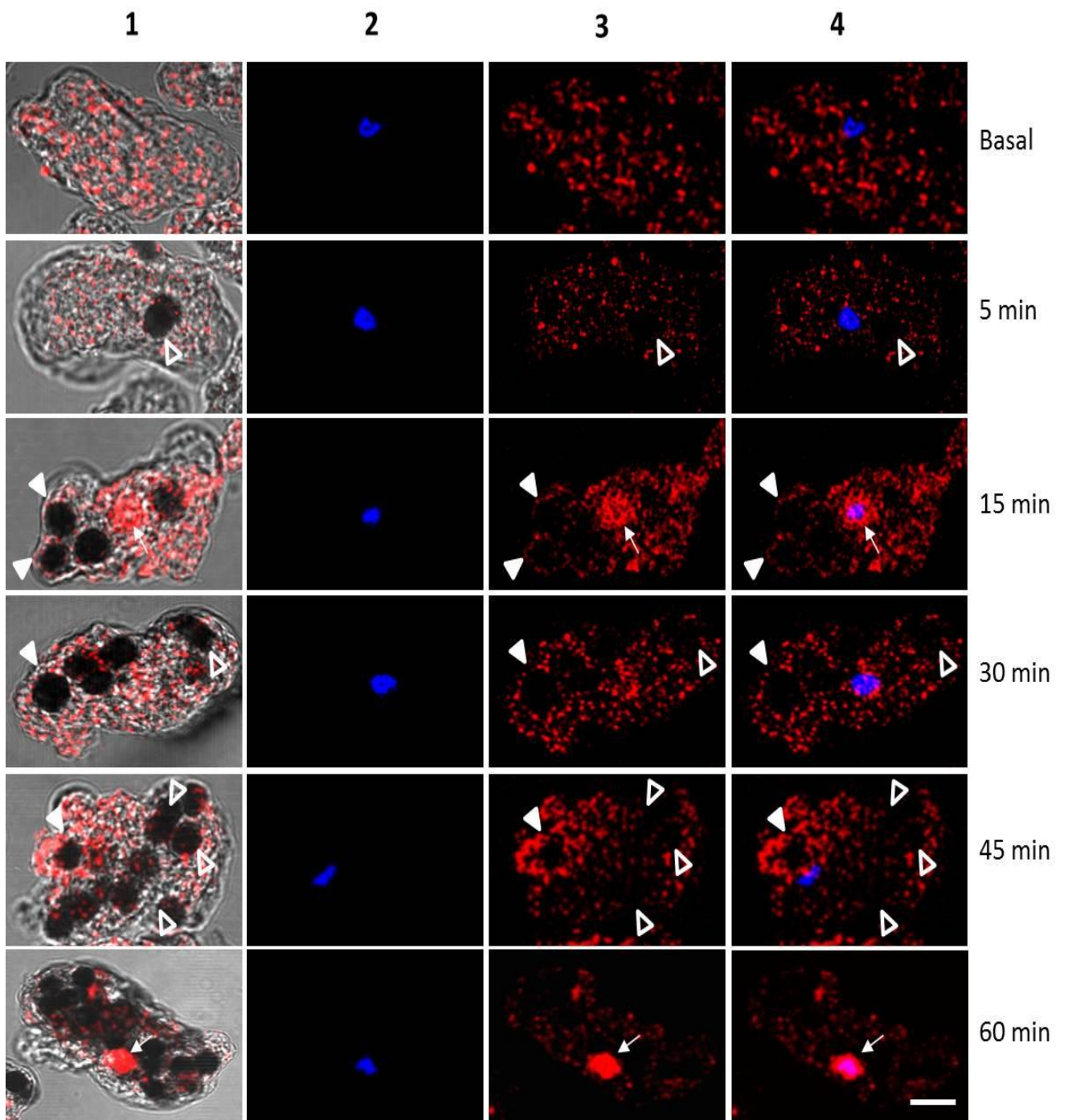
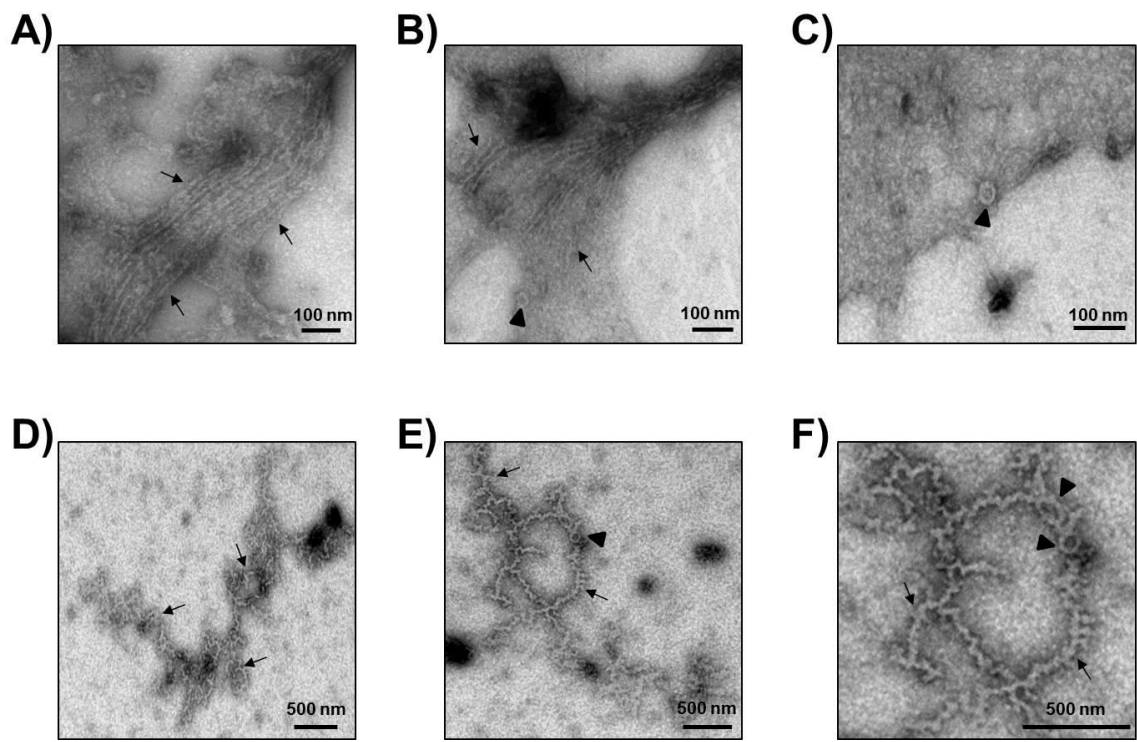


Figura 26. Tinción negativa de GST-EhVps24 y GST-EhVps32. Las proteínas recombinantes **(A-C)** GST-EhVps24 y **(D-F)** GST-EhVps32 purificadas fueron colocadas en una rejilla recubierta con formvar y después sometidas a la técnica de tinción negativa la cual permite observar las estructuras formadas por material orgánico.



7.8 Polimerización *in vivo* de EhVps32

Para poder analizar la función que desempeña EhVps32 en la eritrofagocitosis en *E. histolytica*, durante el trabajo de maestría realizamos una sobre-expresión de la proteína EhVps32. Sin embargo, esta sobre-expresión resultaba letal para la amiba. Antecedentes en otros sistemas detallan que homólogos de esta proteína son capaces de unirse a las membranas internas de las células y cuando se sobre-expresan, se desencadena la formación de proyecciones tubulares hacia el exterior de la célula que finaliza con la lisis celular (Hanson et al., 2008).

Para analizar este fenómeno, transfectamos transitoriamente (12 h) a trofozoítos de *E. histolytica* con la construcción *pNEO-EhVps32-HA* generada durante el trabajo de maestría (Avalos-Padilla, 2012). Mediante ensayos de RT-PCR, encontramos que el gen *EhVps32* se encontraba sobre-expresado al menos 3 veces más en comparación con la expresión normal (Fig. 27, panel A). Una vez confirmada la sobre-expresión, realizamos las técnicas de microscopía electrónica de transmisión y microscopía electrónica de barrido a trofozoítos transfectados. En la microscopía electrónica de transmisión encontramos que en trofozoítos que sobre-expresan a EhVps32 aparecen estructuras citoplásmicas parecidas a arreglos multilamelares (Fig. 27, panel B, recuadro y panel C) y otras estructuras aberrantes (Fig. 27, panel B) que están ausentes en trofozoítos únicamente transfectados con el plásmido vacío (Fig. 27, panel D).

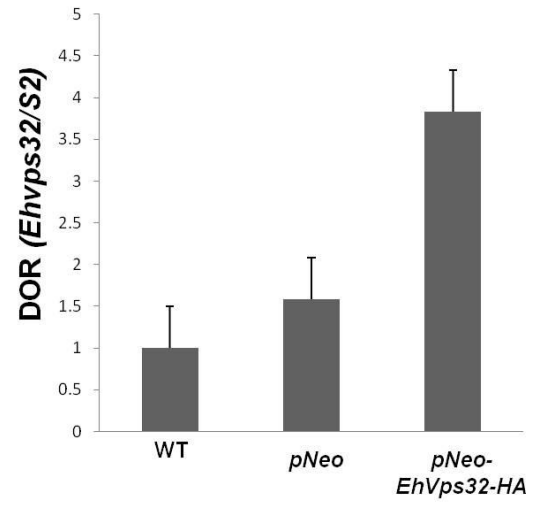
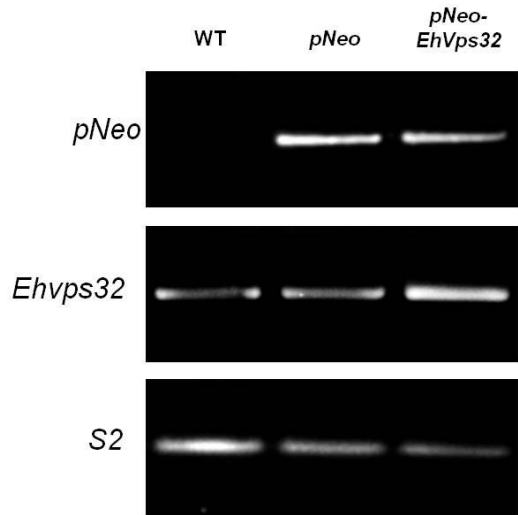
Al observar los trofozoítos transfectados, mediante la técnica de barrido, encontramos la aparición de una gran cantidad de agujeros en la membrana plasmática (Fig. 27, panel E, recuadro) así como proyecciones tubulares (Fig. 27, panel F) que no están presentes o bien, son de menor tamaño que las encontradas en trofozoítos transfectados únicamente con el vector vacío (Fig. 27, panel G).

7.9 Reconstitución de la maquinaria ESCRT-III en el modelo de vesículas gigantes Unilamelares.

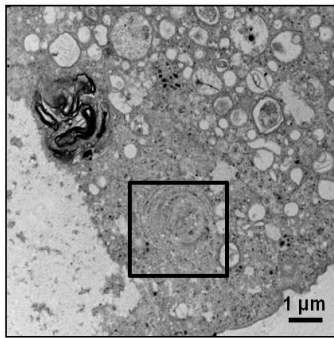
El estudio del funcionamiento de la maquinaria ESCRT-III *in vivo* resulta complicado debido a la naturaleza transitoria de este complejo. Por esta razón el modelo de vesículas gigantes Unilamelares, o GUVs por sus iniciales en inglés, ha sido adoptado para recrear el efecto biológico sobre membranas que inducen los miembros de la maquinaria ESCRT-III.

Figura 27. Sobre-expresión de EhVps32. Trofozoítos de *E. histolytica* de la clona A fueron transfectados transitoriamente con el vector *pNeo-EhVps32-HA*, o bien con *pNeo* vacío. **(A)** Amplificación de los genes *Neo* presentes en el plásmido *pNeo*, *Ehvps32* nuestro gen de interés y el gen *S2* de la subunidad 40s del RNAr. Los productos fueron analizados en geles de agarosa al 1% teñidos con bromuro de etidio y posteriormente se realizó un análisis densitométrico de los niveles de expresión del gen *Ehvps32* respecto al gen *S2*. DOR: densidad óptica relativa. **(B)** Trofozoítos que sobre-expresaban la proteína EhVps32 fueron tratados y analizados mediante microscopía electrónica de transmisión, en **(C)** se muestra la amplificación del cuadro. **(D)** Morfología de trofozoítos transfectados con el vector *pNeo* analizada mediante microscopía electrónica de transmisión. **(E)** Apariencia superficial de trofozoítos que sobre-expresan la proteína EhVps32 utilizando microscopía electrónica de barrido. **(F)** Proyecciones membranales generadas en trofozoítos transfectados con *pNeoEhvps32*. **(G)** Superficie de un trofozoíto transfectado con el vector *pNeo*.

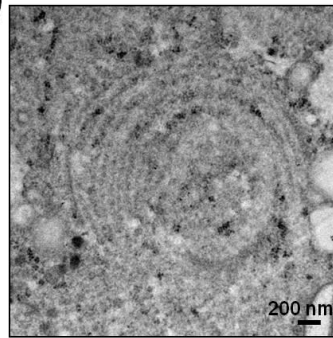
A)



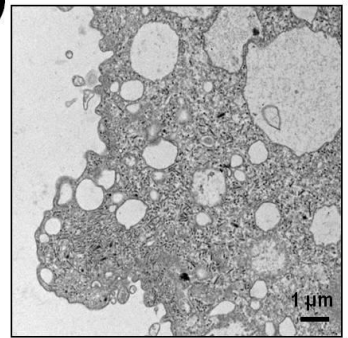
B)



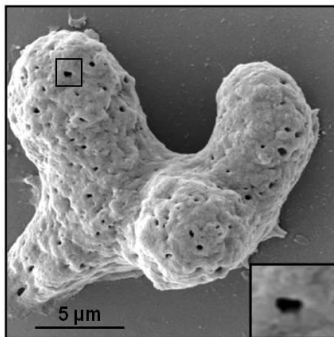
C)



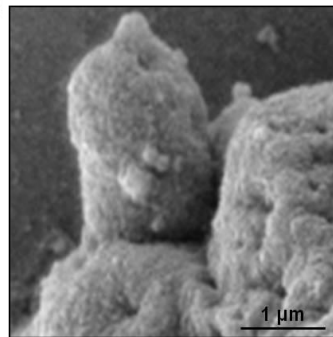
D)



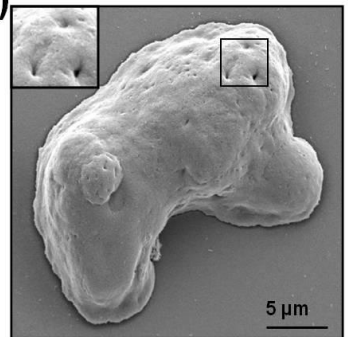
E)



F)



G)



7.10 Caracterización funcional *in vitro* de los miembros de la maquinaria ESCRT-III de *E. histolytica*

7.10.1 Unión de EhVps20 y EhVps32 a membranas cargadas negativamente.

Estudios anteriores demuestran que las únicas proteínas que están en contacto directo con membranas lipídicas son Vps20 y Vps32. Para analizar si las proteínas presentes en la ameba mantenían este comportamiento, GUVs con la composición lipídica descrita por Wollert et al en el 2009 (Wollert et al., 2009) fueron generadas mediante la técnica de electroformación (Fig. 28). Las GUVs obtenidas se enfriaron e incubaron con EhVps20(1-173) (Fig. 29, panel A), EhVps20 (Fig. 29, panel B); o bien, con EhVps32(1-165) (Fig. 29, panel C). La unión de las proteínas a la membrana fue analizada en términos de co-localización entre la membrana marcada con el lípido fluorescente TexasRed-PE (rojo) y las proteínas marcadas con Alexa488 (verde). Los resultados otorgan un valor de co-localización *Pearson* de 0.45 para EhVps20(1-173) que supera al obtenido con la versión completa de esta proteína (0.05) (Fig. 29, panel D). En el caso de EhVps32 (1-165) observamos algunos puntos de co-localización; sin embargo, los valores obtenidos fueron de 0.15, menores al compararse con EhVps20(1-173) (Fig. 29, panel D).

7.10.2 Análisis de la función de cada una de las proteínas del complejo ESCRT-III en el modelo de GUVs

Una vez verificada la capacidad de unión de la proteína EhVps20(1-173) a la membrana lipídica, se procedió al ensayo de reconstitución de la maquinaria ESCRT-III de *E. histolytica*. Para ello, GUVs fueron co-incubadas con la proteína EhVps20(1-173) (verde, Fig. 30, Panel B), seguido por la adición de EhVps32 (Fig. 30, panel C), EhVps24 (Fig. 30, panel D) y EhVps2 (Fig. 30, panel E) incubando durante 5 min entre la adición de cada una de las proteínas.

Figura 28. Método de electroformación para generar GUVs. Los pasos para generar GUVs mediante la técnica de electroformación son los siguientes. (1) Limpiar con etanol y agua millipore, vidrios recubiertos de óxido de Indio y Estaño (ITO) que servirán como sustrato para la formación de GUVs. (2) Colocar en el cristal, el lípido o mezcla de lípidos a utilizar y esparcir de forma homogénea. (3) Colocar los cristales-ITO en un desecador cuidando que la capa de lípidos quede boca arriba. (4) Utilizar el desecador para evaporar por medio de vacío, el solvente en el que están contenidos los lípidos. (5) Armar la cámara de electroformación colocando el cristal-ITO, un espaciador de silicona y el otro cristal-ITO; en ambos casos el lípido debe estar en la parte interna de la cámara. (6) Con ayuda de una jeringa, rellenar el interior de la cámara con el solvente a utilizar. (7) Conectar la cámara a la corriente eléctrica para llevar a cabo la electroformación. (8) Dejar enfriar y cuidadosamente desarmar la cámara, utilizando un escalpelo como ayuda. (9) Observar las vesículas formadas mediante microscopía confocal.

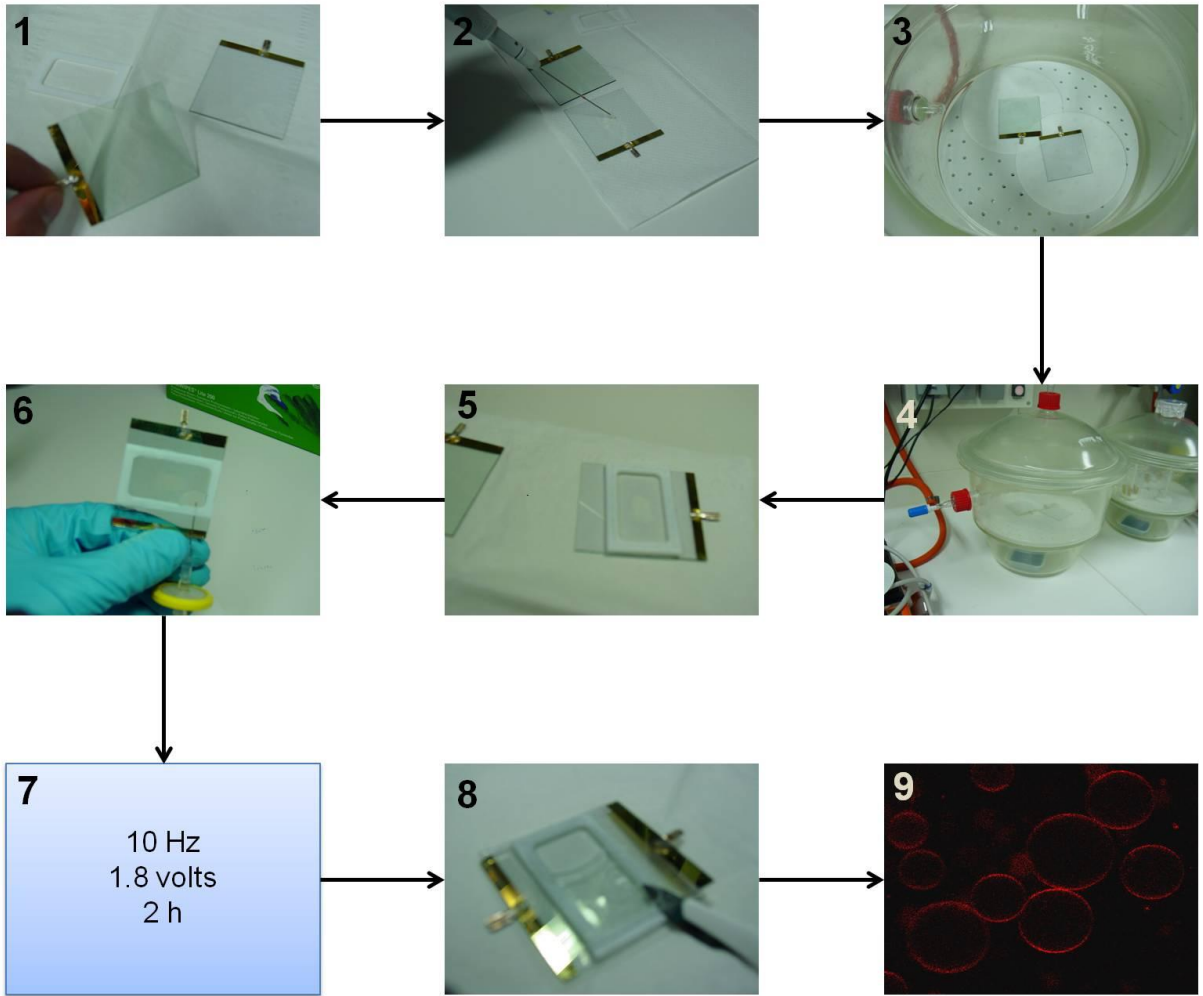
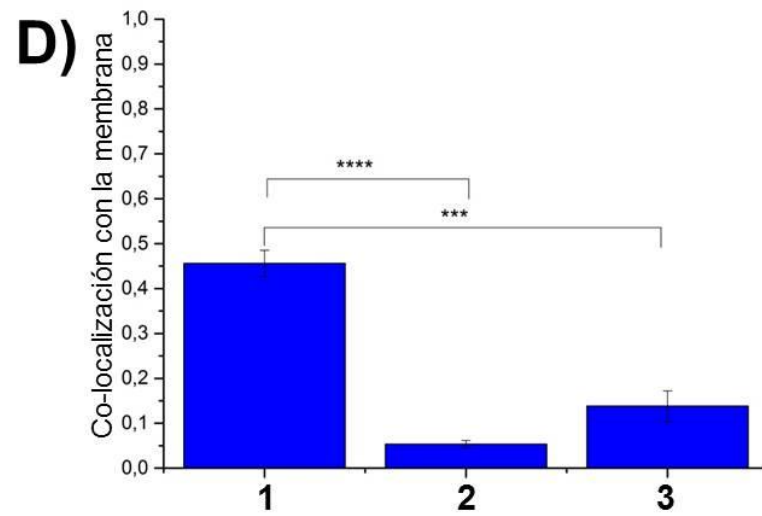
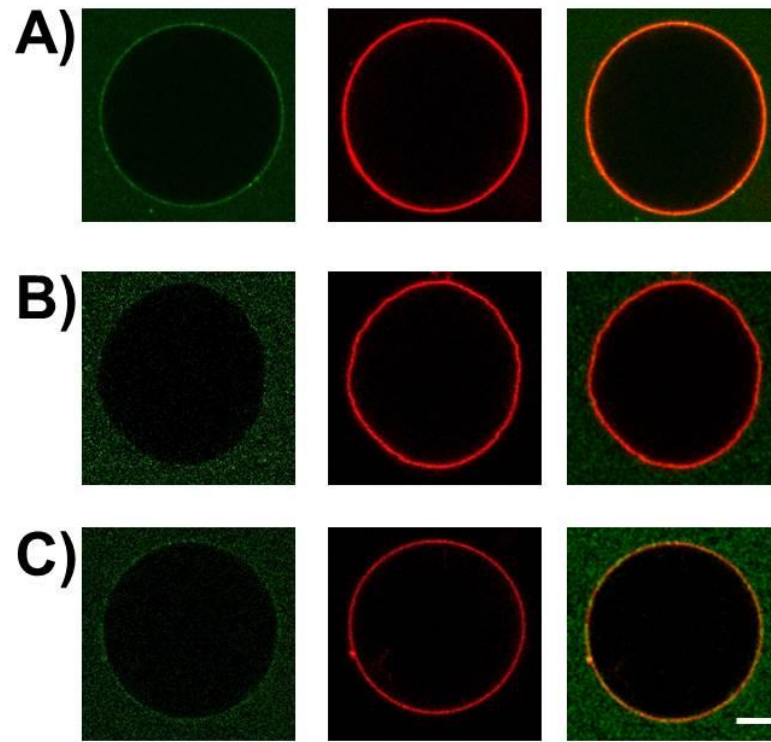


Figura 29. Unión de EhVps20 y EhVps32 a membranas lipídicas. GUVs con la composición de POPC (62 mol%), POPS (10 mol%), colesterol (25 mol %), Ptlns(3)P (3 mol%) y TexasRed-PE (0.1 mol%) (rojo) fueron incubadas con **(A)** 125 nM de EhVps20(1-173), **(B)** 125 nM de EhVps20 o bien, **(C)** 300 nM de EhVps32(1-165) las cuales estaban marcadas con Alexa488 (verde) durante 15 minutos a TA, seguido por su análisis mediante microscopía confocal. **(D)** Análisis óptico de co-localización, 1: EhVps20 (1-173), 2: EhVps20, 3: EhVps32 (1-165). Barra: 10 μ m



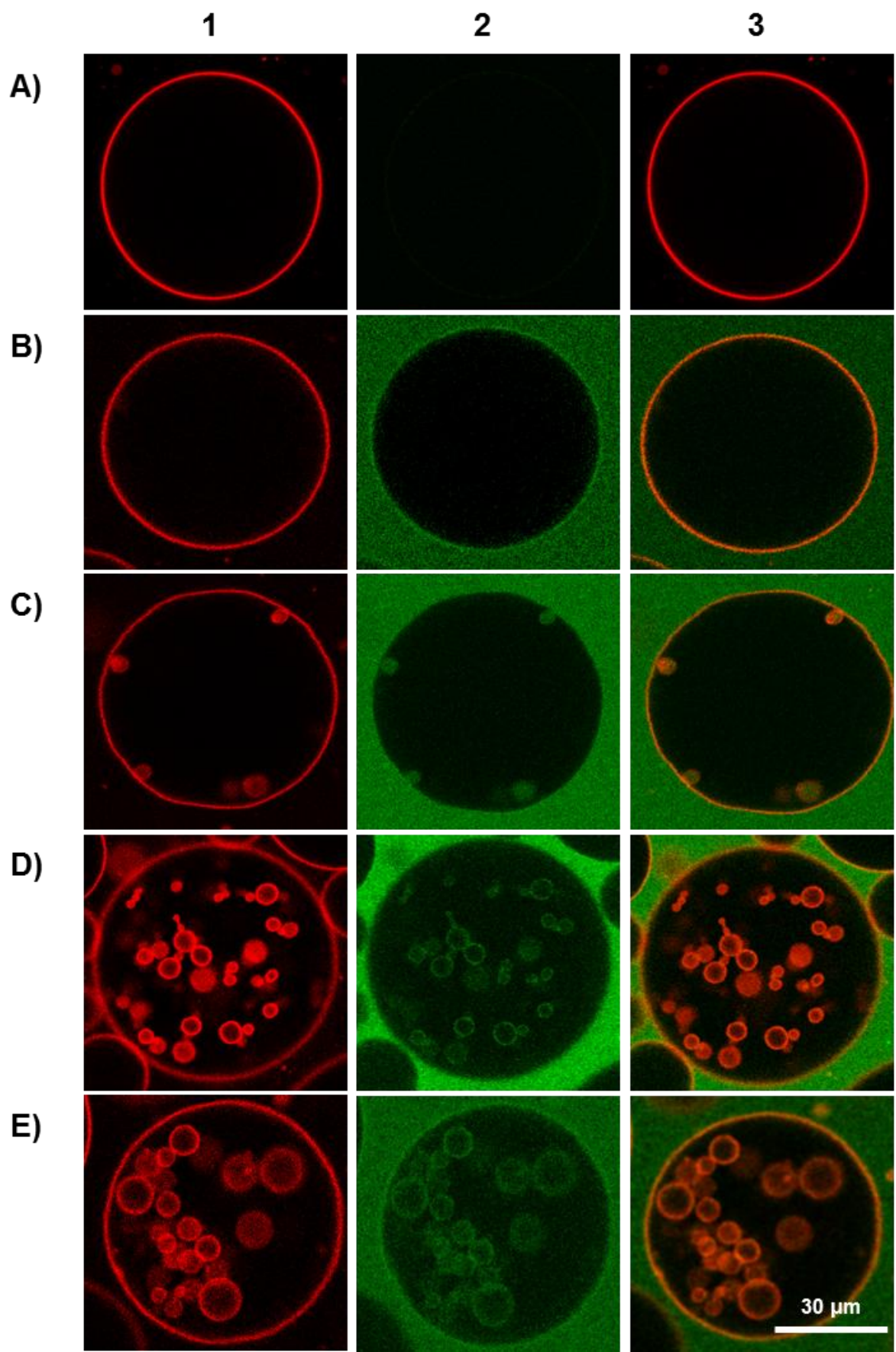
Como se puede observar en las imágenes, al adicionar EhVps20(1-173) observamos co-localización con la membrana lipídica (Fig. 30, panel B); al incluir EhVps32 en la mezcla, la membrana comienza a invaginarse pero las vesículas generadas siguen en contacto directo con la membrana (Fig. 30, panel C). Al adicionar EhVps24, las vesículas formadas en el paso anterior son liberadas hacia el lumen de las GUVs formando las vesículas intraluminales con un tamaño aproximado de 5 μm de diámetro (Fig. 30, panel D). Finalmente, con la adición de EhVps2, las vesículas intraluminales generadas se mantienen y no se observan cambios significativos respecto al experimento anterior (Fig. 30, panel D). Para verificar que el efecto en la membrana era llevado a cabo por acción de las proteínas y no por efecto del amortiguador, GUVs fueron incubadas únicamente con el amortiguador que contiene a las proteínas durante los mismos tiempos de interacción; en este caso no se observaron cambios en la superficie de la membrana lipídica (Fig. 30, panel A).

La cantidad de vesículas internas (liberadas o en contacto con la membrana) generadas en cada paso fue cuantificada en un total de 100 GUVs. El resultado fue expresado en términos de porcentaje (Fig. 30, panel E). Como podemos ver, el porcentaje incrementa significativamente al adicionar EhVps32 (42%), sigue incrementando con la adición de EhVps24 (64%) y se mantiene similar con la adición de la última proteína (71%) (Fig. 30, panel E).

7.10.3 Especificidad de miembros del complejo ESCRT-III hacia membranas cargadas negativamente.

Una vez comprobada la capacidad de acción de los miembros del complejo ESCRT-III de *E. histolytica* sobre la mezcla de lípidos reportada en la literatura, procedimos a evaluar su especificidad hacia lípidos cargados negativamente. Anteriormente se ha propuesto que la unión hacia membranas es realizada debido a fuerzas electrostáticas, en las que la porción N-terminal de las proteínas del complejo ESCRT-III, cuya carga neta es positiva, se une a la cabeza polar de lípidos con carga negativa (Henne et al., 2011). Para ello, generamos GUVs hechas de 100 mol% DOPG (fosfolípido con carga negativa) o 100 mol% DOPC (fosfolípido con carga zwitteriónica), en ambos casos se incluyó el fosfolípido TexasRed-PE (0.1 mol%) para poder visualizar la membrana.

Figura 30. Reconstitución de la maquinaria ESCRT-III. GUVs compuestas de POPC (62 mol%), POPS (10 mol%), colesterol (25 mol %), PtlIns(3)P (3 mol%) y TexasRed-PE (0.1 mol%) (rojo) fueron incubadas con **(A)** Tris 50 mM, NaCl 300 mM pH 7.4, adicionando de forma progresiva: **(B)** 125 nM de EhVps20 (1-173) marcada con Alexa 488 (verde), **(C)** 300 nM de EhVps32, **(D)** 100 nM de EhVps24 y, **(E)** 100 nM de EhVps2 durante 5 minutos de incubación a TA entre la adición de cada proteína, seguido por su análisis mediante microscopía confocal. Carril 1: canal rojo, TexasRed. Carril 2: Canal Verde, Alexa488. Carril 3: empalme.



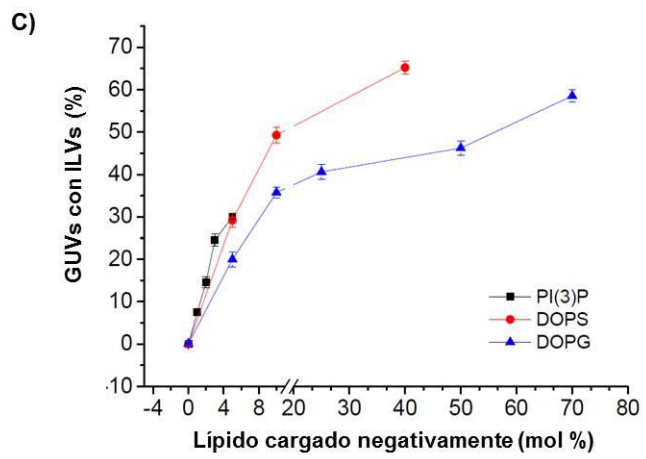
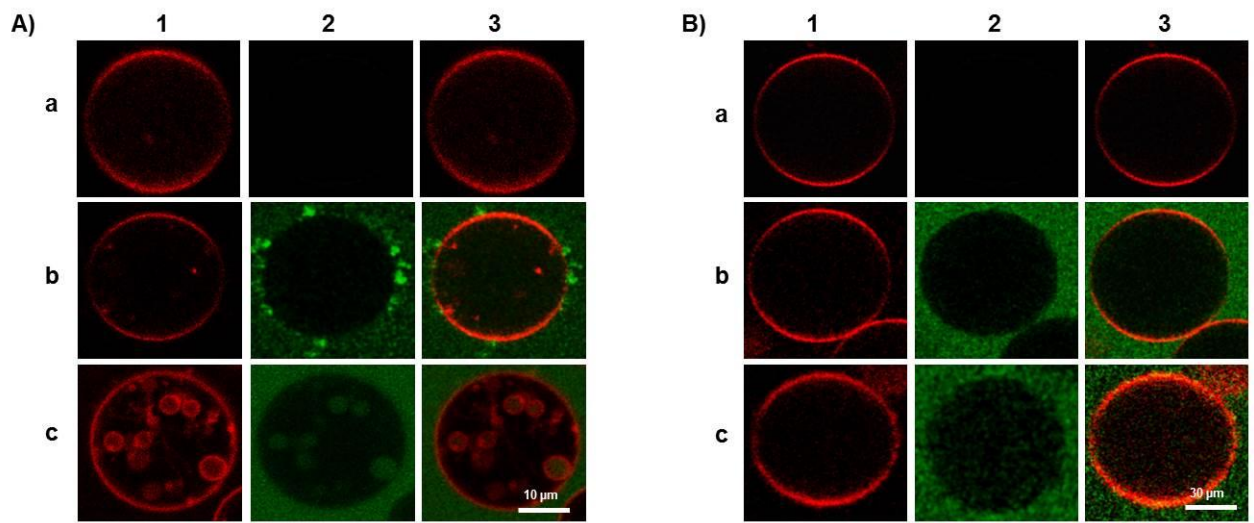
Una vez generadas, las GUVs se incubaron con EhVps20(1-173), EhVps32 y EhVps24 nombrada en adelante como maquinaria ESCRT-III mínima. Al incubar EhVps20(1-173) con las dos poblaciones de GUVs, observamos la unión a la membrana de DOPG (Fig. 31, panel A) y no así a la membrana de DOPC (Fig. 31, panel B). De manera consecuente, se llevó a cabo formación de vesículas internas en DOPG-GUVs (Fig. 31, panel A), mientras que al incubarse con DOPC-GUVs no observamos la formación de las vesículas (Fig. 31, panel B). Como control, GUVs de ambas poblaciones fueron incubadas únicamente con el amortiguador que contiene a las proteínas.

Por otro lado, para probar la preferencia de estas proteínas hacía distintos tipos de lípidos con carga negativa, generamos mezclas diferentes de los lípidos con carga negativa, PI(3)P, DOPG y DOPS, utilizando concentraciones crecientes de los mismos, diluidos en el lípido sin carga DOPC. Como resultado observamos que la maquinaria ESCRT-III mínima es más activa utilizando 40% de DOPS, en donde observamos formación de vesículas internas en 65% de las GUVs analizadas (Fig. 31, línea roja).

7.10.4 Acción de la maquinaria ESCRT-III mínima en membranas con separación de fase.

Una de las principales funciones del colesterol es su capacidad para modular las propiedades fisicoquímicas de las membranas celulares y juega un papel importante en la organización lateral de la membrana (Wang et al., 2007). Al mezclar colesterol con fosfatidilcolinas saturadas y esfingomielina forma la fase líquida ordenada (Lo), mientras que al unirse a fosfatidilcolinas insaturadas forma la fase líquida desordenada (Ld) (Crane y Tamm, 2004; Stottrup et al., 2004). Existen evidencias de que las proteínas de la maquinaria ESCRT-III inducen separación de fase en membranas lipídicas soportadas, lo cual podría facilitar la flexibilidad de la membrana para poder llevar a cabo la invaginación de la misma (Boura et al., 2012). Para analizar si las proteínas de la ameba eran capaces de inducir separación de fase en las membranas, generamos GUVs con la siguiente composición: colesterol (25 mol%), DOPG (10 mol%), esfingomielina (65 mol%) e incluimos el fosfolípido marcado, DiI-PE (0.1 mol%) (rojo), de tal forma que las GUVs obtenidas se encontraban en la fase líquida ordenada (Lo-GUVs).

Figura 31. Acción de la maquinaria ESCRT-III mínima sobre membranas cargadas negativamente. GUVs compuestas de **(A)** DOPG (100 mol%) y TexasRed-PE (0.1 mol%) (rojo) o, **(B)** DOPC (100 mol%) y TexasRed-PE (0.1 mol%) (rojo) fueron incubadas con **(a)** Tris 50 mM, NaCl 300 mM pH 7.4, adicionando de forma progresiva: **(b)** 125 nM de EhVps20 (1-173) marcada con Alexa 488 (verde), **(c)** 300 nM de EhVps32 y 100 nM de EhVps24 durante 5 minutos de incubación a TA entre la adición de cada proteína, seguido por su análisis mediante microscopía confocal. Carril 1: canal rojo, TexasRed. Carril 2: Canal Verde, Alexa488. Carril 3: empalme. **(C)** GUVs generadas con PI(3)P (1, 2, 3 y 5 mol%); DOPS (5, 10 y 40 mol%) o bien, DOPG (5, 10, 25, 50 y 70 mol%) llevado a 100 mol% con DOPC fueron incubadas con una mezcla de EhVps20 (1-173) (125 nM), EhVps32 (300 nM) y EhVps24 (100 nM) durante 15 min a t.a. y analizadas por microscopía confocal. El porcentaje de GUVs con vesículas internas fue cuantificado y graficado. Línea negra: PI(3)P. Línea roja: DOPS. Línea azul: DOPG.



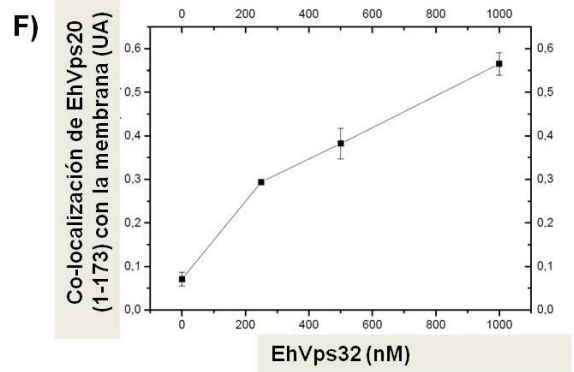
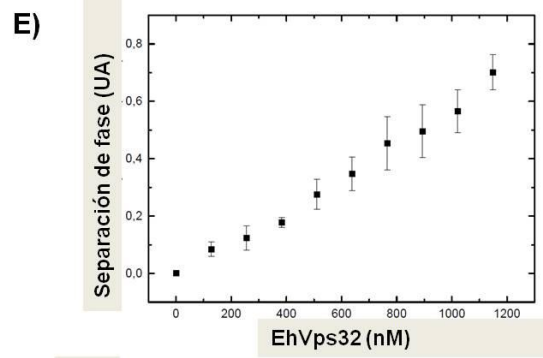
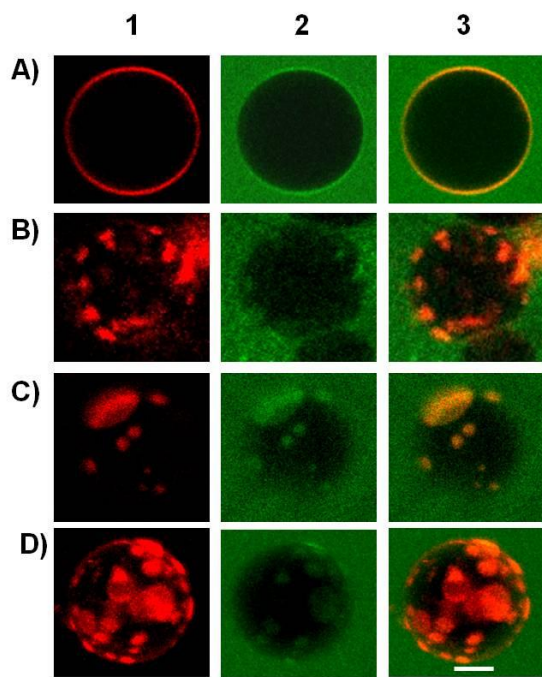
Posteriormente, Lo-GUVs fueron incubadas con EhVps20(1-173) y concentraciones crecientes de EhVps32 (Fig. 32). Al incubar únicamente con EhVps20(1-173) observamos co-localización de la proteína con la membrana (Fig. 32, panel A). De forma interesante, al adicionar 250 nM de EhVps32, la proteína induce separación de fase, que se hace evidente por la formación de parches en los está presente el colorante Dil, el cual se localiza preferencialmente en la fase líquida desordenada. Asimismo, observamos colocalización de EhVps20(1-173) con este colorante (Fig. 32, panel B). La separación de fase es más notoria al duplicar y cuadruplicar la concentración de EhVps32 adicionada (Fig. 32, panel C y D, respectivamente). Al graficar los resultados obtenidos, observamos una tendencia lineal de la separación de fase de la membrana en relación a la adición de la proteína EhVps32 (Fig. 32, panel E). Además, encontramos que los niveles de colocalización entre la proteína EhVps32 (1-173) (verde) y el lípido marcado con Dil (rojo) incrementa en forma lineal con la cantidad de proteína EhVps32 incluida.

7.11 Interacción entre los miembros del complejo ESCRT-III y con otros miembros de la maquinaria ESCRT.

Finalmente, con el objetivo de determinar el sitio topológico en el cual participan los miembros del complejo ESCRT-III en los trofozoítos, evaluamos algunas interacciones de EhVps32, proteína más abundante del complejo ESCRT-III. Debido a que se cuentan con pocos marcadores específicos del proceso de fagocitosis en *E. histolytica*, recurrimos al LysoTracker, el cual se utiliza para marcar organelos ácidos (≤ 6.5), ya que se sabe que los MVBs, sitio de acción de la maquinaria ESCRT-III en otros organismos, presenta un pH ácido.

Para estos experimentos, nuevamente realizamos una cinética de eritrofagocitosis, tomando tiempos significativos a partir de los ensayos anteriores. En condiciones normales encontramos que EhVps32 se encuentra colocalizando con vesículas ácidas marcadas con LysoTracker (Fig. 33, tiempo 0 min, cabeza de flecha rellena). A los 5 min de iniciada la eritrofagocitosis, observamos que, al igual que en los resultados anteriores, EhVps32 se encuentra localizada sólo en algunos fagosomas que contienen eritrocitos, en donde co-localiza con LysoTracker (Fig. 33, tiempo 5 min, cabeza de flecha rellena), este fenómeno se mantiene a los 30 minutos de iniciada la eritrofagocitosis (Fig. 33, tiempo 30 min, cabeza de flecha rellena).

Figura 32. Separación de fase en GUVs inducida por la proteína EhVps32. GUVs compuestas de Esfingomielina (65 mol%), DOPG (10 mol%), colesterol (25 mol %), Ptlns(3)P (3 mol%) y Dil-PE (0.1 mol%) (rojo) fueron incubadas con **(A)** 125 nM de EhVps20 (1-173) marcada con Alexa 488 (verde), adicionando: **(B)** 250 nM de EhVps32 **(C)** 500 nM de EhVps32, o bien, **(D)** 1000 nM de EhVps32, incubando durante 15 minutos, seguido por su análisis mediante microscopía confocal. Carril 1: canal rojo, Dil. Carril 2: Canal Verde, Alexa488. Carril 3: empalme. **(E)** 100 GUVs fueron analizadas y se graficó el porcentaje de GUVs con separación de fase vs la concentración de la proteína EhVps32. **(F)** Cuantificación de la co-localización entre la membrana líquida desordenada y la proteína EhVps20(1-173) en función a la concentración de EhVps32 adicionada.



Finalmente a los 45 min de eritrofagocitosis, cuando ya está más avanzado el proceso de degradación, la proteína EhVps32 se redistribuye al citoplasma y ya no se encuentra presente en fagosomas; en cambio, aumenta la cantidad de fagosomas marcados con LysoTracker (Fig. 33, tiempo 45 min, flecha). En todos los tiempos, observamos fagosomas sin marca de EhVps32 (Fig. 33, tiempo 5-45 min, cabezas de flecha vacías).

Resultados anteriores, demostraron la capacidad de unión *in vitro* entre EhVps32 y EhADH, un miembro de la familia ALIX (Bañuelos et al., 2011). Por otro lado, se ha demostrado que además de la vía canónica para reclutar a la maquinaria ESCRT-III en la membrana del endosoma, descrita en la introducción, existe otra ruta que involucra la participación de la proteína ALIX, en la cual la maquinaria ESCRT-III se recluta independiente del resto de la maquinaria (Dores et al., 2012). Para verificar la unión entre EhVps32 y EhADH durante la fagocitosis del parásito, nuevamente realizamos una cinética de eritrofagocitosis y mediante la técnica de inmunofluorescencia indirecta detectamos a EhVps32 (verde) y a la proteína EhADH (rojo). En condiciones basales encontramos que EhVps32 y EhADH muestran su localización normal previamente observada y además localizan en pequeñas vesículas presentes en el citoplasma (Fig. 34, tiempo 0, cabezas de flecha rellena). A los 5 min de iniciada la fagocitosis, observamos que en aquellos fagosomas en los cuales está presente la proteína EhVps32 también se encuentra enriquecida EhADH (Fig. 34, tiempo 5 min, cabezas de flecha rellena); mismo comportamiento que se mantiene a los 30 min de eritrofagocitosis (Fig. 34, tiempo 30 min, cabezas de flecha rellena). A 45 y 60 min, la proteína EhVps32 se encuentra dispersa en el citoplasma pero EhADH sigue presente en fagosomas (Fig. 34, tiempo 45 y 60 min, flecha). Nuevamente observamos algunos fagosomas que carecen de ambas marcas (Fig. 34, cabezas de flecha vacías).

Figura 33. Colocalización de EhVps32 con LysoTracker. Trofozoítos de *E. histolytica* se incubaron a 37°C durante toda la noche con 2 µM de LysoTracker (rojo), posteriormente los trofozoítos fueron co-incubados con eritrocitos humanos de tipo O+ en una relación 1:30 a diferentes tiempos. Las preparaciones se incubaron con los anticuerpos específicos α-EhVps32, seguido por los anticuerpos secundarios acoplados a FITC (verde), para su posterior análisis mediante microscopía confocal. Carril 1: campo claro. Carril 2: canal verde, FITC. Carril 3: canal rojo, LysoTracker. Carril 4: Empalme. Barra: 10 µm

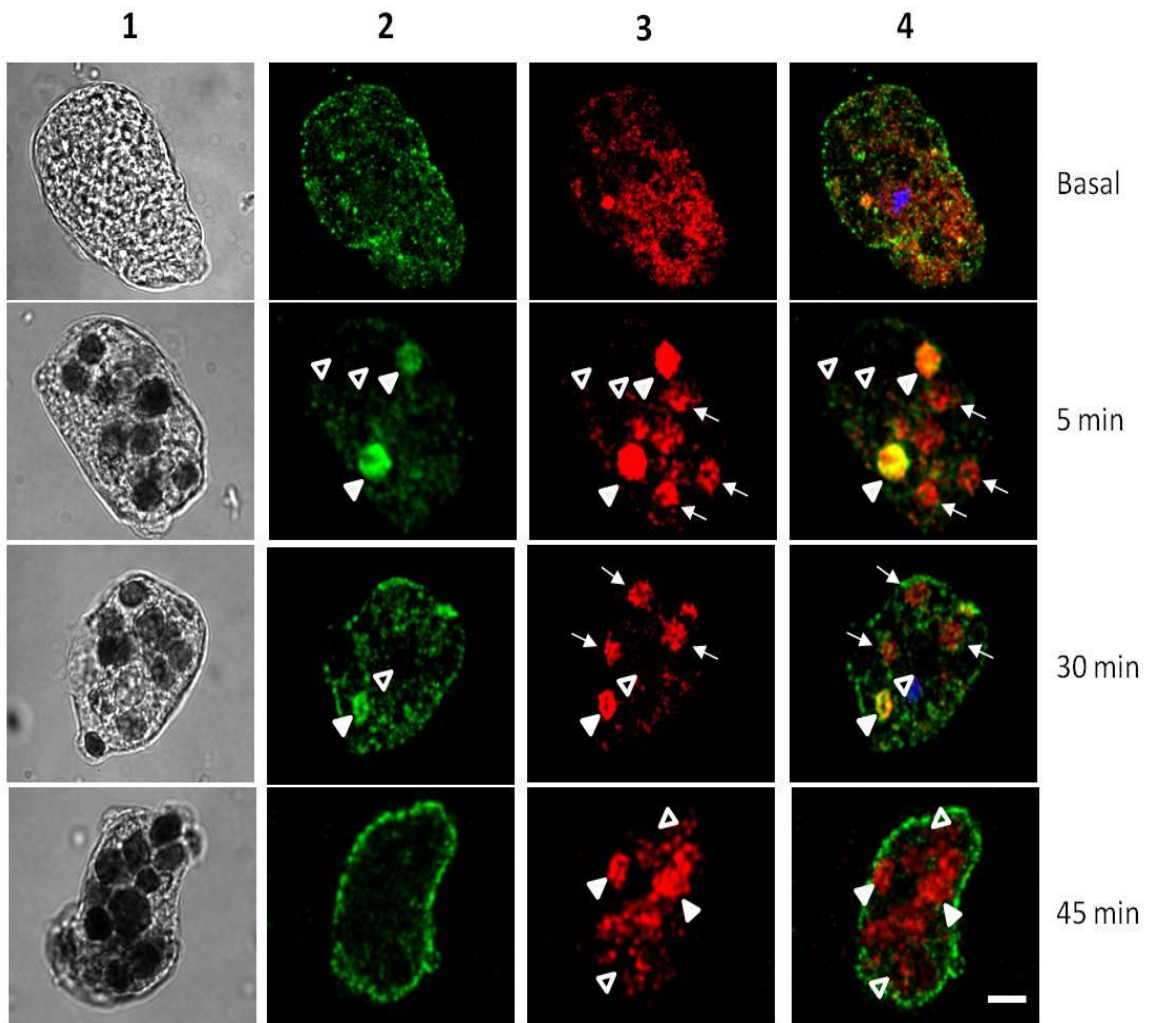
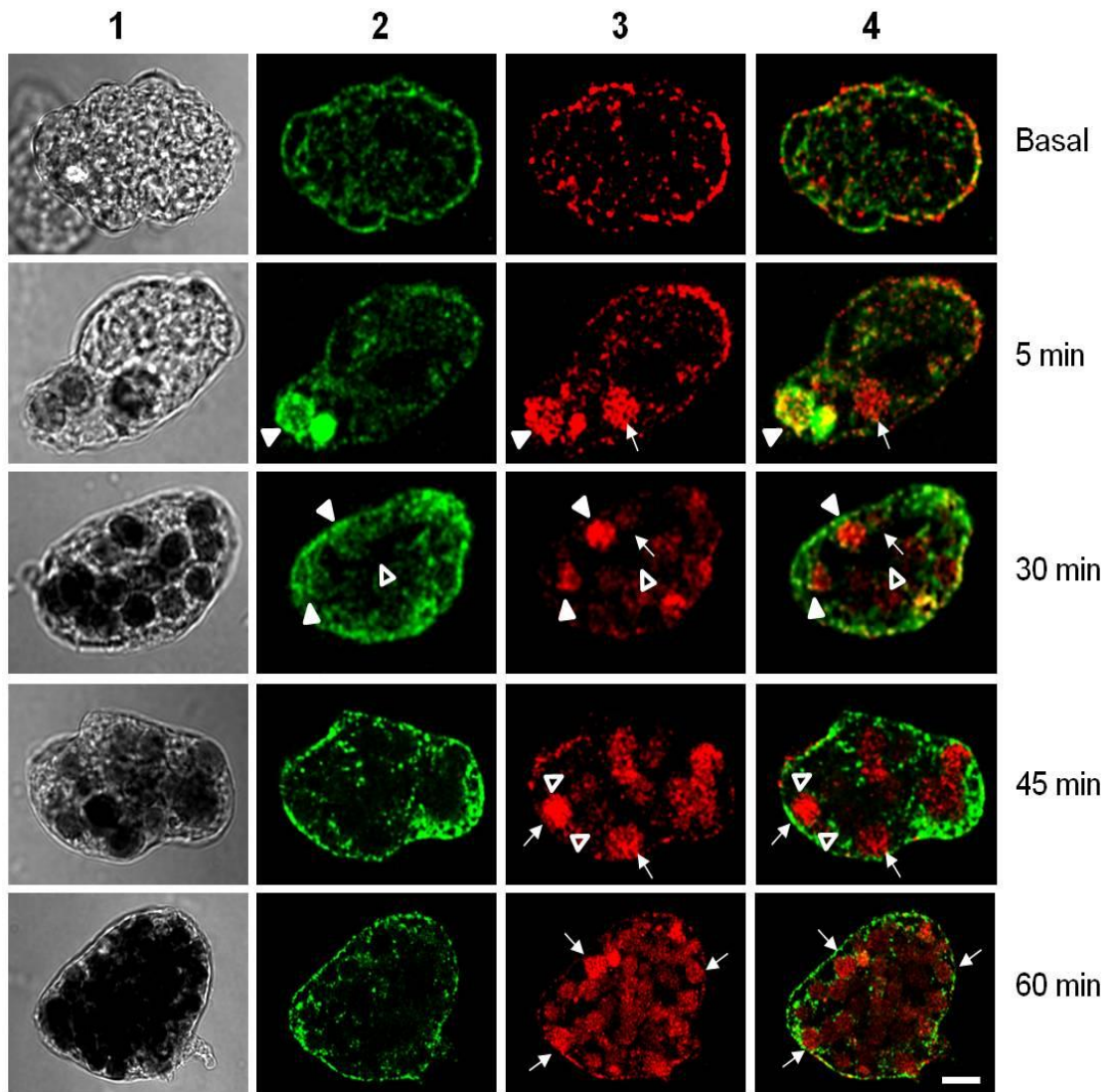


Figura 34. Colocalización de EhVps32 con EhADH. Trofozoítos de *E. histolytica* se co-incubaron a 37°C con eritrocitos humanos de tipo O+ en una relación 1:30 a diferentes tiempos; las preparaciones se incubaron con los anticuerpos específicos α -EhVps32, seguido por los anticuerpos secundarios acoplados a FITC (verde); y α -EhADH, seguido por anticuerpos secundarios acoplados a TRITC (rojo), para su posterior análisis mediante microscopía confocal. Carril 1: campo claro. Carril 2: canal verde, FITC. Carril 3: canal rojo, TRITC. Carril 4: Empalme. Barra: 10 μ m



7.12 Efectos de la sobre-expresión y el silenciamiento de EhVps32 en la eritrofagocitosis de *E. histolytica*

Con el objetivo de evaluar la participación de la maquinaria ESCRT-III de *E. histolytica* sobre la eritrofagocitosis en este parásito, llevamos a cabo la sobre-expresión y el silenciamiento de la proteína EhVps32, que es la más abundante de la maquinaria ESCRT-III.

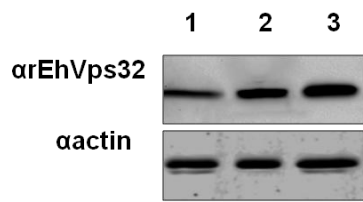
Para lograr la sobre-expresión, trofozoítos de *E. histolytica* fueron transfectados con el vector *pNEO/Ehvps32-HA*. Como control, se transfectó el vector *pNEO* vacío en trofozoítos. Después de 12 horas de recuperación, la sobre-expresión de la proteína se confirmó mediante ensayos de *western blot*, al realizar el análisis densitométrico encontramos que los trofozoítos transfectados con *pNEO/EhVps32-HA* expresan entre 1.6 a 2 veces más la proteína EhVps32, en comparación con los trofozoítos transfectados con el vector vacío y trofozoítos no transfectados, respectivamente (Fig. 35, panel A).

En el caso del silenciamiento, el vector *pSAP2/GunmaEhVps32-431* fue transfectado en la cepa G3, utilizada para silenciamiento post-transcripcional de genes en *E. histolytica*. Los trofozoítos generados fueron cultivados en presencia de 7 µg/ml del antibiótico G418 y presentaban una tasa de crecimiento similar a la cepa G3, utilizada como control para estos ensayos. El nivel de expresión de la proteína EhVps32 fue analizada mediante ensayos Western-blot y encontramos una reducción del 80% en la cantidad de EhVps32 comparada con la cepa G3 (Fig. 35, panel A).

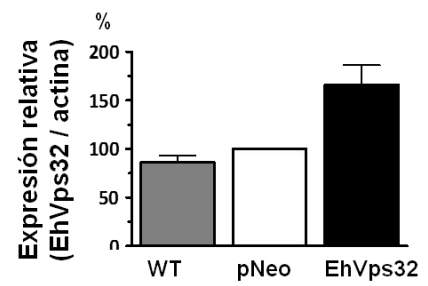
Los trofozoítos transfectantes generados fueron sometidos a cinética de eritrofagocitosis durante 2, 5 y 30 min, finalizado este tiempo los trofozoítos fueron procesados para realizar la cuantificación de hemoglobina en el interior de trofozoítos a los diferentes tiempos de fagocitosis. A todos los tiempos evaluados, observamos que en trofozoítos que sobre-expresan la proteína EhVps32, la ingesta de eritrocitos se encuentra aumentada entre 56 a 105% más, en comparación con las amibas transfectadas con el vector vacío (Fig.35, panel B). De forma paralela, después de 20 min, el silenciamiento de la proteína ocasionó una disminución del 80% en la cantidad de eritrocitos ingeridos al comparar con la cepa G3 (Fig. 36, panel B). Al realizar una tinción con 3,3'-diaminobenzidina y observar mediante microscopía de luz, estas diferencias resultan evidentes (Fig. 35 y 36, panel C).

Figura 35. Sobre-expresión de EhVps32. (A) Ensayos de *Western blot* utilizando extractos de proteínas totales de trofozoítos en diferentes condiciones y empleando los anticuerpos α -EhVps32r o α -actina como control de carga. Carril 1: clona A. Carril 2: trofozoítos transfectados con *pNEO*. Carril 3: trofozoítos transfectados con *pNEOEhvps32-HA*. **(B)** Análisis densitométrico de las bandas encontradas en (A), normalizadas con la proteína actina. **(C)** Tasa de eritrofagocitosis en trofozoítos transfectados. $p < 0.001$ (***) . **(D)** Trofozoítos incubados con eritrocitos durante 30 min y posteriormente teñidos con diaminobencidina, para su posterior análisis por microscopía de luz.

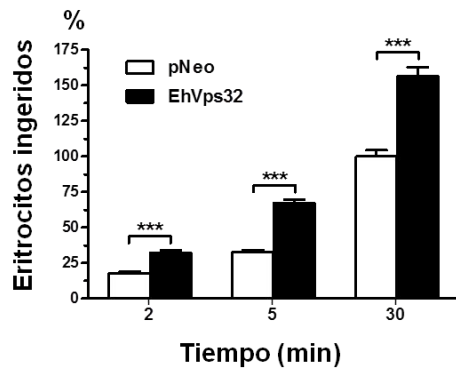
A)



B)



C)



D)

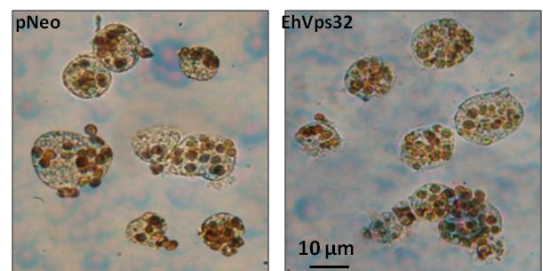
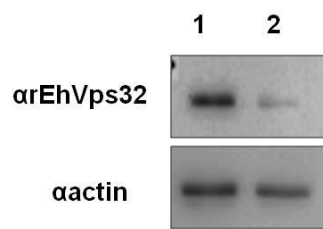
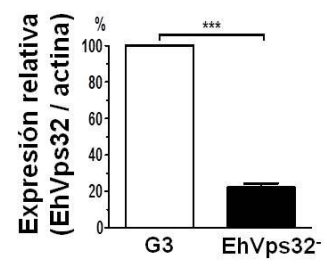


Figura 36. Silenciamiento de EhVps32. **(A)** Ensayos de *Western blot* utilizando extractos de proteínas totales de trofozoítos y empleando los anticuerpos α -EhVps32r o α -actina como control de carga. Carril 1: clona G3. Carril 2: trofozoítos transfectados *pSAP2/GunmaEhVps32-431*. **(B)** Análisis densitométrico de las bandas encontradas en (A), normalizadas con la proteína actina. **(C)** Tasa de eritrofagocitosis en trofozoítos transfectados. $p < 0.001$ (***) . **(D)** Trofozoítos incubados con eritrocitos durante 30 min y posteriormente teñidos con diaminobencidina, para su posterior análisis por microscopía de luz.

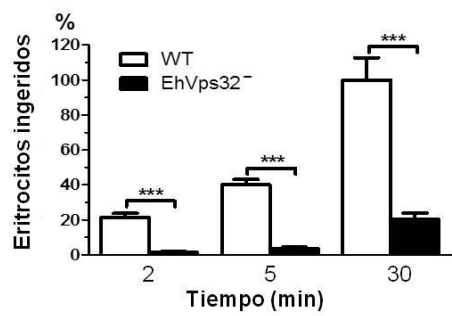
A)



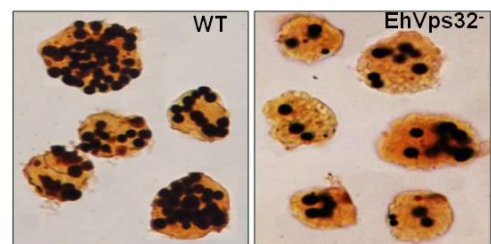
B)



C)



D)



8. Discusión

Uno de los principales mecanismos de virulencia del protozoario *E. histolytica* es la fagocitosis, por medio de la cual la ameba internaliza células inmunes y no inmunes del ser humano, bacterias y otras partículas, junto con fragmentos de su propia membrana lipídica (Orozco et al., 1983; Ravdin et al., 1980). La fagocitosis involucra la participación de moléculas y proteínas que contribuyen a la formación y maduración del fagosoma (Yeung y Grinstein, 2007). Al igual que en la endocitosis, en el proceso de maduración del fagosoma se forman organelos especializados de forma subsecuente, denominados fagosomas tempranos, cuerpos multivesiculares (MVBs), fagosomas tardíos y fagolisosomas que varían en su composición proteica y lipídica así como en el pH interno (Flannagan et al., 2012). Los MVBs son estructuras que se caracterizan por la presencia de vesículas internas, denominadas vesículas intraluminales (ILVs) y son el sitio donde se lleva a cabo la diferenciación entre las moléculas destinadas a degradación y las que serán recicladas hacia la membrana plasmática y otros organelos. Un proceso que resulta de vital importancia en los mecanismos mediados por receptor, como es el caso de la fagocitosis (Hurley, 2008). La formación de las ILVs es conducida por la acción secuencial de los miembros de la maquinaria ESCRT (complejos de direccionamiento endosomal requeridos para transporte), en la cual, una serie de proteínas se asocian a la membrana del endosoma de forma orquestada y regulada por señales específicas como la monoubiquitinación. De esta manera, se facilita el proceso de deformación de la membrana mediante una serie de pasos que son topológica y mecánicamente distintos a los descritos para la vía de la formación de vesículas recubiertas por clatrina (Hurley y Emr, 2006; Shen et al., 2014; Wollert et al., 2009).

La maquinaria ESCRT se encuentra dividida en 5 subcomplejos denominados ESCRT-0, ESCRT-I, ESCRT-II, ESCRT-III y complejo asociado al ESCRT-III (Babst, 2005). El ESCRT-III se encuentra altamente conservado en eucariontes e incluso está presente en algunos miembros del reino Archae (Leung et al., 2008), en donde participa en la división celular. Este alto grado de conservación evolutiva sugiere la importancia de este complejo (Leung et al., 2008; Samson et al., 2008). El complejo ESCRT-III se encuentra formado por cuatro proteínas denominadas Vps2, Vps20, Vps32 y Vps24 (Babst et al., 2002a). Todas poseen en su extremo N-terminal un dominio SNF7, el cual es un dominio estructural formado por 4 alfa-hélices que se superenrollan dando lugar a dominios *coiled-coil*, responsables de la formación de

multímeros (Shen et al., 2014). El mecanismo de acción del complejo ESCRT-III no se encuentra bien establecido; sin embargo, el más aceptado inicia con la unión de Vps20 hacia la membrana del endosoma que se está invaginando; a continuación, recluta a Vps32, que forma polímeros en forma de anillos y contribuye en el estrechamiento del cuello de la vesícula naciente. Finalmente, el sub-complejo formado por Vps24 y Vps2 participa en la escisión de la vesícula intraluminal. Además de participar en la formación de MVBs, la maquinaria ESCRT-III se encuentra involucrada en otros eventos celulares, tales como reparación de la membrana plasmática, gemación de virus envueltos y citocinesis, entre otros (Guizetti et al., 2011; von Schwedler et al., 2003). En todos los casos se observa el ensamblaje de la maquinaria ESCRT-III sobre la membrana que se está deformando y participa en el proceso de escisión de la misma (Henne et al., 2013).

Al realizar un análisis *in silico* en el genoma de *E. histolytica* se encontró la presencia de 19 miembros putativos de la maquinaria ESCRT y mediante ensayos de RT-PCR, se encontró el transcrito de 15 de estos genes (López-Reyes et al., 2010). Sin embargo, únicamente se ha caracterizado a la proteína EhVps4, ATPasa necesaria para la disociación de la maquinaria de la membrana de los endosomas (López-Reyes et al., 2010); y a EhADH, que posee un dominio Bro1, característico de los miembros de la familia de proteínas ALIX, involucrados en varios procesos de señalización celular (Bañuelos et al., 2005). Además, durante mi trabajo de tesis de maestría, se identificó a EhVps32, la proteína más abundante del complejo ESCRT-III (Avalos-Padilla, 2012). EhVps4, EhADH y EhVps32 presentaron cambios en su localización durante la eritrofagocitosis, relocalizándose alrededor de eritrocitos ingeridos, lo cual sugiere fuertemente la participación de la maquinaria en la fagocitosis de *E. histolytica*.

Durante este trabajo, nos enfocamos en la caracterización de EhVps2, EhVps20 y EhVps24, miembros de la maquinaria ESCRT-III de *E. histolytica*. Debido a los antecedentes en otros organismos y a la presencia de EhVps32, también miembro de ESCRT-III, alrededor de fagosomas durante la eritrofagocitosis, decidimos investigar la participación del complejo ESCRT-III durante la fagocitosis de eritrocitos, así como elucidar la función de cada una de las proteínas utilizando el modelo de vesículas gigantes unilamelares (GUVs).

Las proteínas del complejo ESCRT-III de *E. histolytica* encontradas por López-Reyes corresponden a EhVps2, EhVps24 y EhVps32. Sin embargo, no encontró un

candidato para EhVps20 (López-Reyes et al., 2010). Mediante una búsqueda en la base de datos de amibas (AMOEBADB), utilizando el dominio SNF7, encontramos 4 proteínas: EhVps2, EhVps24 y EhVps32, descritas anteriormente por López-Reyes y una proteína extra a la que denominamos EhVps20. Para verificar que se trataba del homólogo de Vps20 en levadura y CHMP6 en humano, realizamos un análisis blast para obtener los valores de Identidad (%I) y similitud (%S) así como el valor de *e*, los cuales cuantifican las relaciones evolutivas entre distintas secuencias. Al comparar la proteína encontrada con su homólogo en levadura observamos una identidad del 23%, mismo porcentaje encontrado al comparar con CHMP6, su homólogo en humano. Como podemos observar en la tabla 2, los valores obtenidos para todas las proteínas del complejo ESCRT-III no son altos (20-29 %I, y 19-55 %S), si se comparan con otros casos de homología. Sin embargo, se ha estudiado que los miembros de la maquinaria ESCRT-III en diferentes organismos poseen valores de %I y %S relativamente bajos, lo cual indica que presentan pocas similitudes en su secuencia primaria.

La razón por la cual se clasifican como homólogos de la maquinaria ESCRT-III es debido a la presencia del dominio SNF7, el cual es un dominio estructural formado por dominios *coiled-coil* que permiten la interacción con otras proteínas y moléculas (Babst et al., 2002a).

Para continuar con la caracterización *in silico* de estas proteínas, realizamos la predicción de las estructuras secundarias y terciarias teóricas de cada una de ellas. En todos los casos encontramos al menos 5 hélices alfa, 4 en el extremo N-terminal ricas en aminoácidos con carga positiva (dominio SNF7) y una última en el C-terminal, rica en aminoácidos con cargas positivas. Además, localizamos una región conservada denominada como *k-linker* (Fig. 6), la cual es rica en aminoácidos hidrófobos que permiten que la proteína se pliegue de tal forma que la quinta hélice alfa, bloquee al dominio SNF7, sitio responsable de la unión a los lípidos cargados negativamente presentes en la membrana de los endosomas (Bajorek et al., 2009). De igual manera, la predicción de las estructuras 3D nos muestran que las proteínas presentes en la amiba conservan una estructura similar a sus homólogos en levadura y humano, siendo evidente su mayor similitud a las proteínas presentes en el humano (Fig. 6)

Una vez caracterizados los genes candidato y comprobada su expresión a nivel de mensajero en *E. histolytica*, las proteínas recombinantes GST-EhVps2, GST-

EhVps20 y GST-EhVps24 fueron expresadas y purificadas para generar anticuerpos policlonales específicos que nos permitieran conocer la expresión y localización de estas proteínas en la amiba. Las proteínas fueron purificadas gracias a la etiqueta de GST partiendo de lisados bacterianos en los cuales se indujo la producción de las distintas proteínas (Fig. 16 y 17). Una vez purificadas, la etiqueta de GST fue cortada utilizando la enzima *Precision Protease* que reconoce una secuencia conservada entre la proteína y la etiqueta de GST. Las proteínas recombinantes generadas EhVps20 y EhVps24 migraron a pesos moleculares mayores a los esperados, que fueron obtenidos al restar 26 kDa de la etiqueta de GST. En el caso de EhVps20 migró a 39 kDa, cuando el peso esperado es de 24 kDa (Fig. 16, panel D) y; EhVps24 migró a 31 kDa cuando su peso se esperaba en 24 kDa (Fig. 16, panel H). Esta migración aberrante ya ha sido observada en otros sistemas y se piensa que se debe a una propiedad intrínseca de la proteína, por ejemplo, la gran cantidad de aminoácidos cargados que posee (Babst et al., 2002a). EhVps2 purificada migró al peso esperado de 28 kDa (Fig. 16, panel B).

De forma interesante, observamos que al eliminar la quinta alfa-hélice de EhVps20, rica en aminoácidos con carga negativa, la proteína trunca purificada, migra al peso molecular esperado de 20 kDa (Fig. 16, panel F). Este resultado refuerza la teoría de que la migración aberrante se debe a la naturaleza cargada de la proteína.

A partir de las proteínas recombinantes purificadas, se generaron anticuerpos en conejos *New Zealand*, para el caso de EhVps20 y EhVps24, o en ratas *Wistar* para EhVps2. Una vez obtenidos los anticuerpos, se comprobó la especificidad de los mismos utilizando extractos de proteínas totales de bacterias en los cuales se indujo la expresión de las proteínas recombinantes. Probada la especificidad de los anticuerpos α -EhVps2, α -EhVps20 y α -EhVps24 en el sistema bacteriano, utilizamos extractos proteicos de trofozoítos de la clona A para llevar a cabo la identificación de las proteínas EhVps2, EhVps20 y EhVps24 en la amiba. Los anticuerpos α -EhVps2 reconocieron dos bandas, una de ~28 kDa, peso molecular igual al esperado y otra de ~56 kDa que corresponde probablemente a una forma dimérica de la proteína estudiada (Fig. 19, panel A, carril 2). Por otro lado, los anticuerpos α -EhVps20 detectaron una banda única de 39 kDa, peso molecular mayor al esperado de 24 kDa (Fig. 20, panel A, carril 2), pero como se describió anteriormente, se lo atribuimos a la naturaleza cargada de la proteína. Los anticuerpos α -EhVps24 detectaron una banda de 31 kDa, mayor al peso esperado de 24 kDa (Fig. 21, panel A, carril 2). Por otro

lado, los sueros preinmunes, utilizados a las mismas diluciones que los anticuerpos obtenidos, no reaccionaron con los extractos totales de amiba (Fig. 19-21, panel A, carril 1), demostrando que los anticuerpos generados reconocen de forma exclusiva a epítopes presentes en cada una de las proteínas estudiadas.

A continuación, evaluamos la localización subcelular de EhVps2, EhVps20 y EhVps24 en trofozoítos mantenidos en cultivo. Utilizando los diferentes anticuerpos generados y mediante la técnica de microscopía confocal, localizamos a las proteínas EhVps2 y EhVps24 en forma abundante en el citoplasma de los trofozoítos, localizadas en estructuras punteadas que sugerimos se trata de vesículas citoplásmicas (Fig. 19 y 21, panel B). Sin embargo, es necesario realizar ensayos más finos, como la microscopía electrónica, para delimitar su presencia en vesículas. Por otro lado, EhVps20, además de estar presente en estructuras punteadas del citoplasma de trofozoítos, se encuentra localizada a nivel de membrana (Fig. 20, panel B). Para verificar si la proteína se encuentra presente en la membrana interna o externa, realizamos los ensayos de microscopía confocal en trofozoítos no permeabilizados, de tal manera que se impide la entrada de la mayor parte de anticuerpos y únicamente se da el reconocimiento de las proteínas presentes en la membrana externa (Fig. 20, panel D). Al no observar marca en la membrana de trofozoítos no permeabilizados, concluimos que la proteína se encuentra presente únicamente en la cara interna de la membrana plasmática.

Dado que otras proteínas de la maquinaria ESCRT como EhVps4, EhADH y EhVps32 se relocalizan durante la eritrofagocitosis de *E. histolytica* (Avalos-Padilla, 2012; Bañuelos et al., 2005; López-Reyes et al., 2010), analizamos si EhVps2, EhVps20 y EhVps24 también participan en este proceso. Para tales fines, realizamos una cinética de eritrofagocitosis desde 0 hasta 60 minutos de interacción con eritrocitos. Como era de esperarse, EhVps2, EhVps20 y EhVps24 se relocalizan alrededor de los eritrocitos ingeridos desde tiempos muy tempranos (5 min) hasta tiempos tardíos de fagocitosis (45 min) (Figs. 23-25), mismo fenómeno observado al inmunolocalizar EhVps32 durante la eritrofagocitosis (Fig. 22). Estos resultados muestran que las proteínas del complejo ESCRT-III podrían tener un papel importante en la eritrofagocitosis de *E. histolytica*.

Para reforzar la participación del complejo ESCRT-III en el proceso de fagocitosis de *E. histolytica*, realizamos ensayos de co-localización de EhVps32 con EhADH, una proteína que se ha descrito participa de manera activa en la virulencia del parásito,

incluida la fagocitosis (Arroyo y Orozco, 1987; Bañuelos et al., 2005). Nuestros resultados demostraron que durante la eritrofagocitosis, ambas proteínas co-localizan en algunos de los fagosomas presentes en el citoplasma de los trofozoítos estudiados desde tiempos muy tempranos (5 min). La unión cesa posterior a los 30 min de eritrofagocitosis, tiempo al cual, EhVps32 recupera su localización citoplásmica (Fig. 34). En otros estudios se encontró que ALIX, proteína homóloga de EhADH, es capaz de reclutar a la maquinaria ESCRT-III de una forma independiente del resto de los subcomplejos (Dores et al., 2012). El hecho de que ambas proteínas se hayan encontrado a tiempos tempranos de fagocitosis, sugiere que el reclutamiento de la maquinaria ESCRT-III pueda ser mediado por una vía similar a la descrita anteriormente; en la cual, EhADH al estar expuesta en la membrana celular del trofozoíto sirve como molécula receptora de eritrocitos, y una vez internalizada junto con el fagosoma, EhVps32 y el resto de la maquinaria ESCRT-III son reclutados por acción de EhADH.

La presencia de las proteínas estudiadas en tiempos fijos de eritrofagocitosis, indican que estas participan en un tipo de fagosoma determinado. A pesar de que se carece de marcadores apropiados de la maduración de fagosomas en *E. histolytica*, se ha usado LysoTracker red para marcar endosomas con pH ácido. Al realizar los ensayos de co-localización entre este marcador y EhVps32, encontramos que la proteína se une exclusivamente a fagosomas con pH ácido (Fig. 33). Además observamos que a tiempos donde la fagocitosis de eritrocitos ya se encuentra más avanzada, EhVps32 no se encuentra rodeando estos fagosomas. Con estos resultados concluimos que EhVps32 y posiblemente el resto de la maquinaria ESCRT-III no participa en tiempos tempranos ni tardíos de la fagocitosis, sino en una etapa intermedia de este evento, lo cual coincide con la formación de MVBs en la endocitosis descrita en eucariontes (Huotari y Helenius, 2011).

Durante los ensayos de eritrofagocitosis, también encontramos que EhVps24 y EhVps2, migran hacia el núcleo a los 60 min de iniciada la ingestión de eritrocitos (Figs. 23 y 25, 60 min). Es posible que estas proteínas sean reclutadas al núcleo para cumplir una función adicional; sin embargo, es necesario realizar más experimentos que nos permitan dilucidar la función de estas proteínas en el núcleo. Algunos estudios demuestran que miembros de la maquinaria ESCRT-III son necesarios para mantener la compartimentalización nuclear que es mediada por los complejos de poro nuclear (NPC por sus siglas en inglés). En este caso, la

maquinaria ESCRT-III se ensambla en el sitio donde se encuentran NPC deficientes y los elimina del sistema, manteniendo la correcta función de estas estructuras (Webster et al., 2014). Es posible que las proteínas de la ameba puedan estar cumpliendo una función similar, pero es necesario realizar ensayos adicionales para verificar esta hipótesis.

Debido a la naturaleza transitoria de la maquinaria ESCRT-III en la membrana del endosoma, resulta difícil purificar el complejo y estudiar esta maquinaria *in vivo*. Sin embargo, la existencia de modelos membranales permite la investigación de esta maquinaria *in vitro*. Previamente, Wollert et al, empleó el modelo de vesículas gigantes unilamelares (GUVs) para estudiar la maquinaria ESCRT-III de *S. cerevisiae* (Wollert et al., 2009). Nosotros, en colaboración con la Dra. Rumiana Dimova del departamento de Teoría y Biosistemas del Instituto Max Planck de Coloides e Interfaces, analizamos el comportamiento de las proteínas ESCRT-III de *E. histolytica* en el modelo de GUVs.

Las rutas de reclutamiento de ESCRT-III en membranas, descritas hasta el momento, requieren de señales activadoras y el ensamblaje de proteínas previo a la incorporación de la maquinaria ESCRT-III (Im et al., 2009). Para simplificar nuestro sistema y con el conocimiento de que el subcomplejo-I formado por Vps20 y Vps32 es el único que se encuentra en contacto directo con la membrana del endosoma (Winter y Hauser, 2006), generamos dos proteínas truncas EhVps20(1-173) (Fig. 16, panel E) y EhVps32(1-165) (Fig. 16, panel A), las cuales carecen del extremo C-terminal que, como se explicó anteriormente, corresponde al sitio responsable de la autoinhibición de la proteína (Bajorek et al., 2009). Al remover la última alfa hélice, obtenemos proteínas cuyo sitio de unión se encuentra expuesto de forma basal y evita la necesidad de utilizar señales activadoras extras.

Empleando las proteínas truncas, evaluamos la capacidad de unión de estas proteínas activas hacia membranas lipídicas. Para este experimento generamos GUVs con la composición reportada previamente por Wollert, en la cual están presentes dos lípidos con carga negativa: POPS (10 mol%) y PI(3)P (3 mol%) que sirven como sitio de unión de las proteínas, ya que al poseer aminoácidos con carga positiva, se unen electrostáticamente a lípidos cargados negativamente. Las GUVs generadas fueron marcadas con un lípido unido a Texas-Red de tal forma que pudiéramos visualizar las vesículas en el canal rojo. Por otro lado, las proteínas EhVps20(1-173) y EhVps32(1-165) así como formas completas de estas proteínas,

fueron marcadas con el fluorocromo Alexa 488 que observamos en el canal verde. La capacidad de unión fue cuantificada en función a la co-localización entre ambos fluorocromos. Después de incubar GUVs con cada una de las proteínas, encontramos que en ambos casos, hay mayor colocación entre proteína y membrana cuando se trabaja con las formas truncas de las proteínas (15-45%) comparado a la forma completa de las mismas (3-5%) (Fig. 29). Asimismo, observamos que la mejor unión (45%) se presenta cuando se incuban las GUVs con EhVps20(1-173) en comparación con EhVps32(1-165) (15%), lo cual sugiere una mayor especificidad de EhVps20 hacia las membranas (Fig. 29). Por tal razón el resto de los experimentos en el modelo de GUVs fue realizado utilizando EhVps20(1-173) como iniciador y desencadenante de la unión de la maquinaria ESCRT-III hacia la membrana de la vesícula.

A continuación, procedimos a realizar la reconstitución de la maquinaria ESCRT-III en el mismo modelo, de una forma similar a la descrita por Wollert, en la cual se incuban GUVs, con cada una de las proteínas en el orden descrito en la literatura (Vps20-Vps32-Vps24-Vps2) dejando 5 min de incubación entre la adición de cada proteína (Wollert et al., 2009). Mediante este ensayo, encontramos que EhVps32 y EhVps20(1-173) son suficientes para generar invaginaciones en la membrana, formando pequeñas vesículas que aún se encuentran unidas a la membrana externa. Estas vesículas son liberadas hacia el interior de la GUV formando las vesículas intraluminales (ILVs) una vez que se adiciona EhVps24, fenómeno que fue observado en al menos 64% de las vesículas observadas. La última proteína incluida, EhVps2, parece no ser necesaria para la formación de vesículas intraluminales y en cambio pudiese estar controlando el tamaño de la vesícula intraluminal generada al igual que sucede en humanos {Henne, 2012 #555}, de igual manera el porcentaje de GUVs con ILVs cuantificado para esta última condición fue 71%, lo que confirma que no hay diferencia significativa en la formación de ILVs pero sí en el tamaño de las ILVs generadas (Fig. 30, panel B). Debido a este resultado, en ensayos posteriores únicamente se emplearon EhVps20(1-173), EhVps32 y EhVps24, al cual denominamos maquinaria ESCRT-III mínima. Asimismo, realizamos ensayos en los cuales se omitió la adición de EhVps20(1-173) o se sustituyó por EhVps32(1-165) y no observamos la formación de ILVs, lo cual indica que la función de ambas proteínas no es redundante (Fig. 30).

Para continuar con la caracterización de la maquinaria ESCRT-III, realizamos ensayos para analizar su especificidad hacia lípidos cargados negativamente, los cuales están presentes en endosomas y la cara interna de la membrana plasmática, sitio de acción de la maquinaria ESCRT-III (Bissig y Gruenberg, 2013). Los dominios de unión a fosfolípidos que están presentes en proteínas que interaccionan transitoriamente con membranas, poseen una afinidad relativamente baja para asegurar cinéticas rápidas de asociación-disociación. Estos dominios pueden ser de reconocimiento específico de lípidos raros como fosfoinosítidos o a través de reconocimiento específico de propiedades fisicoquímicas de la bicapa tales como grado de curvatura, carga o empaquetamiento lipídico (Bissig y Gruenberg, 2013). En el caso de los miembros de la maquinaria ESCRT-III, el reconocimiento se lleva a cabo por propiedades fisicoquímicas de la membrana, ya que se une a membranas altamente curvadas y con carga negativa. Por esta razón, realizamos un ensayo en el cual generamos GUVs con 100 mol% de DOPC, un lípido sin carga, o bien 100 mol% de DOPG, lípido cargado negativamente, y probamos la maquinaria ESCRT-III mínima. Como era de esperarse, únicamente en las vesículas formadas por DOPG se observó unión de EhVps20(1-173) y la posterior formación de ILVs, no así en las GUVs formadas con DOPC (Fig. 31, paneles A y B). Para delimitar un poco más el tipo de lípido al que se unen las proteínas de la maquinaria ESCRT-III, generamos GUVs con tres tipos de lípidos cargados negativamente: PI(3)P, DOPS y DOPG, los resultados demostraron que la maquinaria ESCRT-III presenta mayor actividad en las vesículas que contienen DOPS (65% de formación de ILVs), lo cual coincide con lo reportado en la literatura, ya que la maquinaria ESCRT-III se une preferencialmente a DOPS (Fig. 31, panel C). Mapeos de alta resolución mediante microscopía electrónica de transmisión revelaron que fosfatidilserina (PS) no se encuentra homogéneamente distribuida en la membrana plasmática, sino localizada en nanoclusters, los cuales se asocian a colesterol y caveolas ricas en esfingomielina (Farin, 2011). De forma interesante, colesterol y esfingomielina también se encuentran asociadas a PS en endosomas tempranos y de reciclaje por lo que se puede especular que PS se compartimentaliza preferencialmente con membranas ricas en colesterol *in vivo*, las cuales son destinadas al reciclaje celular. Esto resulta de gran importancia, ya que las poblaciones de proteínas del complejo ESCRT-III deben mantenerse constantes, de tal forma, que al asociarse a lípidos cuyo destino

es el reciclaje y no la degradación, podría contribuir al mantenimiento del “pool” de proteínas en el parásito.

En sistemas celulares, el colesterol es capaz de modular las propiedades fisicoquímicas de las membranas celulares, tal es el caso de la organización lateral de la membrana. De tal manera, mezclas de fosfatidilcolinas saturadas y esfingomielinas forman la denominada fase líquida ordenada (Lo), mientras que cuando se une a fosfatidilcolinas insaturadas, se forma la fase líquida desordenada (Ld). Al analizar el comportamiento de la maquinaria ESCRT-III en membranas con esfingomielina, encontramos que la adición de EhVps32 ocasionaba la separación de fase en estas vesículas de una forma dependiente a la cantidad de EhVps32 adicionada (Fig. 32). Además, encontramos que el subcomplejo formado por EhVps20(1-173)-EhVps32 se localizaba en el dominio Ld de la membrana, ya que el fluorocromo incluido en la mezcla de lípidos se encuentra asociado a fosfatidiletanolamina (PE), el cual se sabe migra hacia zonas Ld. Este resultado resulta de gran importancia, ya que la generación de la separación de fase puede inducir tensión lineal en la membrana, que a valores suficientemente grandes, pueden favorecer la invaginación y escisión de la membrana, procesos mediados por la maquinaria ESCRT-III (Boura et al., 2012).

A pesar de que la separación de fase favorezca la invaginación de la membrana, la tensión que se genera por este fenómeno no es suficiente para liberar las vesículas intraluminales que observamos. Para ello, es necesario que las proteínas se unan a la membrana y polimericen de tal manera que se lleve a cabo el estrechamiento del cuello de la vesícula naciente y la escisión de la misma. Mediante ensayos de tinción negativa, en los que utilizamos las proteínas EhVps32 y EhVps24 recombinantes purificadas y utilizando microscopía electrónica de transmisión, observamos que ambas proteínas son capaces de polimerizar en forma de anillos y cuerdas, propiedad que facilitaría la formación de vesículas intraluminales (Fig. 26).

Finalmente, para evaluar la participación de la maquinaria ESCRT-III en la fagocitosis del parásito, llevamos a cabo la sobre-expresión y el silenciamiento de EhVps32, la proteína más abundante de la maquinaria ESCRT-III. En ambos casos, la cantidad de proteína EhVps32 fue cuantificada mediante ensayos de *Western blot* en los que se utilizó a la proteína actina para normalizar los valores (Figs. 35 y 36, paneles A y B).

Durante la sobre-expresión, el análisis densitométrico reveló un aumento de ~60% de proteína EhVps32 en trofozoítos transfectados con *pNEO-EhVps32-HA* en comparación con los transfectados con el vector vacío o bien con trofozoítos *wild type* (Fig. 35, panel B). Un análisis ultra-estructural de estos trofozoítos, reveló que, en aquellos donde se encontraba sobre-expresada la proteína EhVps32, aparecían cambios morfológicos en el citoplasma de trofozoítos (Fig. 28, panel B). Más aún encontramos estructuras multilamelares en forma de círculos concéntricos (Fig. 28, panel C) similares a las reportadas en células COS7 donde se sobre-expresó CHMP4B, homólogo de EhVps32 (Hanson et al., 2008). Acorde a este resultado, al analizar trofozoítos que sobre-expresan EhVps32 mediante microscopía electrónica de barrido, encontramos dos alteraciones morfológicas al compararlos con trofozoítos transfectados únicamente con el vector vacío. En primer lugar, encontramos proyecciones de la membrana citoplásmica (Fig. 28, panel F), y en segundo, observamos la aparición de orificios en la membrana del trofozoíto con un tamaño aproximado de 0.3-0.7 μm (Fig. 28, panel E), que superan al tamaño de los orificios propios de la endocitosis basal de trofozoítos transfectados con el vector vacío (Fig. 28, panel G). A partir de estas imágenes, concluimos que la proteína EhVps32 al estar sobre-expresada, carece de regulación y se une a membranas negativas, incluyendo la cara interna de la membrana plasmática, ocasionando este tipo de alteraciones morfológicas, al igual que sucede al sobre-expresar CHMP4B en células COS7 (Hanson et al., 2008).

En el ensayo de eritrofagocitosis, encontramos que en aquéllos trofozoítos donde se sobre-expresa EhVps32, la ingesta de eritrocitos aumenta en comparación con trofozoítos transfectados con el vector vacío. El aumento observado fue de ~10%, ~40% y 60% a los 2, 5 y 30 min, respectivamente (Fig. 35, panel C).

Por otro lado, al realizar el silenciamiento, observamos un abatimiento de ~80% de la proteína EhVps32 (Fig. 36, paneles A y B) comparado con la cepa G3, utilizada como control. En este caso, al realizar los ensayos de eritrofagocitosis, encontramos que la ingesta de eritrocitos está prácticamente anulada (~1-5%) a los 2 y 5 min de iniciada la eritrofagocitosis (Fig. 36, panel C). Por otro lado, a los 30 min, observamos sólo una ingesta del 20% en comparación con la cepa control (Fig. 36, panel C). Este resultado junto con el de la sobre-expresión nos indica que la proteína EhVps32, y posiblemente el resto de la maquinaria ESCRT-III resulta fundamental para el proceso de fagocitosis de *E. histolytica*.

A pesar de que se ha descrito que la maquinaria ESCRT-III participa en endocitosis mediada por receptores {Hurley, 2008 #92}, este trabajo constituye la primera evidencia de su participación durante la fagocitosis. De igual manera también es la primera vez que se describe la presencia y función de la maquinaria ESCRT-III en parásitos, lo cual sugiere al igual que las evidencias en otros organismos, que la maquinaria ESCRT se encuentra conservada en sus funciones a lo largo de la línea eucarionte.

9. Conclusiones

Durante este proyecto expresamos y purificamos a las proteínas recombinantes EhVps2, EhVps20 y EhVps24 a partir de las cuales realizamos anticuerpos policlonales en diferentes especies animales. Con el uso de estos anticuerpos demostramos la expresión de EhVps2, EhVps20 y EhVps24 en extractos amibianos con pesos moleculares de 28, 39 y 31 kDa, respectivamente. También localizamos a cada una de estas proteínas en estructuras punteadas en el citoplasma de trofozoítos mantenidos en cultivo. A la proteína EhVps20 también la encontramos en la cara interna de la membrana celular.

Las proteínas purificadas, así como EhVps32 obtenida durante mi proyecto de maestría, fueron empleadas para llevar a cabo la reconstitución de la maquinaria ESCRT-III en el modelo de vesículas gigantes unilamelares (GUVs). Para estos ensayos utilizamos la forma activa de EhVps20, denominada EhVps20(1-173). En el modelo de GUVs, EhVps20(1-173) se une a membranas cargadas negativamente e inicia el reclutamiento del resto de los miembros del complejo ESCRT-III, a continuación, EhVps32 genera invaginaciones en la membrana, ayudada por la tensión lineal que se genera por la separación de fase que ocasiona en la membrana lipídica y finalmente, EhVps24 cataliza la escisión de la vesícula intraluminal. En este modelo, EhVps2 no es indispensable para la formación de ILVs.

Además, encontramos que durante la eritrofagocitosis, las proteínas de la maquinaria ESCRT-III de *E. histolytica* presenta cambios en su localización normal, especialmente a tiempos intermedios de fagocitosis (5-45 min). Además observamos que EhVps32, la proteína más abundante de la maquinaria, co-localiza con lysotracker, delimitando la función del ESCRT-III en fagosomas de naturaleza ácida. Asimismo, observamos co-localización entre EhVps32 y EhADH desde tiempos tempranos de fagocitosis (5 min), sugiriendo que el reclutamiento de ESCRT-III en *E. histolytica* se puede llevar a cabo mediante una ruta alternativa que omita la necesidad de los complejos ESCRT-0, I y II.

Finalmente, observamos que la sobre-expresión y el silenciamiento de EhVps32 aumenta o disminuye, respectivamente, el número de eritrocitos ingeridos durante la eritrofagocitosis, lo cual indica que esta proteína y posiblemente el resto de la maquinaria ESCRT-III resultan fundamentales para la fagocitosis en *E. histolytica*.

10. PERSPECTIVAS

Este proyecto de doctorado generó el siguiente trabajo a futuro:

- Co-localización de todas las proteínas del complejo ESCRT-III (EhVps2, EhVps20, EhVps24 y EhVps32) de *E. histolytica* durante la eritrofagocitosis utilizando microscopía confocal.
- Evaluación de la participación de las proteínas EhVps2, EhVps20 y EhVps24 en la virulencia *in vitro* de *E. histolytica*, lo cual puede realizarse a través de:
 - Silenciamiento de las proteínas EhVps2, EhVps20 ó EhVps24.
 - Sobre-expresión de una forma mutada o deletada en el extremo N-terminal de las proteínas EhVps2, EhVps20 ó EhVps24, sitio responsable de la unión a lípidos y otras proteínas.
- Analizar la dinámica de la polimerización del complejo ESCRT-III utilizando diferentes modelos de biomembranas tales como vesículas gigantes unilamelares o bicapas lipídicas soportadas.
- Utilizar el modelo de GUVs para delimitar la constante de asociación de las proteínas EhVps20 y EhVps32 hacia diferentes lípidos.
- Purificar fosfolípidos de extractos lipídicos totales de *E. histolytica* y emplearlos para generar GUVs y comparar la especificidad de las proteínas ESCRT-III de la amiba hacia lípidos amibianos en comparación con los lípidos comerciales.
- Evaluar la posible función que puedan tener las proteínas EhVps24 y EhVps2 en el núcleo de *E. histolytica*, lo cual puede conseguirse mediante:
 - Inmunoprecipitación de cromatina (ChIP), para evaluar la posible unión a factores de transcripción en el ADN.
 - Microscopía electrónica de transmisión (MET) para delimitar la localización nuclear o perinuclear de las proteínas.
 - Purificación de núcleos de los trofozoítos y evaluar la unión de EhVps24 y EhVps2 a otras proteínas mediante pull-down.

11. BIBLIOGRAFÍA

Allen, A., Hutton, D. A. and Pearson, J. P. (1998). The MUC2 gene product: a human intestinal mucin. *Int J Biochem Cell Biol* **30**, 797-801.

Angelova, M. I. and Dimitrov, D. S. (1986). Liposome Electroformation. *Faraday Discussions* **81**, 303-+.

Ankri, S., Stolarsky, T., Bracha, R., Padilla-Vaca, F. and Mirelman, D. (1999). Antisense inhibition of expression of cysteine proteinases affects *Entamoeba histolytica*-induced formation of liver abscess in hamsters. *Infect Immun* **67**, 421-2.

Arroyo, R. and Orozco, E. (1987). Localization and identification of an *Entamoeba histolytica* adhesin. *Mol Biochem Parasitol* **23**, 151-8.

Ashrafi, K., Farazi, T. A. and Gordon, J. I. (1998). A role for *Saccharomyces cerevisiae* fatty acid activation protein 4 in regulating protein N-myristoylation during entry into stationary phase. *J Biol Chem* **273**, 25864-74.

Avalos-Padilla, Y. (2012). Caracterización de la proteína EhVps32 y su participación durante la eritrofagocitosis en *Entamoeba histolytica*. In *Infectómica y Patogénesis molecular*, vol. Maestría, pp. 105. D. F.: CINVESTAV.

Avalos-Padilla, Y., Betanzos, A., Javier-Reyna, R., Garcia-Rivera, G., Chavez-Munguia, B., Lagunes-Guillen, A., Ortega, J. and Orozco, E. (2015). EhVps32 Is a Vacuole-Associated Protein Involved in Pinocytosis and Phagocytosis of *Entamoeba histolytica*. *PLoS Pathog* **11**, e1005079.

Babst, M. (2005). A protein's final ESCRT. *Traffic* **6**, 2-9.

Babst, M., Katzmann, D. J., Estepa-Sabal, E. J., Meerloo, T. and Emr, S. D. (2002a). Escrt-III: an endosome-associated heterooligomeric protein complex required for mvb sorting. *Dev Cell* **3**, 271-82.

Babst, M., Katzmann, D. J., Snyder, W. B., Wendland, B. and Emr, S. D. (2002b). Endosome-associated complex, ESCRT-II, recruits transport machinery for protein sorting at the multivesicular body. *Dev Cell* **3**, 283-9.

Babst, M., Wendland, B., Estepa, E. J. and Emr, S. D. (1998). The Vps4p AAA ATPase regulates membrane association of a Vps protein complex required for normal endosome function. *EMBO J* **17**, 2982-93.

Bacia, K., Futai, E., Prinz, S., Meister, A., Daum, S., Glatte, D., Briggs, J. A. and Schekman, R. (2011). Multibudded tubules formed by COPII on artificial liposomes. *Sci Rep* **1**, 17.

Bailey, G. B., Nudelman, E. D., Day, D. B., Gilmour, J. R. and Harper, C. F. (1990). Use of non-cellular models to study the interaction of *E. histolytica* with mammalian cells. *Arch Invest Med (Mex)* **21 Suppl 1**, 85-9.

Bajorek, M., Schubert, H. L., McCullough, J., Langelier, C., Eckert, D. M., Stubblefield, W. M., Uter, N. T., Myszka, D. G., Hill, C. P. and Sundquist, W. I. (2009). Structural basis for ESCRT-III protein autoinhibition. *Nat Struct Mol Biol* **16**, 754-62.

Bañuelos, C., Garcia-Rivera, G., Lopez-Reyes, I., Mendoza, L., Gonzalez-Robles, A., Herranz, S., Vincent, O. and Orozco, E. (2012). EhADH112 is a Bro1 domain-containing protein involved in the *Entamoeba histolytica* multivesicular bodies pathway. *J Biomed Biotechnol* **2012**, 657942.

Bañuelos, C., García-Rivera, G., Lopez-Reyes, I. and Orozco, E. (2005). Functional characterization of EhADH112: an *Entamoeba histolytica* Bro1 domain-containing protein. *Exp Parasitol* **110**, 292-7.

Bañuelos, C., García-Rivera, G., Mendoza, L., González-Robles, A., López-Reyes, I., Herranz, S., Vincent, O. and Orozco, E. (2011). EhADH is a Bro1 domain-containing protein involved in the *Entamoeba histolytica* endocytic pathway. In *Journal of Biochemistry & Cell*.

Bassereau, P. and Goud, B. (2011). Physics, biology and the right chemistry. *F1000 Biol Rep* **3**, 7.

Bishop, N., Horman, A. and Woodman, P. (2002). Mammalian class E vps proteins recognize ubiquitin and act in the removal of endosomal protein-ubiquitin conjugates. *J Cell Biol* **157**, 91-101.

- Bissig, C. and Gruenberg, J.** (2013). Lipid sorting and multivesicular endosome biogenesis. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **5**, a016816.
- Boettner, D. R., Huston, C. D., Linford, A. S., Buss, S. N., Houpt, E., Sherman, N. E. and Petri, W. A., Jr.** (2008). Entamoeba histolytica phagocytosis of human erythrocytes involves PATMK, a member of the transmembrane kinase family. *PLoS Pathog* **4**, e8.
- Boura, E., Ivanov, V., Carlson, L. A., Mizuuchi, K. and Hurley, J. H.** (2012). Endosomal sorting complex required for transport (ESCRT) complexes induce phase-separated microdomains in supported lipid bilayers. *J Biol Chem* **287**, 28144-51.
- Bradford, M. M.** (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**, 248-54.
- Bretscher, M. S. and Aguado-Velasco, C.** (1998). Membrane traffic during cell locomotion. *Curr Opin Cell Biol* **10**, 537-41.
- Bruchhaus, I., Loftus, B. J., Hall, N. and Tannich, E.** (2003). The intestinal protozoan parasite Entamoeba histolytica contains 20 cysteine protease genes, of which only a small subset is expressed during in vitro cultivation. *Eukaryot Cell* **2**, 501-9.
- Cabrera, M. and Ungermann, C.** (2010). Guiding endosomal maturation. *Cell* **141**, 404-6.
- Carlton, J. G. and Martin-Serrano, J.** (2007). Parallels between cytokinesis and retroviral budding: a role for the ESCRT machinery. *Science* **316**, 1908-12.
- Crane, J. M. and Tamm, L. K.** (2004). Role of cholesterol in the formation and nature of lipid rafts in planar and spherical model membranes. *Biophys J* **86**, 2965-79.
- Curtiss, M., Jones, C. and Babst, M.** (2007). Efficient cargo sorting by ESCRT-I and the subsequent release of ESCRT-I from multivesicular bodies requires the subunit Mvb12. *Mol Biol Cell* **18**, 636-45.
- Chavez-Munguía, B., Espinosa-Cantellano, M., Castanon, G. and Martinez-Palomo, A.** (2000). Ultrastructural evidence of smooth endoplasmic reticulum and golgi-like elements in Entamoeba histolytica and Entamoeba dispar. *Arch Med Res* **31**, S165-7.
- Chomczynski, P. and Sacchi, N.** (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* **162**, 156-9.
- Devaux, P. F.** (1991). Static and dynamic lipid asymmetry in cell membranes. *Biochemistry* **30**, 1163-73.
- Diamond, L. S., Harlow, D. R. and Cunnick, C. C.** (1978). A new medium for the axenic cultivation of Entamoeba histolytica and other Entamoeba. *Trans R Soc Trop Med Hyg* **72**, 431-2.
- Dimaano, C., Jones, C. B., Hanono, A., Curtiss, M. and Babst, M.** (2008). Ist1 regulates Vps4 localization and assembly. *Mol Biol Cell* **19**, 465-74.
- Dimova, R., Aranda, S., Bezlyepkina, N., Nikolov, V., Riske, K. A. and Lipowsky, R.** (2006). A practical guide to giant vesicles. Probing the membrane nanoregime via optical microscopy. *J Phys Condens Matter* **18**, S1151-76.
- Dores, M. R., Chen, B., Lin, H., Soh, U. J., Paing, M. M., Montagne, W. A., Meerloo, T. and Trejo, J.** (2012). ALIX binds a YPX(3)L motif of the GPCR PAR1 and mediates ubiquitin-independent ESCRT-III/MVB sorting. *J Cell Biol* **197**, 407-19.
- Faust, D. M., Markiewicz, J. M., Santi-Rocca, J. and Guillen, N.** (2011). New insights into host-pathogen interactions during Entamoeba histolytica liver infection. *European Journal of Microbiology and Immunology* **1**, 10-18.
- Fenz, S. F. and Sengupta, K.** (2012). Giant vesicles as cell models. *Integr Biol (Camb)* **4**, 982-95.
- Field, M. C. and Dacks, J. B.** (2009). First and last ancestors: reconstructing evolution of the endomembrane system with ESCRTs, vesicle coat proteins, and nuclear pore complexes. *Curr Opin Cell Biol* **21**, 4-13.
- Flanagan, R. S., Jaumouille, V. and Grinstein, S.** (2012). The cell biology of phagocytosis. *Annu Rev Pathol* **7**, 61-98.
- Flores-Soto, E., Azuara-Liceaga, E., Lopez-Camarillo, C. and Orozco, E.** (2005). The Entamoeba histolytica Ehcp112 gene has a distal and weak promoter. *Exp Parasitol* **110**, 286-91.

- Gagescu, R., Gruenberg, J. and Smythe, E.** (2000). Membrane dynamics in endocytosis: structure--function relationship. *Traffic* **1**, 84-8.
- García-Rivera, G., Rodríguez, M. A., Ocadiz, R., Martínez-Lopez, M. C., Arroyo, R., Gonzalez-Robles, A. and Orozco, E.** (1999). Entamoeba histolytica : a novel cysteine protease and an adhesin form the 112 kDa surface protein. *Mol Microbiol* **33**, 556-68.
- Ghosh, S. K., Field, J., Frisardi, M., Rosenthal, B., Mai, Z., Rogers, R. and Samuelson, J.** (1999). Chitinase secretion by encysting Entamoeba invadens and transfected Entamoeba histolytica trophozoites: localization of secretory vesicles, endoplasmic reticulum, and Golgi apparatus. *Infect Immun* **67**, 3073-81.
- Godbold, G. D. and Mann, B. J.** (1998). Involvement of the actin cytoskeleton and p21rho-family GTPases in the pathogenesis of the human protozoan parasite Entamoeba histolytica. *Braz J Med Biol Res* **31**, 1049-58.
- Gómez, J. C., Cortés, J. A., Cuervo, S. I. and López, M. C.** (2007). Amibiasis intestinal. *Infectio* **11**, 36-45.
- González-Ruiz, A.** (1990). Revisión del estado actual del diagnóstico diferencial de las amibas en México. *Salud Pública de México* **32**, 589-596.
- Gruenberg, J. and Stenmark, H.** (2004). The biogenesis of multivesicular endosomes. *Nat Rev Mol Cell Biol* **5**, 317-23.
- Guerrant, R. L., Brush, J., Ravdin, J. I., Sullivan, J. A. and Mandell, G. L.** (1981). Interaction between Entamoeba histolytica and human polymorphonuclear neutrophils. *J Infect Dis* **143**, 83-93.
- Guillen, N., Boquet, P. and Sansonetti, P.** (1998). The small GTP-binding protein RacG regulates uroid formation in the protozoan parasite Entamoeba histolytica. *J Cell Sci* **111 (Pt 12)**, 1729-39.
- Guizetti, J., Schermelleh, L., Mantler, J., Maar, S., Poser, I., Leonhardt, H., Muller-Reichert, T. and Gerlich, D. W.** (2011). Cortical constriction during abscission involves helices of ESCRT-III-dependent filaments. *Science* **331**, 1616-20.
- Haigler, H. T., McKanna, J. A. and Cohen, S.** (1979). Direct visualization of the binding and internalization of a ferritin conjugate of epidermal growth factor in human carcinoma cells A-431. *J Cell Biol* **81**, 382-95.
- Hanson, P. I. and Cashikar, A.** (2012). Multivesicular body morphogenesis. *Annu Rev Cell Dev Biol* **28**, 337-62.
- Hanson, P. I., Roth, R., Lin, Y. and Heuser, J. E.** (2008). Plasma membrane deformation by circular arrays of ESCRT-III protein filaments. *J Cell Biol* **180**, 389-402.
- Haque, R., Huston, C. D., Hughes, M., Houpt, E. and Petri, W. A., Jr.** (2003). Amebiasis. *N Engl J Med* **348**, 1565-73.
- Henne, W. M., Buchkovich, N. J. and Emr, S. D.** (2011). The ESCRT pathway. *Dev Cell* **21**, 77-91.
- Henne, W. M., Stenmark, H. and Emr, S. D.** (2013). Molecular mechanisms of the membrane sculpting ESCRT pathway. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **5**.
- Hou, Y., Mortimer, L. and Chadee, K.** (2010). Entamoeba histolytica cysteine proteinase 5 binds integrin on colonic cells and stimulates NFkappaB-mediated pro-inflammatory responses. *J Biol Chem* **285**, 35497-504.
- Huotari, J. and Helenius, A.** (2011). Endosome maturation. *EMBO J* **30**, 3481-500.
- Hurley, J. H.** (2008). ESCRT complexes and the biogenesis of multivesicular bodies. *Curr Opin Cell Biol* **20**, 4-11.
- Hurley, J. H. and Emr, S. D.** (2006). The ESCRT complexes: structure and mechanism of a membrane-trafficking network. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* **35**, 277-98.
- Im, Y. J., Wollert, T., Boura, E. and Hurley, J. H.** (2009). Structure and function of the ESCRT-II-III interface in multivesicular body biogenesis. *Dev Cell* **17**, 234-43.
- Irmer, H., Tillack, M., Biller, L., Handal, G., Leippe, M., Roeder, T., Tannich, E. and Bruchhaus, I.** (2009). Major cysteine peptidases of Entamoeba histolytica are required for aggregation and

digestion of erythrocytes but are dispensable for phagocytosis and cytopathogenicity. *Mol Microbiol* **72**, 658-67.

Iwaki, T., Onishi, M., Ikeuchi, M., Kita, A., Sugiura, R., Giga-Hama, Y., Fukui, Y. and Takegawa, K. (2007). Essential roles of class E Vps proteins for sorting into multivesicular bodies in *Schizosaccharomyces pombe*. *Microbiology* **153**, 2753-64.

Katoh, K., Shibata, H., Hatta, K. and Maki, M. (2004). CHMP4b is a major binding partner of the ALG-2-interacting protein Alix among the three CHMP4 isoforms. *Arch Biochem Biophys* **421**, 159-65.

Katzmann, D. J., Odorizzi, G. and Emr, S. D. (2002). Receptor downregulation and multivesicular-body sorting. *Nat Rev Mol Cell Biol* **3**, 893-905.

Keene, W. E., Hidalgo, M. E., Orozco, E. and McKerrow, J. H. (1990). Entamoeba histolytica: correlation of the cytopathic effect of virulent trophozoites with secretion of a cysteine proteinase. *Exp Parasitol* **71**, 199-206.

Kobayashi, T., Stang, E., Fang, K. S., de Moerloose, P., Parton, R. G. and Gruenberg, J. (1998). A lipid associated with the antiphospholipid syndrome regulates endosome structure and function. *Nature* **392**, 193-7.

Kobiler, D. and Mirelman, D. (1980). Lectin activity in Entamoeba histolytica trophozoites. *Infect Immun* **29**, 221-5.

Koumandou, V. L., Wickstead, B., Ginger, M. L., van der Giezen, M., Dacks, J. B. and Field, M. C. (2013). Molecular paleontology and complexity in the last eukaryotic common ancestor. *Crit Rev Biochem Mol Biol* **48**, 373-96.

Labruyere, E., Zimmer, C., Galy, V., Olivo-Marin, J. C. and Guillen, N. (2003). EhPAK, a member of the p21-activated kinase family, is involved in the control of Entamoeba histolytica migration and phagocytosis. *J Cell Sci* **116**, 61-71.

Le Blanc, I., Luyet, P. P., Pons, V., Ferguson, C., Emans, N., Petiot, A., Mayran, N., Demaurex, N., Faure, J., Sadoul, R. et al. (2005). Endosome-to-cytosol transport of viral nucleocapsids. *Nat Cell Biol* **7**, 653-64.

Leippe, M. (1992). Membrane perforation by Entamoeba histolytica: structural implications derived from the sequence of the pore-forming peptide. *Arch Med Res* **23**, 35-7.

Lemmon, S. K. and Traub, L. M. (2000). Sorting in the endosomal system in yeast and animal cells. *Curr Opin Cell Biol* **12**, 457-66.

Leung, K. F., Dacks, J. B. and Field, M. C. (2008). Evolution of the multivesicular body ESCRT machinery; retention across the eukaryotic lineage. *Traffic* **9**, 1698-716.

Lindas, A. C., Karlsson, E. A., Lindgren, M. T., Ettema, T. J. and Bernander, R. (2008). A unique cell division machinery in the Archaea. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 18942-6.

Long-Krug, S. A., Fischer, K. J., Hysmith, R. M. and Ravdin, J. I. (1985). Phospholipase A enzymes of Entamoeba histolytica: description and subcellular localization. *J Infect Dis* **152**, 536-41.

López-Reyes, I., Bañuelos, C., Betanzos, A. and Orozco, E. (2011). A bioinformatical approach to study the endosomal sorting complex required for transport (ESCRT) machinery in protozoan parasites: the *Entamoeba histolytica* case.

López-Reyes, I., García-Rivera, G., Bañuelos, C., Herranz, S., Vincent, O., López-Camarillo, C., Marchat, L. A. and Orozco, E. (2010). Detection of the Endosomal Sorting Complex Required for Transport in Entamoeba histolytica and Characterization of the EhVps4 Protein. *J Biomed Biotechnol* **2010**, 890674.

Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* **193**, 265-75.

Luaces, A. L. and Barrett, A. J. (1988). Affinity purification and biochemical characterization of histolysin, the major cysteine proteinase of Entamoeba histolytica. *Biochem J* **250**, 903-9.

Luhtala, N. and Odorizzi, G. (2004). Bro1 coordinates deubiquitination in the multivesicular body pathway by recruiting Doa4 to endosomes. *J Cell Biol* **166**, 717-29.

Mahon, C. and Manuselis, G. (2000). Textbook of Diagnostic Microbiology: Saunders.

- Marie, C. and Petri, W. A., Jr.** (2014). Regulation of virulence of *Entamoeba histolytica*. *Annu Rev Microbiol* **68**, 493-520.
- Marinets, A., Zhang, T., Guillen, N., Gounon, P., Bohle, B., Vollmann, U., Scheiner, O., Wiedermann, G., Stanley, S. L. and Duchene, M.** (1997). Protection against invasive amebiasis by a single monoclonal antibody directed against a lipophosphoglycan antigen localized on the surface of *Entamoeba histolytica*. *J Exp Med* **186**, 1557-65.
- Marion, S., Laurent, C. and Guillen, N.** (2005). Signalization and cytoskeleton activity through myosin IB during the early steps of phagocytosis in *Entamoeba histolytica*: a proteomic approach. *Cell Microbiol* **7**, 1504-18.
- Marquay Markiewicz, J., Syan, S., Hon, C. C., Weber, C., Faust, D. and Guillen, N.** (2011). A proteomic and cellular analysis of uropods in the pathogen *Entamoeba histolytica*. *PLoS Negl Trop Dis* **5**, e1002.
- Martín-Serrano, J., Yarovoy, A., Perez-Caballero, D. and Bieniasz, P. D.** (2003). Divergent retroviral late-budding domains recruit vacuolar protein sorting factors by using alternative adaptor proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 12414-9.
- Martinelli, N., Hartlieb, B., Usami, Y., Sabin, C., Dordor, A., Miguët, N., Avilov, S. V., Ribeiro, E. A., Jr., Gottlinger, H. and Weissenhorn, W.** (2012). CC2D1A is a regulator of ESCRT-III CHMP4B. *J Mol Biol* **419**, 75-88.
- Martínez-Palomo, A.** (1993). Parasitic amebas of the intestinal tract. In *Parasitic protozoa*, (eds J. P. Kreier and J. R. Baker), pp. 256. New York: Academic Press.
- Matsuo, H., Chevallier, J., Mayran, N., Le Blanc, I., Ferguson, C., Faure, J., Blanc, N. S., Matile, S., Dubochet, J., Sadoul, R. et al.** (2004). Role of LBPA and Alix in multivesicular liposome formation and endosome organization. *Science* **303**, 531-4.
- McCullough, J., Fisher, R. D., Whitby, F. G., Sundquist, W. I. and Hill, C. P.** (2008). ALIX-CHMP4 interactions in the human ESCRT pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 7687-91.
- Mirelman, D., Anbar, M., Nuchamowitz, Y. and Bracha, R.** (2006). Epigenetic silencing of gene expression in *Entamoeba histolytica*. *Arch Med Res* **37**, 226-33.
- Mitra, B. N., Saito-Nakano, Y., Nakada-Tsukui, K., Sato, D. and Nozaki, T.** (2007). Rab11B small GTPase regulates secretion of cysteine proteases in the enteric protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. *Cell Microbiol* **9**, 2112-25.
- Morita, E., Sandrin, V., Chung, H. Y., Morham, S. G., Gygi, S. P., Rodesch, C. K. and Sundquist, W. I.** (2007). Human ESCRT and ALIX proteins interact with proteins of the midbody and function in cytokinesis. *EMBO J* **26**, 4215-27.
- Mortimer, L. and Chadee, K.** (2010). The immunopathogenesis of *Entamoeba histolytica*. *Exp Parasitol* **126**, 366-80.
- Mueller, M., Adell, M. A. and Teis, D.** (2012). Membrane Abscission: First Glimpse at Dynamic ESCRTs. *Curr Biol* **22**, R603-5.
- Muziol, T., Pineda-Molina, E., Ravelli, R. B., Zamborlini, A., Usami, Y., Gottlinger, H. and Weissenhorn, W.** (2006). Structural basis for budding by the ESCRT-III factor CHMP3. *Dev Cell* **10**, 821-30.
- Obita, T., Saksena, S., Ghazi-Tabatabai, S., Gill, D. J., Perisic, O., Emr, S. D. and Williams, R. L.** (2007). Structural basis for selective recognition of ESCRT-III by the AAA ATPase Vps4. *Nature* **449**, 735-9.
- Ocádiz, R., Orozco, E., Carrillo, E., Quintas, L. I., Ortega-Lopez, J., Garcia-Perez, R. M., Sanchez, T., Castillo-Juarez, B. A., Garcia-Rivera, G. and Rodriguez, M. A.** (2005). EhCP112 is an *Entamoeba histolytica* secreted cysteine protease that may be involved in the parasite-virulence. *Cell Microbiol* **7**, 221-32.
- Odorizzi, G.** (2006). The multiple personalities of Alix. *J Cell Sci* **119**, 3025-32.
- Okada, M., Huston, C. D., Oue, M., Mann, B. J., Petri, W. A., Jr., Kita, K. and Nozaki, T.** (2006). Kinetics and strain variation of phagosome proteins of *Entamoeba histolytica* by proteomic analysis. *Mol Biochem Parasitol* **145**, 171-83.

- Olivos-García, A., Emma, S., Avendaño, M. N. and Pérez-Tamayo, R.** (2011). Amibiasis: mecanismos moleculares de la patogenicidad de *Entamoeba histolytica*. In *Revista de la facultad de medicina de la UNAM*, vol. 54, pp. 30. México: UNAM.
- Orozco, E., Guarneros, G., Martínez-Palomo, A. and Sanchez, T.** (1983). Entamoeba histolytica. Phagocytosis as a virulence factor. *J Exp Med* **158**, 1511-21.
- Orozco, E., Suarez, M. E. and Sanchez, T.** (1985). Differences in adhesion, phagocytosis and virulence of clones from Entamoeba histolytica, strain HM1:IMSS. *Int J Parasitol* **15**, 655-60.
- Orozco, M. E., Guarneros, G. and Martínez Palomo, A.** (1982). [Clones of E. histolytica deficient in phagocytosis present a deficiency in virulence]. *Arch Invest Med (Mex)* **13 Suppl 3**, 137-43.
- Palade, G. E.** (1955). A small particulate component of the cytoplasm. *J Biophys Biochem Cytol* **1**, 59-68.
- Palay, S. L. and Palade, G. E.** (1955). The fine structure of neurons. *J Biophys Biochem Cytol* **1**, 69-88.
- Pathema.** (2011). <http://pathema.jcvi.org/cgi-bin/Entamoeba/PathemaHomePage.cgi>.
- Peñalva, M. A., Tilburn, J., Bignell, E. and Arst, H. N., Jr.** (2008). Ambient pH gene regulation in fungi: making connections. *Trends Microbiol* **16**, 291-300.
- Percot, A. and Lafleur, M.** (2001). Direct observation of domains in model stratum corneum lipid mixtures by Raman microspectroscopy. *Biophys J* **81**, 2144-53.
- Petri, W. A., Jr., Haque, R. and Mann, B. J.** (2002). The bittersweet interface of parasite and host: lectin-carbohydrate interactions during human invasion by the parasite Entamoeba histolytica. *Annu Rev Microbiol* **56**, 39-64.
- Pfam.** (2011). [Http://www.sanger.ac.uk/resources/databases/pfam.html](http://www.sanger.ac.uk/resources/databases/pfam.html).
- Pritt, B. S. and Clark, C. G.** (2008). Amebiasis. *Mayo Clin Proc* **83**, 1154-9; quiz 1159-60.
- Ragland, B. D., Ashley, L. S., Vaux, D. L. and Petri, W. A., Jr.** (1994). Entamoeba histolytica: target cells killed by trophozoites undergo DNA fragmentation which is not blocked by Bcl-2. *Exp Parasitol* **79**, 460-7.
- Ralston, K. S. and Petri, W. A., Jr.** (2011). Tissue destruction and invasion by Entamoeba histolytica. *Trends Parasitol* **27**, 254-63.
- Ralston, K. S., Solga, M. D., Mackey-Lawrence, N. M., Somlata, Bhattacharya, A. and Petri, W. A., Jr.** (2014). Trophocytosis by Entamoeba histolytica contributes to cell killing and tissue invasion. *Nature* **508**, 526-30.
- Ravdin, J. I., Croft, B. Y. and Guerrant, R. L.** (1980). Cytopathogenic mechanisms of Entamoeba histolytica. *J Exp Med* **152**, 377-90.
- Ravdin, J. I. and Guerrant, R. L.** (1981). Role of adherence in cytopathogenic mechanisms of Entamoeba histolytica. Study with mammalian tissue culture cells and human erythrocytes. *J Clin Invest* **68**, 1305-13.
- Ravdin, J. I., Moreau, F., Sullivan, J. A., Petri, W. A., Jr. and Mandell, G. L.** (1988). Relationship of free intracellular calcium to the cytolytic activity of Entamoeba histolytica. *Infect Immun* **56**, 1505-12.
- Ravdin, J. I., Murphy, C. F., Salata, R. A., Guerrant, R. L. and Hewlett, E. L.** (1985). N-Acetyl-D-galactosamine-inhibitable adherence lectin of Entamoeba histolytica. I. Partial purification and relation to amoebic virulence in vitro. *J Infect Dis* **151**, 804-15.
- Rodríguez, M. A., Hernandez, F., Santos, L., Valdez, A. and Orozco, E.** (1989). Entamoeba histolytica: molecules involved in the target cell-parasite relationship. *Mol Biochem Parasitol* **37**, 87-99.
- Rodríguez, M. A. and Orozco, E.** (2000). Characterization of the EhRabB recombinant protein of Entamoeba histolytica. *Arch Med Res* **31**, S171-2.
- Rodríguez, M. A. and Orozco, E.** (1986). Isolation and characterization of phagocytosis- and virulence-deficient mutants of Entamoeba histolytica. *J Infect Dis* **154**, 27-32.
- Rodríguez, N., Pincet, F. and Cribier, S.** (2005). Giant vesicles formed by gentle hydration and electroformation: a comparison by fluorescence microscopy. *Colloids Surf B Biointerfaces* **42**, 125-30.

- Rosales-Encina, J. L., Meza, I., Lopez-De-Leon, A., Talamas-Rohana, P. and Rojkind, M.** (1987). Isolation of a 220-kilodalton protein with lectin properties from a virulent strain of *Entamoeba histolytica*. *J Infect Dis* **156**, 790-7.
- Royer, T. L., Gilchrist, C., Kabir, M., Arju, T., Ralston, K. S., Haque, R., Clark, C. G. and Petri, W. A., Jr.** (2012). *Entamoeba bangladeshi* nov. sp., Bangladesh. *Emerg Infect Dis* **18**, 1543-5.
- Rudge, S. A., Anderson, D. M. and Emr, S. D.** (2004). Vacuole size control: regulation of PtdIns(3,5)P₂ levels by the vacuole-associated Vac14-Fig4 complex, a PtdIns(3,5)P₂-specific phosphatase. *Mol Biol Cell* **15**, 24-36.
- Saarikangas, J., Zhao, H., Pykalainen, A., Laurinmaki, P., Mattila, P. K., Kinnunen, P. K., Butcher, S. J. and Lappalainen, P.** (2009). Molecular mechanisms of membrane deformation by I-BAR domain proteins. *Curr Biol* **19**, 95-107.
- Saito-Nakano, Y., Yasuda, T., Nakada-Tsukui, K., Leippe, M. and Nozaki, T.** (2004). Rab5-associated vacuoles play a unique role in phagocytosis of the enteric protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. *J Biol Chem* **279**, 49497-507.
- Samson, R. Y., Obita, T., Freund, S. M., Williams, R. L. and Bell, S. D.** (2008). A role for the ESCRT system in cell division in archaea. *Science* **322**, 1710-3.
- Sanchez, S. A. and Gratton, E.** (2005). Lipid-protein interactions revealed by two-photon microscopy and fluorescence correlation spectroscopy. *Acc Chem Res* **38**, 469-77.
- Seigneur, M., Mounier, J., Prevost, M. C. and Guillen, N.** (2005). A lysine- and glutamic acid-rich protein, KERP1, from *Entamoeba histolytica* binds to human enterocytes. *Cell Microbiol* **7**, 569-79.
- Sengupta, K., Hernandez-Ramirez, V. I., Rosales-Encina, J. L., Mondragon, R., Garibay-Cerdenares, O. L., Flores-Robles, D., Javier-Reyna, R., Pertuz, S. and Talamas-Rohana, P.** (2009). Physical, structural, and functional properties of the beta1 integrin-like fibronectin receptor (beta1EhFNR) in *Entamoeba histolytica*. *Infect Genet Evol* **9**, 962-70.
- Shen, Q. T., Schuh, A. L., Zheng, Y., Quinney, K., Wang, L., Hanna, M., Mitchell, J. C., Otegui, M. S., Ahlquist, P., Cui, Q. et al.** (2014). Structural analysis and modeling reveals new mechanisms governing ESCRT-III spiral filament assembly. *J Cell Biol* **206**, 763-77.
- Shiflett, S. L., Ward, D. M., Huynh, D., Vaughn, M. B., Simmons, J. C. and Kaplan, J.** (2004). Characterization of Vta1p, a class E Vps protein in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **279**, 10982-90.
- Shim, S., Kimpler, L. A. and Hanson, P. I.** (2007). Structure/function analysis of four core ESCRT-III proteins reveals common regulatory role for extreme C-terminal domain. *Traffic* **8**, 1068-79.
- Slagsvold, T., Pattni, K., Malerod, L. and Stenmark, H.** (2006). Endosomal and non-endosomal functions of ESCRT proteins. *Trends Cell Biol* **16**, 317-26.
- Smith, S. S. and Guillen, N.** (2010). Organelles and Trafficking in *Entamoeba histolytica*. In *Structures and Organelles in Pathogenic Protists*, vol. 17 (ed. W. d. Souza), pp. 323. Berlin: Springer Berlin / Heidelberg.
- Sotelo, J. R.** (1959). An electron microscope study on the cytoplasmic and nuclear components of rat primary oocytes. *Z Zellforsch Mikrosk Anat* **50**, 749-65.
- Stanley, S. L., Jr.** (2003). Amoebiasis. *Lancet* **361**, 1025-34.
- Stanley, S. L., Jr., Becker, A., Kunz-Jenkins, C., Foster, L. and Li, E.** (1990). Cloning and expression of a membrane antigen of *Entamoeba histolytica* possessing multiple tandem repeats. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**, 4976-80.
- Stottrup, B. L., Veatch, S. L. and Keller, S. L.** (2004). Nonequilibrium behavior in supported lipid membranes containing cholesterol. *Biophys J* **86**, 2942-50.
- Stuchell-Breton, M. D., Skalicky, J. J., Kieffer, C., Karren, M. A., Ghaffarian, S. and Sundquist, W. I.** (2007). ESCRT-III recognition by VPS4 ATPases. *Nature* **449**, 740-4.
- SUIVE/DGE/SALUD.** (2015). Boletín epidemiológico, vol. 32 (ed. S. d. Salud), pp. 68. Mexico city.
- Tanyuksel, M. and Petri, W. A., Jr.** (2003). Laboratory diagnosis of amebiasis. *Clin Microbiol Rev* **16**, 713-29.

- Teixeira, J. E. and Huston, C. D.** (2008). Participation of the serine-rich *Entamoeba histolytica* protein in amebic phagocytosis of apoptotic host cells. *Infect Immun* **76**, 959-66.
- Tillack, M., Biller, L., Irmer, H., Freitas, M., Gomes, M. A., Tannich, E. and Bruchhaus, I.** (2007). The *Entamoeba histolytica* genome: primary structure and expression of proteolytic enzymes. *BMC Genomics* **8**, 170.
- Vaithilingam, A., Teixeira, J. E., Miller, P. J., Heron, B. T. and Huston, C. D.** (2012). *Entamoeba histolytica* cell surface calreticulin binds human c1q and functions in amebic phagocytosis of host cells. *Infect Immun* **80**, 2008-18.
- Vassilieva, E. V. and Nusrat, A.** (2008). Vesicular trafficking: molecular tools and targets. *Methods Mol Biol* **440**, 3-14.
- Voigt, H., Olivo, J. C., Sansonetti, P. and Guillen, N.** (1999). Myosin IB from *Entamoeba histolytica* is involved in phagocytosis of human erythrocytes. *J Cell Sci* **112 (Pt 8)**, 1191-201.
- von Schwedler, U. K., Stuchell, M., Muller, B., Ward, D. M., Chung, H. Y., Morita, E., Wang, H. E., Davis, T., He, G. P., Cimbara, D. M. et al.** (2003). The protein network of HIV budding. *Cell* **114**, 701-13.
- Wang, W., Yang, L. and Huang, H. W.** (2007). Evidence of cholesterol accumulated in high curvature regions: implication to the curvature elastic energy for lipid mixtures. *Biophys J* **92**, 2819-30.
- Webster, B. M., Colombi, P., Jager, J. and Lusk, C. P.** (2014). Surveillance of nuclear pore complex assembly by ESCRT-III/Vps4. *Cell* **159**, 388-401.
- Weinke, T., Friedrich-Janicke, B., Hopp, P. and Janitschke, K.** (1990). Prevalence and clinical importance of *Entamoeba histolytica* in two high-risk groups: travelers returning from the tropics and male homosexuals. *J Infect Dis* **161**, 1029-31.
- Welter, B. H., Laughlin, R. C. and Temesvari, L. A.** (2002). Characterization of a Rab7-like GTPase, EhRab7: a marker for the early stages of endocytosis in *Entamoeba histolytica*. *Mol Biochem Parasitol* **121**, 254-64.
- Welter, B. H. and Temesvari, L. A.** (2004). A unique Rab GTPase, EhRabA, of *Entamoeba histolytica*, localizes to the leading edge of motile cells. *Mol Biochem Parasitol* **135**, 185-95.
- Whitley, P., Reaves, B. J., Hashimoto, M., Riley, A. M., Potter, B. V. and Holman, G. D.** (2003). Identification of mammalian Vps24p as an effector of phosphatidylinositol 3,5-bisphosphate-dependent endosome compartmentalization. *J Biol Chem* **278**, 38786-95.
- Winter, V. and Hauser, M. T.** (2006). Exploring the ESCRTing machinery in eukaryotes. *Trends Plant Sci* **11**, 115-23.
- Wollert, T., Wunder, C., Lippincott-Schwartz, J. and Hurley, J. H.** (2009). Membrane scission by the ESCRT-III complex. *Nature* **458**, 172-7.
- Woodman, P. G. and Futter, C. E.** (2008). Multivesicular bodies: co-ordinated progression to maturity. *Curr Opin Cell Biol* **20**, 408-14.
- Ximénez, C., Patricia, M., Fernando, R. and Ramiro, M.** (2007). Amibiasis intestinal: estado actual del conocimiento. *Medicina Interna de México* **23**, 398-407.
- Xu, W., Smith, F. J., Jr., Subaran, R. and Mitchell, A. P.** (2004). Multivesicular body-ESCRT components function in pH response regulation in *Saccharomyces cerevisiae* and *Candida albicans*. *Mol Biol Cell* **15**, 5528-37.
- Yang, Z., Vild, C., Ju, J., Zhang, X., Liu, J., Shen, J., Zhao, B., Lan, W., Gong, F., Liu, M. et al.** (2012). Structural basis of molecular recognition between ESCRT-III-like protein Vps60 and AAA-ATPase regulator Vta1 in the multivesicular body pathway. *J Biol Chem* **287**, 43899-908.
- Yeo, S. C., Xu, L., Ren, J., Boulton, V. J., Wagle, M. D., Liu, C., Ren, G., Wong, P., Zahn, R., Sasajala, P. et al.** (2003). Vps20p and Vta1p interact with Vps4p and function in multivesicular body sorting and endosomal transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Sci* **116**, 3957-70.
- Yeung, T. and Grinstein, S.** (2007). Lipid signaling and the modulation of surface charge during phagocytosis. *Immunological Reviews* **219**, 17-36.
- Zamborlini, A., Usami, Y., Radoshitzky, S. R., Popova, E., Palu, G. and Gottlinger, H.** (2006). Release of autoinhibition converts ESCRT-III components into potent inhibitors of HIV-1 budding. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 19140-5.

Zhang, X., Zhang, Z., Alexander, D., Bracha, R., Mirelman, D. and Stanley, S. L., Jr. (2004). Expression of amoebapores is required for full expression of *Entamoeba histolytica* virulence in amebic liver abscess but is not necessary for the induction of inflammation or tissue damage in amebic colitis. *Infect Immun* **72**, 678-83.

Zhao, H. and Lappalainen, P. (2012). A simple guide to biochemical approaches for analyzing protein-lipid interactions. *Mol Biol Cell* **23**, 2823-30.

RESEARCH ARTICLE

EhVps32 Is a Vacuole-Associated Protein Involved in Pinocytosis and Phagocytosis of *Entamoeba histolytica*

Yunuen Avalos-Padilla¹, Abigail Betanzos¹, Rosario Javier-Reyna¹, Guillermina García-Rivera¹, Bibiana Chávez-Munguía¹, Anel Lagunes-Guillén¹, Jaime Ortega², Esther Orozco^{1*}

1 Departamento de Infectómica y Patogénesis Molecular, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN, Mexico City, Mexico, **2** Departamento de Biotecnología y Bioingeniería, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN, Mexico City, Mexico

* esther@cinvestav.mx



CrossMark
click for updates

 OPEN ACCESS

Citation: Avalos-Padilla Y, Betanzos A, Javier-Reyna R, García-Rivera G, Chávez-Munguía B, Lagunes-Guillén A, et al. (2015) EhVps32 Is a Vacuole-Associated Protein Involved in Pinocytosis and Phagocytosis of *Entamoeba histolytica*. PLoS Pathog 11(7): e1005079. doi:10.1371/journal.ppat.1005079

Editor: William A. Petri, Jr., University of Virginia Health System, UNITED STATES

Received: January 19, 2015

Accepted: July 11, 2015

Published: July 31, 2015

Copyright: © 2015 Avalos-Padilla et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the paper.

Funding: This study was supported by the National Council of Science and Technology of Mexico (CONACYT; Grant number 220049). Yunuen Avalos-Padilla received a fellowship from CONACYT (No. 243275). The funder had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Abstract

Here, we investigated the role of EhVps32 protein (a member of the endosomal-sorting complex required for transport) in endocytosis of *Entamoeba histolytica*, a professional phagocyte. Confocal microscopy, TEM and cell fractionation revealed EhVps32 in cytoplasmic vesicles and also located adjacent to the plasma membrane. Between 5 to 30 min of phagocytosis, EhVps32 was detected on some erythrocytes-containing phagosomes of acidic nature, and at 60 min it returned to cytoplasmic vesicles and also appeared adjacent to the plasma membrane. TEM images revealed it in membranous structures in the vicinity of ingested erythrocytes. EhVps32, EhADH (an ALIX family member), Gal/GalNac lectin and actin co-localized in the phagocytic cup and in some erythrocytes-containing phagosomes, but EhVps32 was scarcely detected in late phagosomes. During dextran uptake, EhVps32, EhADH and Gal/GalNac lectin, but not actin, co-localized in pinosomes. EhVps32 recombinant protein formed oligomers composed by rings and filaments. Antibodies against EhVps32 monomers stained cytoplasmic vesicles but not erythrocytes-containing phagosomes, suggesting that *in vivo* oligomers are formed on phagosome membranes. The involvement of EhVps32 in phagocytosis was further study in *pNeoEhvps32-HA*-transfected trophozoites, which augmented almost twice their rate of erythrophagocytosis as well as the membranous concentric arrays built by filaments, spirals and tunnel-like structures. Some of these structures apparently connected phagosomes with the phagocytic cup. In concordance, the *EhVps32*-silenced G3 trophozoites ingested 80% less erythrocytes than the G3 strain. Our results suggest that EhVps32 participates in *E. histolytica* phagocytosis and pinocytosis. It forms oligomers on erythrocytes-containing phagosomes, probably as a part of the scission machinery involved in membrane invagination and intraluminal vesicles formation.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

Author Summary

Trophozoites of *E. histolytica* represent an excellent model to study endosomal-sorting complex required for transport components due to their high endocytic activity and vesicle trafficking. The key role of EhVps32 on phagocytosis is supported by: i) its presence on phagosomes, ii) its interaction with EhADH (an erythrocytes receptor), Gal/GalNac lectin and actin, iii) the higher rate of erythrophagocytosis showed by EhVps32 overexpressing trophozoites, iv) the diminish rate of phagocytosis in *EhVps32*-silenced G3 trophozoites, and v) its location in erythrocytes-containing acidic phagosomes. Here, we discovered the presence of membranous concentric helicoidally and tunnel-like structures constituted by EhVps32 and EhADH that may have a dynamic role in membrane remodeling and in the generation of intraluminal vesicles in the phagosomes. Elucidating molecular mechanisms of endocytosis-exocytosis pathways will help us to better understand the pathogenic process of *E. histolytica* and develop new drugs for diagnosis and vaccine methods.

Introduction

Entamoeba histolytica is the protozoan responsible for human amoebiasis, considered the third cause of death in the world due to parasitic diseases [1]. Phagocytosis is a key factor in the parasite virulence and several proteins involved in this event have been already unveiled [2–9], among them the Gal/GalNac lectin [10], EhC2PK, EhCaBP1, EhAK1 [4,11,12] and the EhC-PADH complex, formed by a protease (EhCP112) and an adhesin (EhADH) [2], which is a member of the ALIX (apoptosis-linked gene 2-interacting protein X) family [13]. In addition to the Bro1 domain located at its N-terminus, EhADH possesses an adherence epitope at the C-terminus which functions as a receptor during adherence to and phagocytosis of erythrocytes [2,13,14]. BRO1 was described as endosome associated protein that functions in the multivesicular bodies (MVBs) pathway in *Saccharomyces cerevisiae* [15]. EhADH interacts with EhVps32 [16], a protein described in mammals as a member of the endosomal sorting complex required for transport (ESCRT). ESCRT is a system composed by class E vacuolar protein sorting (Vps) factors and it is highly involved in endocytosis [17]. Additionally, ESCRT participates in a number of cellular events such as cell division and autophagy, among others [18–20].

In eukaryotes, nascent endosomes undergo a maturation process that is controlled by fusion and fission events [21]. Early endosomes mature to intermediate endosomes, which fuse to MVBs where cargo molecules and receptors are segregated to be digested or recycled. Then, late endosomes and endolysosomes are generated. During this process, endosomes acquire different pH, size, appearance and lipid and protein composition [22,23]. Hybrids with characteristics of both intermediate and late endosomes and lysosomes are also formed [24].

In general, assembly of the ESCRT machinery begins with recognition of monoubiquitinated cargo by ESCRT-0 (Vps27 and Hse1). Then, ESCRT-0 interacts with ESCRT-I (Vps20, Vps23, Vps37 and Mvb12) that binds to endosomal membranes [25]. ESCRT-I activates ESCRT-II (Vps22, Vps25 and Vps36), producing membrane invagination to form intraluminal vesicles (ILVs). At this point, ESCRT-III subunits (Vps2, Vps20, Vps24 and Vps32) are recruited, leading to the generation of oligomers that regulate formation and release of ILVs [26] and acting as scission machinery in preformed vesicle necks. Subsequently, Vps4 AAA ATPase catalyzes the dissociation of ESCRT-III components from the membrane to re-start the cycle [27,28]. In other cases, the Alix protein mediates the ubiquitin-independent, but ESCRT-III-dependent endocytosis [29]. ESCRT-III members have coiled-coil protein-protein interaction domains common to the Snf7 family [30]. Its main component, Vps32 (Snf7 in *S. cerevisiae*

[31] and CHMP4 in humans [32]), has a positively charged N-terminus that binds to negatively charged lipids. N-terminus also binds to the negatively charged C-terminus domain to generate the EhVps32 auto-inhibited form. Vps32 and Vps20 form the ESCRT-III sub-complex I, which is in direct contact with endosomes. Afterward, they recruit Vps2 and Vps24 that form sub-complex II [33].

E. histolytica possesses the genes encoding ESCRT proteins [34] and those encoding EhVps4 AAA ATPase and EhADH, both ESCRT associated proteins [13,35]. Here, we show the participation of EhVps32 in both receptor-mediated and non-specific phagocytosis as well as in pinocytosis; we also revealed its co-localization with EhADH, Gal/GalNac lectin and actin during erythrophagocytosis. Besides, we identified the presence of membranous helicoidally and tunnel-like structures in trophozoites constituted by EhVps32 and EhADH that seem to be involved in the dynamic membrane remodeling during phagocytosis. These events are crucial for target cells destruction during parasite invasion to host tissues.

Results

In resting conditions, EhVps32 is localized adjacent to plasma membrane and in cytoplasmic vesicles

As a tool to study the location and function of EhVps32 in *E. histolytica* trophozoites, we produced antibodies against the EhVps32 recombinant protein (rEhVps32) [16]. By western blot assays, α EhVps32 antibodies recognized a 32 kDa band in trophozoite lysates, in cytoplasm and in membrane fractions (Fig 1A and 1B). However, after membrane fractionation by ultracentrifugation, EhVps32 was only detected in internal membranes (Fig 1B). In the same nitrocellulose filter, the α Gal/GalNac lectin antibodies identified a 170 kDa band [36], in both plasma and internal membrane fractions. The Gal/GalNac lectin has been described as a membrane protein marker [10]. Through confocal microscopy and TEM, EhVps32 appeared in cytoplasmic vesicles of distinct size, some of them, close to the plasma membrane (Fig 1C and 1D). In addition, Gal/GalNac lectin and EhVps32 co-localized close to the plasma membrane. Little signal was observed in cells treated with preimmune serum and in non-permeabilized cells (Fig 1C and 1D), confirming that EhVps32 is not a plasma membrane protein, but it is located in cytoplasmic vesicles, some of them adjacent to the plasma membrane.

During erythrophagocytosis, EhVps32 co-localizes with EhADH, Gal/GalNac lectin and actin

The involvement of EhVps32 in erythrophagocytosis was studied by confocal microscopy through kinetics from 0 (resting conditions) to 60 min. In parallel, we investigated its co-localization with EhADH, Gal/GalNac lectin and actin, three proteins involved in endocytosis [2,10,37]. EhADH is a receptor for erythrocytes during target cell adherence and it has been found on phagosomes [2,14,38]. Additionally, *in vitro*, it binds to EhVps32 through its Bro1 domain [16]. At resting conditions EhVps32 co-localized with EhADH close to the plasma membrane (Fig 2A), with a similar pattern to that observed with Gal/GalNac lectin (Fig 1C). According to the results obtained with non permeabilized cells and membrane fractionation, EhVps32 might be adjacent to the plasma membrane (Fig 1C), and, as it has been reported, EhADH could be facing the extracellular space [16].

After 2 min, EhVps32 also decorated phagocytic cups, where it co-localized with EhADH, but EhVps32 did not appear surrounding the erythrocytes, whereas EhADH decorated adhered erythrocytes (Fig 2A and 2B). Between 5 to 30 min of phagocytosis, EhVps32 presented different patterns on erythrocyte-containing phagosomes: some erythrocytes remained without

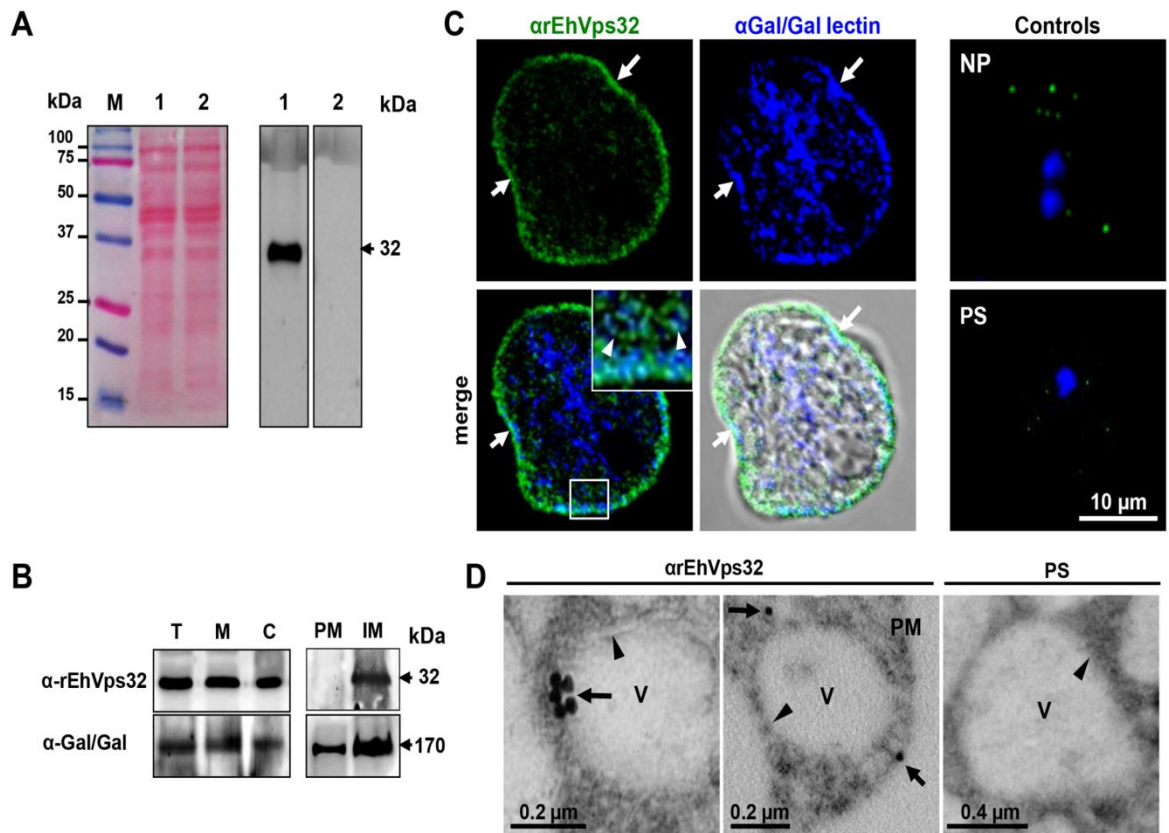


Fig 1. Detection and localization of EhVps32 protein in trophozoites lysates and fixed trophozoites. (A) At left, Ponceau stained nitrocellulose membrane of transferred 12% SDS-PAGE separated trophozoites lysates (lanes 1 and 2) and molecular markers (lane M). At right, western blot assay using αrEhVps32 antibodies (lane 1) or preimmune serum (lane 2), followed by HRP-labeled secondary antibodies. (B) Western blot assays of trophozoites extracts (T), membrane fraction (M) and cytoplasmic fraction (C). Membrane fraction was ultracentrifuged to separate plasma membrane (PM) and internal membranes (IM). (C) Confocal microscopy using αrEhVps32 and αGal/GalNac lectin antibodies, followed by FITC-labeled and Pacific blue-labeled secondary antibodies, respectively. Controls: non-permeabilized trophozoites (NP) and trophozoites treated with preimmune serum (PS) and secondary antibodies. Nuclei were counterstained with DAPI (blue fluorescence). Arrows: plasma membrane. Arrowheads: vesicles close to plasma membrane magnified in white square. (D) TEM of trophozoites incubated with αrEhVps32 antibodies or PS and gold-labeled secondary antibodies. V: vesicles. Arrows: gold particles. Arrowheads: vesicle membrane. PM: plasma membrane.

doi:10.1371/journal.ppat.1005079.g001

fluorescence, while others appeared completely covered by the αrEhVps32 antibodies (Fig 2A). At this time, EhVps32 and EhADH co-localized on some phagosomes; although other phagosomes recognized by αEhADH antibodies were not stained by αrEhVps32 antibodies (Fig 2A). At 60 min, when digestion had advanced, the majority of EhVps32 returned to its resting position and its presence on phagosomes diminished, whereas EhADH remained in them (Fig 2A). Nevertheless, at this time, many trophozoites had ingested more than 20 erythrocytes per trophozoite distributed in phagosomes with a distinct number of erythrocytes inside.

Pearson's coefficient showed that the EhVps32 and EhADH co-localization was 0.47 at 0 min, at 30 min it reached 0.65, while at 60 min it diminished to 0.3 (Fig 2C). The proportion of erythrocytes inside phagosomes decorated by αEhADH or αrEhVps32 antibodies with relation to total ingested erythrocytes confirmed that, whereas the majority of phagosomes were stained by EhADH, EhVps32 was detected only in 20% of them at 2 min and in 58% at 30 min, dropping close to zero after this time (Fig 2D).

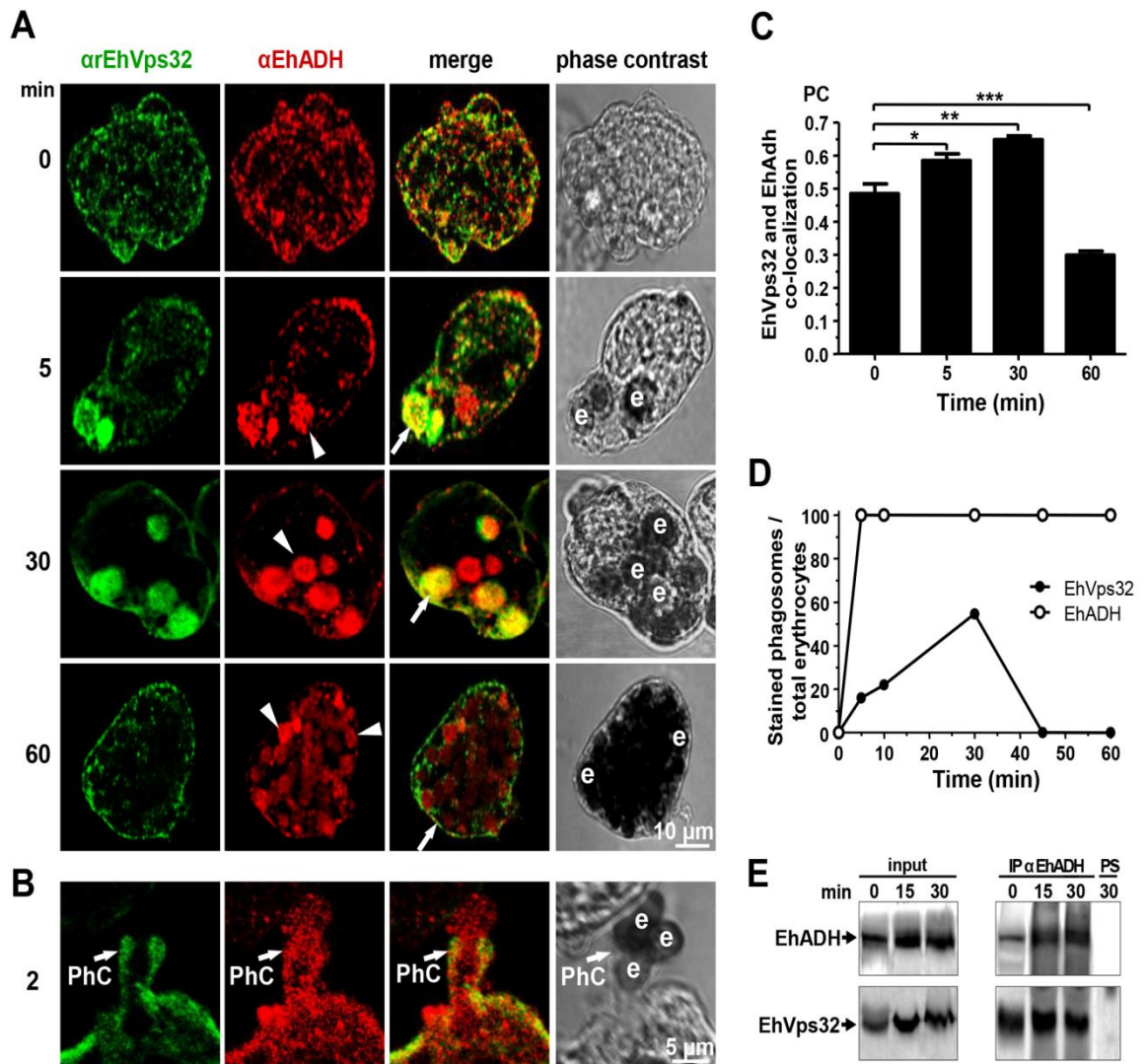


Fig 2. Co-localization and interaction of EhVps32 and EhADH during erythrophagocytosis. (A,B) Trophozoites were incubated with erythrocytes for different times and analyzed through confocal microscopy. (A) After erythrophagocytosis, trophozoites were incubated with α EhVps32 and α EhADH antibodies, then with FITC and TRITC-labeled secondary antibodies, respectively. (B) Illustration of a phagocytic cup (PhC). Arrows: co-localization of EhVps32 and EhADH. Arrowheads: EhADH in phagosomes without EhVps32 signal. e: erythrocytes. (C) Pearson's coefficient (PC) to quantify EhVps32 and EhADH co-localization in the entire cell. (*) $p < 0.05$, (**) $p < 0.01$ and (***) $p < 0.001$. (D) Proportion of erythrocytes inside phagosomes decorated by α EhVps32 and α EhADH antibodies with relation to total ingested erythrocytes per trophozoite. (E) Immunoprecipitation of trophozoites lysates at different times of erythrophagocytosis using α EhADH antibodies or preimmune serum (PS).

doi:10.1371/journal.ppat.1005079.g002

Immunoprecipitation assays using α EhADH antibodies confirmed the association of EhVps32 with EhADH in resting conditions and during phagocytosis (Fig 2E). By these experiments we could not accurately distinguish differences in the amount of both interacting proteins at different phagocytosis times. Nevertheless, altogether our results suggest that during erythrophagocytosis EhADH recruits EhVps32, probably after adherence to target cells and before their digestion. As the phagosome maturation process is fast, continuous and

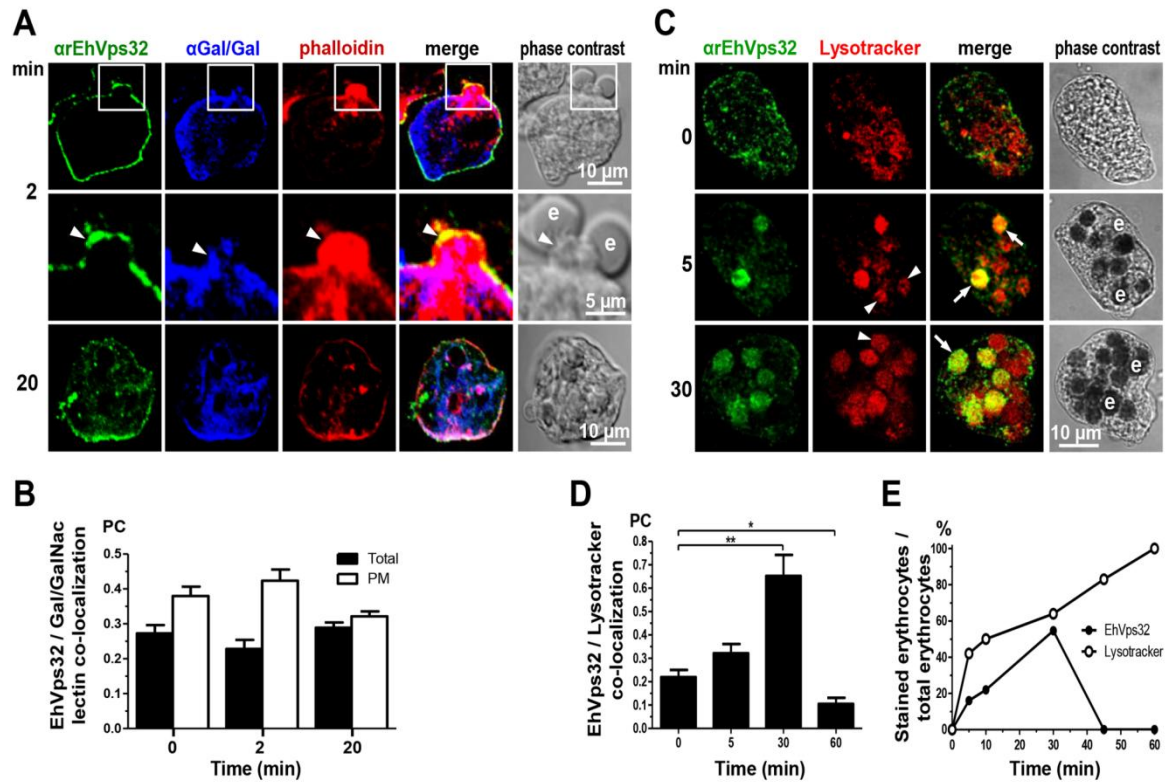


Fig 3. Co-localization of EhVps32, Gal/GalNac lectin, actin and Lysotracker during erythrophagocytosis. Trophozoites were incubated with erythrocytes for different times and analyzed through confocal microscopy. (A) After erythrophagocytosis, trophozoites were incubated with rabbit α EhVps32 and mouse α Gal/GalNac lectin antibodies and rhodamine-phalloidin, and then, with α -rabbit FITC and α -mouse Pacific blue-labeled secondary antibodies, respectively. Arrowheads: co-localization at phagocytic cup. Arrows: co-localization at phagosome membrane. e: erythrocytes. (B) Pearson's coefficient (PC) to quantify EhVps32 and Gal/GalNac lectin co-localization in the entire cell (total) and in the plasma membrane (PM). (C) Confocal microscopy of trophozoites incubated with Lysotracker and treated with α EhVps32 and FITC-labeled secondary antibodies. Arrows: co-localization of EhVps32 and Lysotracker. Arrowheads: Lysotracker-stained phagosomes without EhVps32 signal. e: erythrocytes. (D) Pearson's coefficient (PC) to quantify EhVps32 and Lysotracker co-localization in the entire cell. (*) $p < 0.05$ and (**) $p < 0.01$. (E) Proportion of erythrocytes inside phagosomes decorated by α EhVps32 antibodies and Lysotracker with relation to total ingested erythrocytes per trophozoite.

doi:10.1371/journal.ppat.1005079.g003

non-synchronous, it is difficult to observe EhVps32 in all phagosomes at a given time. Additionally, we cannot discard the participation of both proteins in other functions distinct to phagocytosis.

Gal/GalNac lectin is another *E. histolytica* protein involved in adherence and phagocytosis. It is located in the plasma membrane and in the endosomes generated during the endocytic process [10]. Furthermore, in resting conditions it co-localized with EhVps32 (Fig 1C), adjacent to the plasma membrane. Then, we investigated the location of EhVps32 and Gal/GalNac lectin during erythrophagocytosis. At 2 min, we found both proteins in the plasma membrane and in the phagocytic cups, close to adhered erythrocytes which would be ingested (Fig 3A). In addition, both proteins co-localized with actin, detected by phalloidin (Fig 3A). Interestingly, 20 min after incubation with erythrocytes, the three proteins appeared together at some points of the plasma membrane and around the ingested erythrocytes, confirming the participation of them in erythrophagocytosis (Fig 3A). Pearson's coefficient of EhVps32 and Gal/GalNac lectin co-localization at plasma membrane, at resting conditions it was 0.38, after 2 min of phagocytosis it was 0.42, and after 20 min it was 0.32; whereas in the entire cell, Pearson's coefficients

were 0.27, 0.23 and 0.29, respectively (Fig 3B). These results suggest that in addition to EhADH, EhVps32 interacts with Gal/GalNac lectin and actin during erythrophagocytosis.

Interestingly, in non-specific phagocytosis of latex microspheres, EhVps32 was detected in all phagosomes containing fluorescent microspheres with a Pearson's coefficient at 5 min of 0.43; at 30 min, 0.63; and at 60 min, 0.68 (S1 Fig). However, fluorescent microspheres and EhADH exhibited poor co-localization, with a Pearson's coefficient lower than 0.3 at all times tested (S1 Fig). In contrast to erythrophagocytosis findings, EhVps32 participates in the whole process of non-specific phagocytosis, whereas EhADH participation appeared to be minimal.

EhVps32 is localized in acidic vesicles

In mammalian cells, intermediate endocytosis is characterized by formation of typical MVBs, that once formed, rapidly acidify reaching a pH of 5.5 [39]. In resting conditions, many small vesicles were positive for LysoTracker in the cytoplasm (Fig 3C), indicating that trophozoites possess a significant amount of acidic vesicles, probably due to their basal endocytosis. Between 5 to 30 min, LysoTracker stained all erythrocytes-containing phagosomes that were positive for α EhVps32 antibodies. On the other hand, other phagosomes were stained only by LysoTracker (Fig 3C and 3E). At 45 and 60 min, EhVps32 appeared in the cytoplasm and adjacent to the plasma membrane, whereas LysoTracker decorated almost all erythrocytes-containing phagosomes (Fig 3E). Pearson's coefficient showed that association between EhVps32 and LysoTracker augmented from 0.22 at 0 time to 0.65 at 30 min, and it diminished to 0.1 after this time (Fig 3D).

During phagocytosis, EhVps32 appears in phagosomes and membranous concentric structures

Between 10 and 30 min, gold-labeled antibodies detected through TEM the EhVps32 protein in phagosome membranes (Fig 4B), in concentric membranous structures close to ingested erythrocytes (Fig 4C, 4D and 4E) and in erythrocyte fragments (Fig 4D and 4E). Trophozoites treated only with gold labeled secondary antibodies gave no signal (Fig 4A). At 60 min, TEM images exhibited erythrocytes inside phagosomes with putative ILVs that could correspond to MVBs or to other unidentified structures. At this time, EhVps32 scarcely appeared in late phagosomes, which exhibited erythrocyte fragments in advanced phases of digestion (Fig 4F). These results corroborate that EhVps32 is in phagosomes of acidic nature, but it is poorly located in phagolysosomes.

During pinocytosis, EhVps32 co-localizes with EhADH and Gal/GalNac lectin

In other organisms, the role of Vps32 has been elucidated in pinocytosis, but not in phagocytosis [40]. To confirm the participation of EhVps32 in pinocytosis we studied the relationship of EhVps32 with EhADH and Gal/GalNac lectin during FITC-labeled dextran uptake. Confocal images showed that at 30 min incubation, EhVps32, EhADH and Gal/GalNac lectin clearly co-localized in dextran-containing endosomes (Fig 5A and 5B). This pinosomes appeared larger at 60 min (Fig 5A). However, detection of actin co-localizing with dextran and EhVps32 was less evident (Fig 5C).

rEhVps32 forms oligomers *in vitro* and EhVps32 monomers are located in the cytoplasm

According to results presented above, EhVps32 seems to be involved in phagocytosis and pinocytosis. However, to carry out its function as scission factor and generate ILVs during

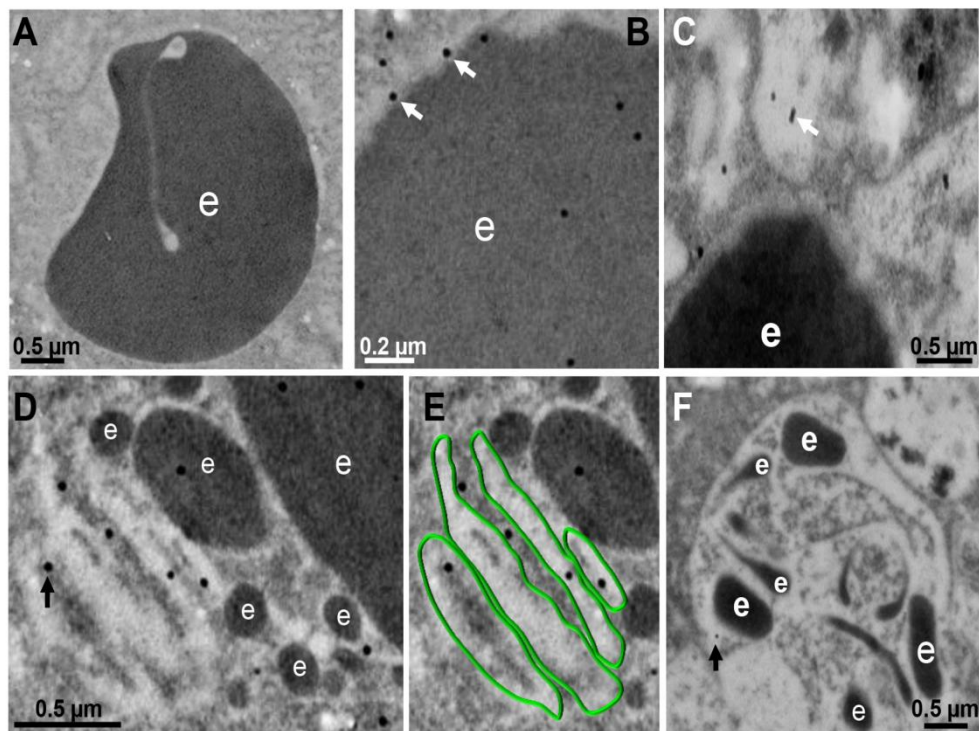


Fig 4. Detection by TEM immunogold of EhVps32 on phagosomes and membranous concentric structures. TEM of trophozoites incubated with erythrocytes after 10 (A-C), 30 min (D,E) and 60 min (F), treated with rEhVps32 antibodies and gold-labeled secondary antibodies. (A) Control treated only with gold-labeled secondary antibodies. (E) Membranous concentric structures observed in (D) were colored in green. e: erythrocytes and erythrocytes fragments. Arrows: gold particles.

doi:10.1371/journal.ppat.1005079.g004

erythrophagocytosis, EhVps32 needs to form oligomers on curved membranes of phagosomes, as it has been described for this protein in other systems [41]. First, we explored *in vitro* whether rEhVps32 was able to form oligomers, employing TEM negative staining assays of purified rEhVps32. Images showed the presence of long filaments (10–75 nm width) with ramifications and many small rings (0.1–0.15 μm) that presumably could augment in size and complexity by continuous oligomerization of the protein (Fig 6A and 6F). Fig 6A exhibits a long ring (0.7 x 0.65 μm), containing other smaller rings (0.1–0.15 μm) and Fig 6B and 6C showed concentric structures. Antibodies against rEhVps32 recognized these structures (Fig 6D and 6F). Size exclusion chromatography of the rEhVps32 purified protein followed by western blot analysis confirmed the presence of oligomers, with a migration rate (Rf) corresponding to EhVps32 multiples (Fig 6G and 6I). However, little differences were found in the western blot patterns obtained from the fractions containing the larger oligomerized molecules and the one containing the monomer. We attributed this to the fast polymerization of rEhVps32 in the tube.

To investigate the location of EhVps32 monomers and oligomers in trophozoites, we generated polyclonal antibodies (pEhVps32) directed against an antigenic region formed by 18 amino acids located in the first alpha helix at the EhVps32 amino terminus (Fig 6J). According to reports in other systems [41,42], this peptide may be in contact with the phagosome membrane because it contains positively charged amino acids that bind to negatively charged membrane lipids [43]. Thus, it is predictable that α pEhVps32 antibodies would react with the

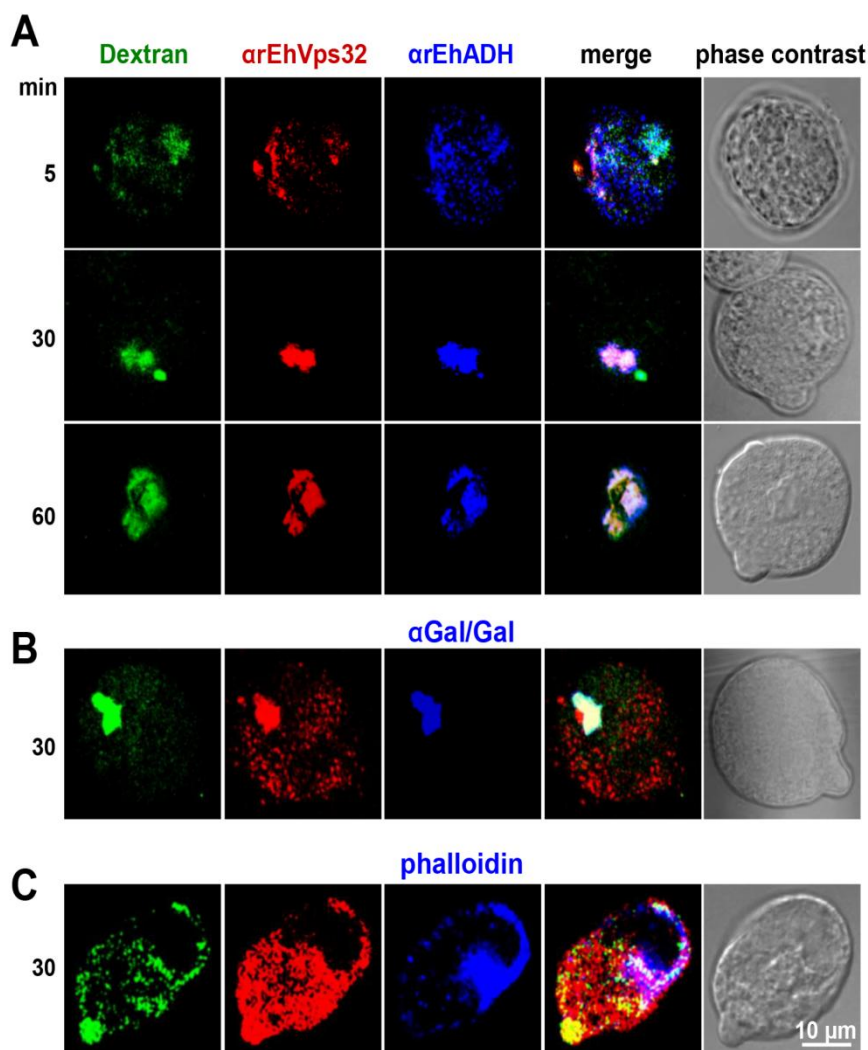


Fig 5. Co-localization of EhVps32 with EhADH and Gal/GalNac lectin during pinocytosis. (A) Confocal microscopy of trophozoites incubated with FITC-dextran for different times and then, treated with mouse α EhVps32 and rabbit α EhADH antibodies, followed by α -mouse TRITC-labeled and α -rabbit Cy5-labeled secondary antibodies, respectively. (B) Trophozoites incubated with rabbit α EhVps32 and mouse α Gal/GalNac lectin antibodies, and then with α -rabbit TRITC-labeled and α -mouse Pacific blue-labeled antibodies, respectively. (C) Trophozoites incubated with mouse α EhVps32 antibodies and rhodamine-phalloidin, followed by incubation with α -mouse Pacific blue-labeled secondary antibodies. Only for this last experiment, blue and red channels were digitally inverted.

doi:10.1371/journal.ppat.1005079.g005

exposed epitope in EhVps32 monomers, but not with oligomers, in which this region is hidden (Fig 6J). In western blot assays, α EhVps32 antibodies recognized the 32 kDa protein in trophozoites lysates and competed with the rEhVps32 purified protein and with the α EhVps32 antibodies (Fig 6K), evidencing their specificity. In confocal microscopy experiments, α EhVps32 antibodies decorated cytoplasmic small vesicles but not phagosomes containing erythrocytes (Fig 6L). These results suggest that, as in other systems [44], *in vivo* EhVps32 forms oligomers on the phagosome membranes, which would be necessary to function as scission machinery during ILVs formation in endocytosis.

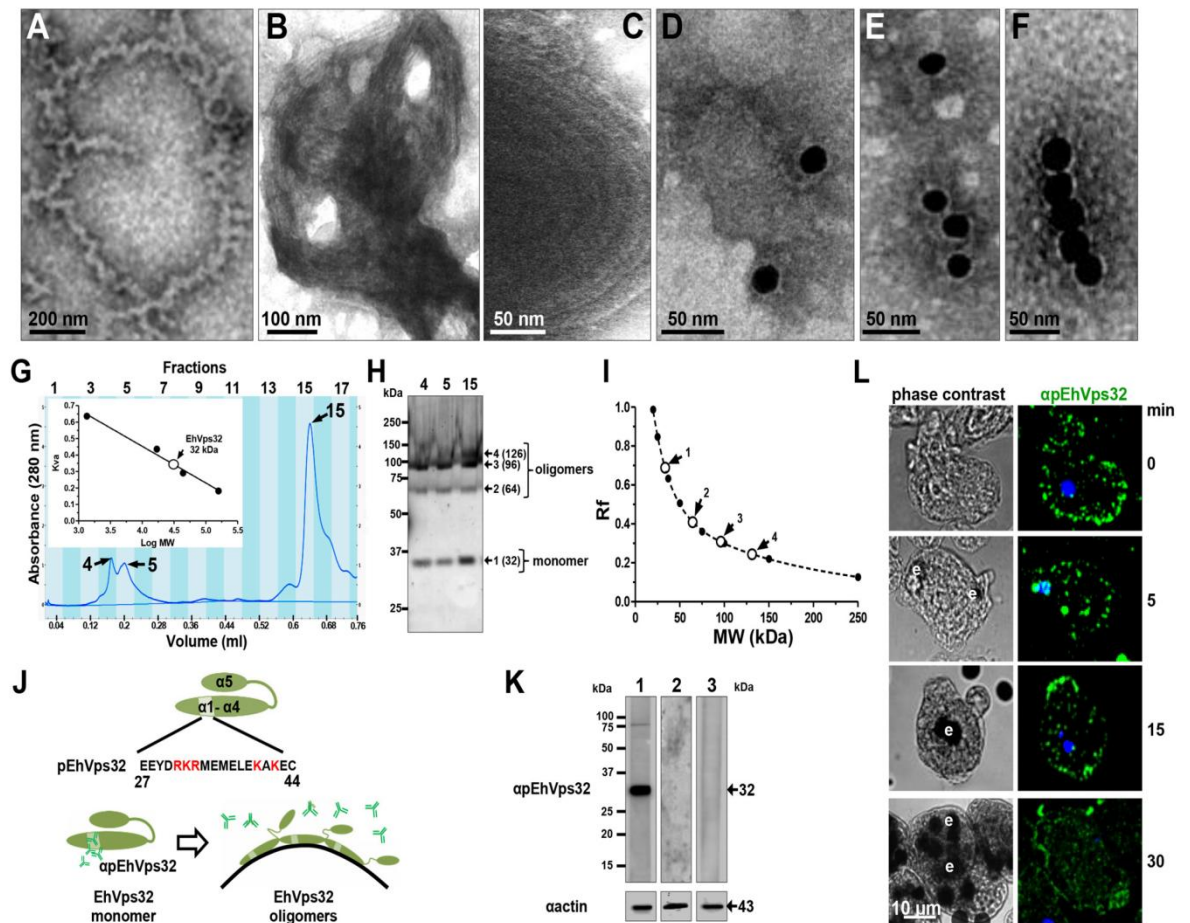


Fig 6. *In vitro* oligomerization of rEhVps32 and cellular localization of EhVps32 monomers. (A-C) TEM of purified rEhVps32 (without GST-tag) negatively stained. (D-F) Samples were treated with α rEhVps32 antibodies, followed by gold-labeled secondary antibodies. (G) Gel filtration chromatographic profiles of purified rEhVps32 (without GST-tag). Inset: calibration curve using molecular weight standards to estimate the profile of EhVps32 monomer. (H) Eluted fractions contained the EhVps32 profiles indicated in the graph (G) were submitted to western blot analysis, using α rEhVps32 antibodies. (I) Rf of molecular weight markers (●) and bands (○) revealed by α rEhVps32 antibodies in (H). (J) Schematic representation of close and open conformations of EhVps32 showing the position of pEhVps32 polypeptide used to generate α pEhVps32 antibodies. Red letters: positively charged residues. Scheme shows the EhVps32 monomers in close conformation and the EhVps32 oligomers in open conformation on the phagosome membrane. (K) Western blot assays of trophozoites lysates, using α pEhVps32 antibodies alone (lane 1), competed with rEhVps32 purified protein (lane 2) or competed with α rEhVps32 antibodies (lane 3). As a loading control, the same membranes were re-blotted with actin antibodies. (L) Confocal microscopy of trophozoites incubated with erythrocytes treated with α pEhVps32 and FITC-labeled secondary antibodies. Nuclei were counterstained with DAPI. e, erythrocytes.

doi:10.1371/journal.ppat.1005079.g006

EhVps32 overexpression increases rate of erythrophagocytosis and induces formation of helicoidally concentric structures

We searched for further insights on EhVps32 function using *pNeoEhVps32-HA* transiently-transfected trophozoites. Transfected trophozoites were viable for 72 h, probably due to the excessive oligomerization of EhVps32. However, until this time, they appeared healthy, with active movement, pleomorphic and able to divide. Twelve hours after transfection we confirmed by western blot experiments that *pNeoEhVps32-HA* transfected cells expressed 1.6 to 2 fold more EhVps32 protein than *pNeo*-transfected and non-transfected cells, respectively

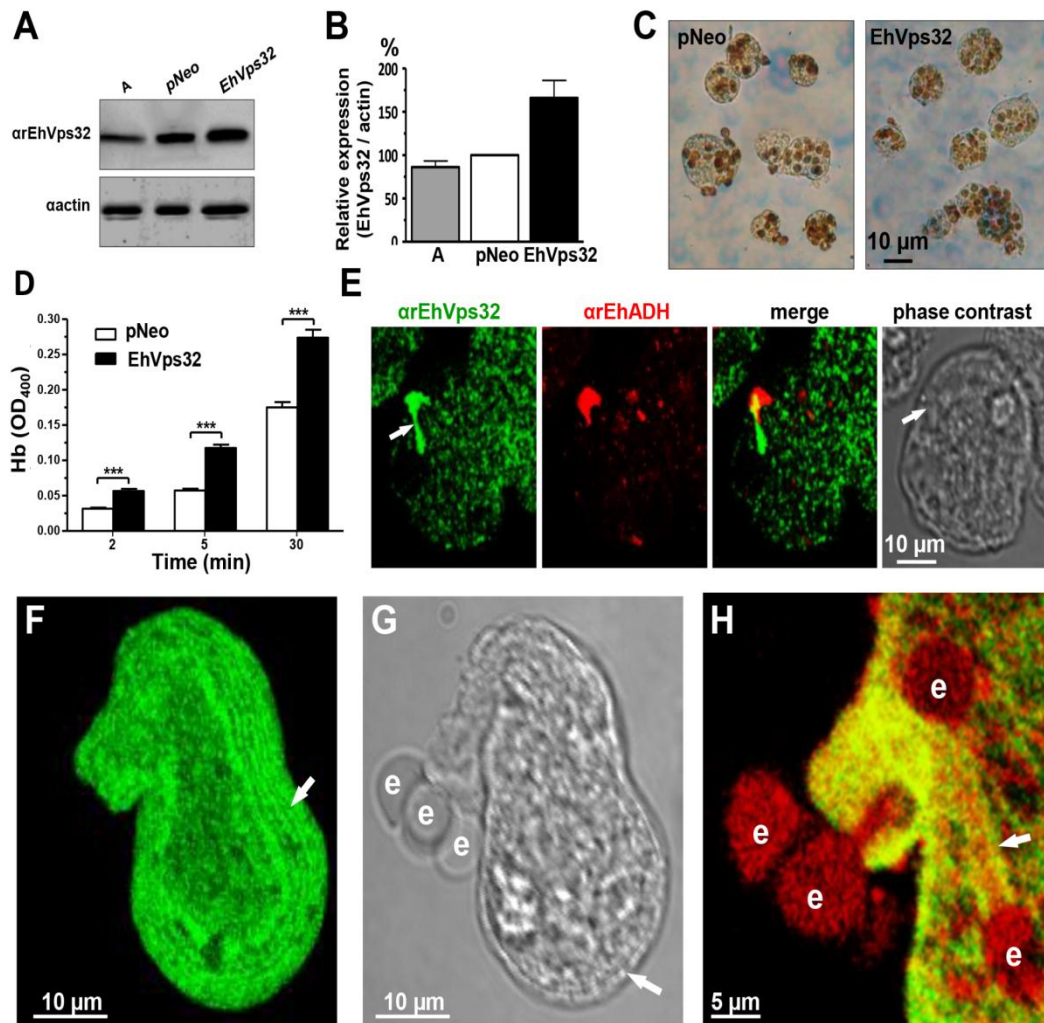


Fig 7. Expression and localization of EhVps32 and rate of erythrophagocytosis in *pNeoEhVps32-HA* transfected trophozoites. (A) Western blot assays of trophozoites lysates from wild type clone A (lane A) and *pNeo* (lane pNeo) and *pNeoEhVps32-HA* (lane EhVps32) transfected cells, using the α EhVps32 antibodies. As a loading control, the same membrane was re-blotted with α actin antibodies. (B) Densitometry analysis of bands showed in (A), normalized against actin band. (C) Diaminobenzidine-stained trophozoites that ingested erythrocytes for 30 min. (D) Rate of erythrophagocytosis of transfected trophozoites. (***) $p < 0.001$. (E) Confocal microscopy of *pNeoEhVps32-HA* transfected trophozoites in resting conditions, using α EhVps32 and α EhADH antibodies, followed by FITC-labeled and TRITC-labeled secondary antibodies. Arrows: membrane projections. (F-H) Trophozoites overexpressing EhVps32 incubated with erythrocytes for 2 min treated with α EhVps32 and α EhADH antibodies and FITC- and TRITC-secondary antibodies, respectively. (F) Maximum projection of a transfected trophozoite evidencing the concentric arrays (arrow) formed by EhVps32. (G) Phase contrast. Arrow: concentric arrays. (H) Merging image (α EhVps32 and α EhADH antibodies). Arrow: tunnel-like structure. e: erythrocytes.

doi:10.1371/journal.ppat.1005079.g007

(Fig 7A and 7B). The rate of erythrophagocytosis was evaluated 12 h after transfection in cultures with 95% of viability. *pNeoEhVps32-HA*-transfected trophozoites ingested between 56 and 105% more erythrocytes than *pNeo* transfected trophozoites (Fig 7C and 7D). Number of erythrocytes inside trophozoites was counted by light microscopy in 3,3' diaminobenzidine-stained preparations (Fig 7C) and by the amount of hemoglobin inside the trophozoites at different times of phagocytosis, with similar results (Fig 7D).

Confocal microscopy images of resting *pNeoEhvps32-HA*-transfected trophozoites revealed the presence of structures of distinct size protruding from the plasma membrane, which were recognized by α EhVps32 and α EhADH antibodies (Fig 7E). Trophozoites exhibited structures decorated in one end by α EhVps32 antibodies and in the opposite end by α EhADH antibodies, whereas in the middle, both proteins merged. We do not know the significance of this protein distribution. However, these results reinforce the hypothesis that both proteins interact even in resting trophozoites, and that this interaction was more evident when EhVps32 is over-expressed. During phagocytosis in some trophozoites, α EhVps32 antibodies decorated membranous concentric structures that were located inside cells and forming part of the phagocytic cup (Fig 7E, 7G and 7H). They were visible in the cytoplasm forming filaments or tunnel-like structures extended to the ingested erythrocytes and contacting phagosomes (Fig 7E, 7G and 7H). EhADH appeared around adhered erythrocytes, in erythrocytes in process of ingestion and in erythrocytes inside phagosomes (Fig 7H).

We investigated the appearance of these structures on the trophozoite surface by SEM. Images of *pNeoEhvps32-HA*-transfected trophozoites revealed the presence of a high amount of membrane rings of 0.9–1.6 μ m diameters, with 0.3 to 0.7 μ m holes (Fig 8B), probably corresponding to the extreme of the tunnel-like and other structures observed in immunofluorescence experiments. Trophozoites exhibited membrane projections of 2.2 to 2.4 μ m length, and 1.5 to 1.9 μ m widths (Fig 8C) similar to those recognized by α EhVps32 antibodies in confocal microscopy experiments (Figs 7E and S2A–S2F). They also appeared, although in fewer amount and with less diversity, in the wild type strain (S2K and S2L Fig) and in *pNeo* transfected trophozoites (S2G–S2J Fig). Thus, EhVps32 seems to form oligomers by the assembly of rings and filaments that protruded from the plasma membrane, which, in excess, might kill the cells.

We explored by TEM the ultrastructure of the arrays detected by confocal microscopy and SEM. Thin sections of *pNeoEhvps32-HA*-transfected trophozoites, exhibited helicoidally structures up to 2.12 x 1.75 μ m in diameters, formed by 5 to 7 concentric filaments of 75–100 nm width (Fig 8D, 8E and 8F). Then, we prepared thin sections of trophozoites embedded in LR White resin, to better allow the access of α EhVps32 antibodies. Antibodies recognized these structures, confirming the presence of EhVps32 in them (Fig 8G–8L). Additionally, these structures were similar to those formed *in vitro* and detected by TEM in negative stain preparations of the rEhVps32 purified protein (S3 Fig).

EhVps32 knock down drastically diminishes rate of erythrophagocytosis

To get more evidence on the role of EhVps32 in phagocytosis, we employed trophozoites of the G3 strain [45] to transcriptional silence the *Ehvps32* gene. *EhVps32*-silenced G3 trophozoites, grown in 7 μ g/ml of G418, presented a growth rate similar to G3 strain and both were used to determine the level of expression of EhVps32. Western blot assays showed 80% reduction in the amount of EhVps32 protein in *EhVps32*-silenced trophozoites compared with G3 strain (Fig 9A and 9B). *EhVps32*-silenced trophozoites showed a poor capacity to ingest erythrocytes, presenting 80% less amount of ingested erythrocytes than the G3 strain (Fig 9C and 9D) (a mean of 1.27 OD₄₀₀ hemoglobin per G3 trophozoites vs 0.26 OD₄₀₀ hemoglobin per *EhVps32*-silenced trophozoites, after 20 min phagocytosis). The 3,3' diaminobenzidine-stained images clearly showed these differences (Fig 9C).

Confocal microscopy images also evidenced differences between G3 strain and *EhVps32*-silenced trophozoites. Differences of α EhVps32 fluorescence intensity between G3 and *EhVps32*-silenced trophozoites were evident at 0 and 20 min phagocytosis. Whereas in G3 trophozoites, EhVps32, EhADH and actin co-localized in the phagocytic cups and around

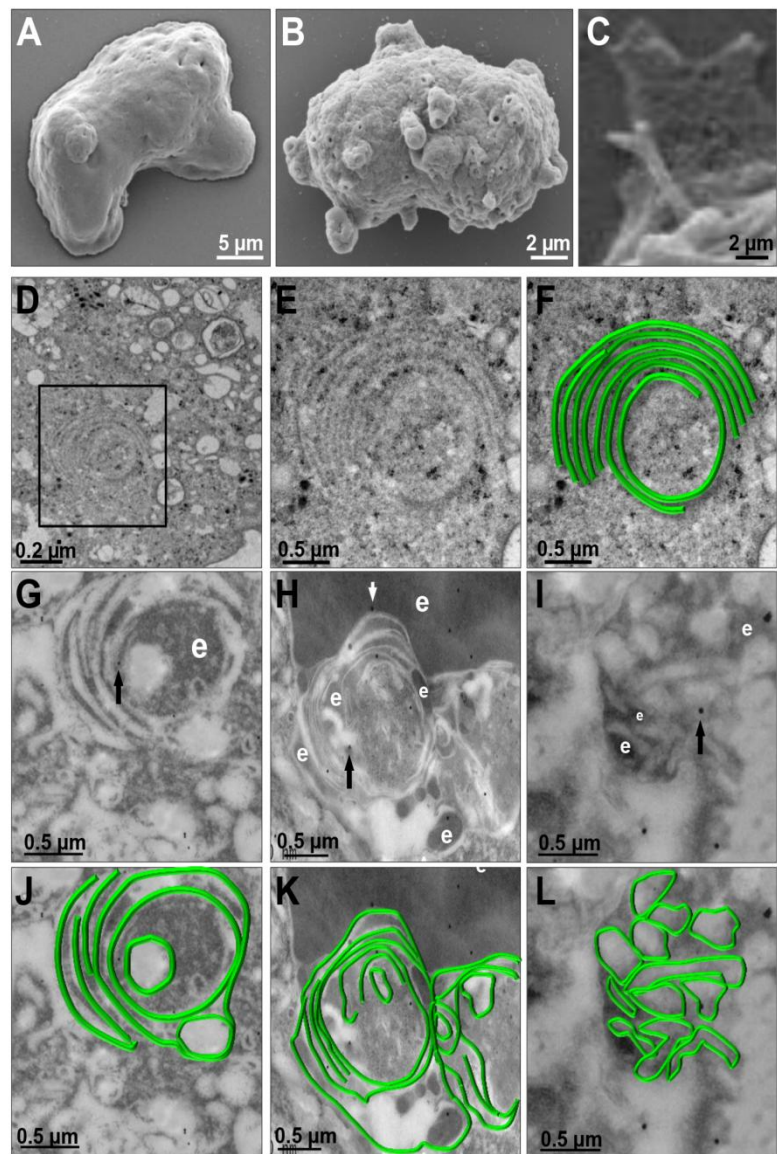


Fig 8. SEM and TEM of membranous helicoidally structures in *pNeoEhVps32-HA* transfected trophozoites. (A-C) SEM of *pNeo* (A) and *pNeoEhVps32-HA* (B,C) transfected trophozoites. (C) Magnification of conical helicoidally structures protruding from plasma membrane. (D-F) TEM of glutaraldehyde fixed trophozoites transfected with *pNeoEhVps32-HA* plasmid embedded in Polybed epoxy resin. Square in (D), magnified in (E,F). (F) A drawing in green superposed to the concentric structure in (E). (G-L) TEM of *pNeoEhVps32-HA* transfected trophozoites, fixed by PFA and glutaraldehyde, embedded in LR White resin and incubated with *arEhVps32* antibodies followed by gold-labeled secondary antibodies. Arrows: gold particles. e: erythrocytes fragments. (J-L) Helicoidally structures in (G-I) were drawn in green.

doi:10.1371/journal.ppat.1005079.g008

phagosomes, in *EhVps32*-deficient trophozoites, EhADH presented a diffused pattern around phagosomes and actin was re-distributed in actin points beside the phagosomes, but not around them (Fig 9E).

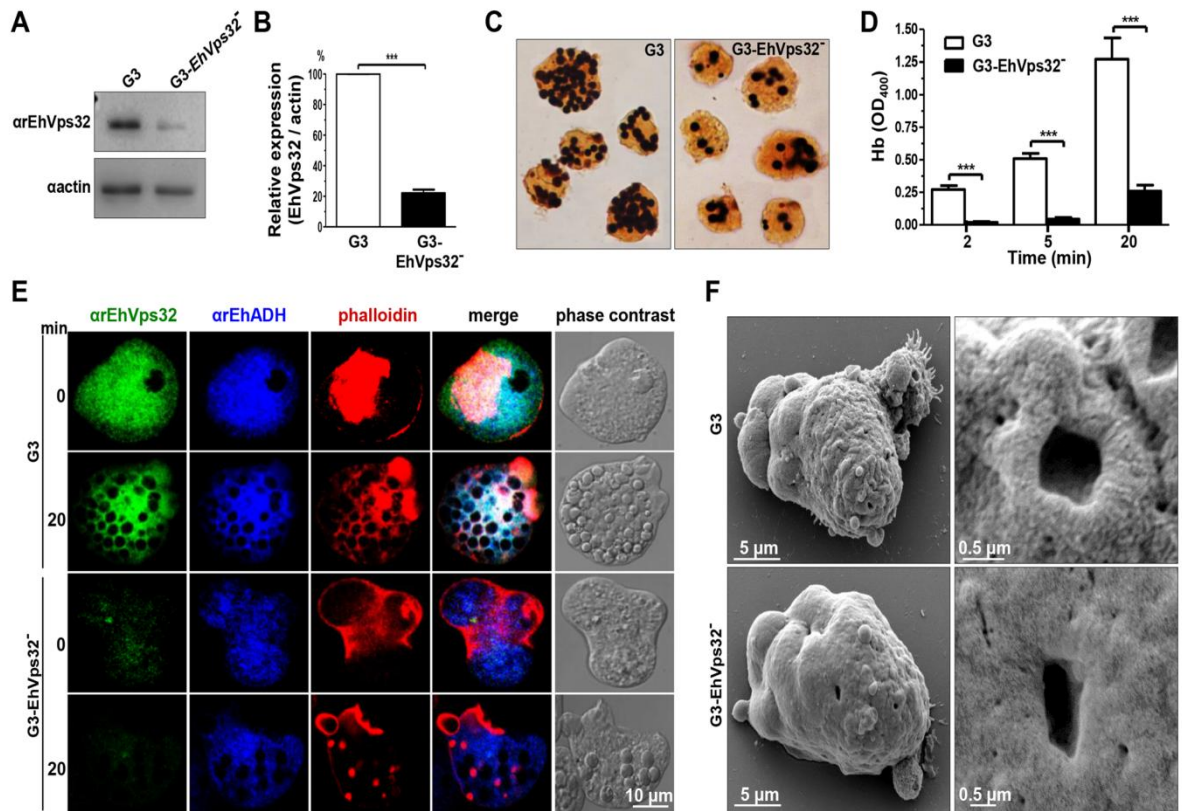


Fig 9. Detection and localization of EhVps32 and erythrophagocytosis rate of *EhVps32*-silenced G3 trophozoites. (A) Western blot assays of trophozoites lysates from G3 strain and *pNeoEhVps32-HA* (*EhVps32*⁻) silenced G3 cells, using the α EhVps32 antibodies. As a loading control, the same membrane was re-blotted with aactin antibodies. (B) Densitometry analysis of bands showed in (A) normalized against actin protein. (C) Diaminobenzidine-stained trophozoites that ingested erythrocytes for 20 min. (D) Rate of erythrophagocytosis of G3 trophozoites. (***) $p < 0.001$. (E) Confocal microscopy of G3 trophozoites in resting conditions and at 20 min of erythrophagocytosis, using mouse α EhVps32 and rabbit α EhADH antibodies and rhodamine-phalloidin, followed by α -mouse FITC-labeled and α -rabbit Cy5-labeled secondary antibodies. (F) SEM of G3 trophozoites. Right panels: magnification of holes.

doi:10.1371/journal.ppat.1005079.g009

By SEM we also observed changes in the *EhVps32*-silenced trophozoites surface. They contained less projections and roughness than the G3 trophozoites (Fig 9F). Additionally, the doughnut structures showed a flat appearance with fewer edges.

In summary, our results show the involvement of EhVps32 protein in phagocytosis, suggesting that the ESCRT machinery participates in this virulence event. Association of EhVps32 with EhADH, Gal/GalNac lectin and actin, all of them proteins involved in phagocytosis, gives further support to this assumption.

Discussion

In this paper, we identified EhVps32 protein in *E. histolytica* trophozoites, which in eukaryotes acts as a scission machinery during the ILVs formation in endocytosis. We showed here the association of EhVps32 with EhADH, Gal/GalNac lectin and actin in trophozoites under resting condition and during erythrophagocytosis. Additionally, we discovered in this parasite membranous tunnel-like and helicoidally structures formed by EhVps32. Filaments, rings, spirals, circular arrays and helicoidally structures resemble those described in COS7 cells and

yeast, transfected with CHMP4 and Snf7, respectively [46,47]. Vps32 has been widely studied during endocytosis in other eukaryotes, however, as far as we know, this is the first study showing its participation in phagocytosis. Furthermore, studies on ESCRT machinery have been performed in yeast and complex organisms that are not professional phagocytes. The unique membrane exchange and constitutive endocytosis of the unicellular protozoan *E. histolytica* provide an excellent model to investigate novel roles of ESCRT machinery and other molecules involved in phagocytosis.

The molecular weight of EhVps32 appeared larger (32 kDa) than the expected one from its amino acid sequence (24 kDa). Accordingly, Snf7 migrates at 35 kDa when its predicted molecular weight is 27 kDa [33]. This has been attributed to the electric charge of the protein [33], and EhVps32 is also rich in charged residues.

The presence of EhVps32 adjacent to the plasma membrane (Fig 1), as well as its polarization in phagocytic cups during phagocytosis, support the hypothesis that EhVps32 is activated since trophozoites initiate the cargo recognition (Fig 2). The direct participation of EhVps32 in erythrophagocytosis started to be visible at 5 min, when EhVps32 interacted with EhADH on erythrocytes-containing phagosomes (Fig 2). Its co-localization with Gal/GalNac lectin and actin in phagocytic cups, in phagosome membrane and in phagosomes (Fig 3), strengthened this hypothesis. EhVps32 is present in phagosomes until 30 min of phagocytosis, but during advanced lysis of erythrocytes, it was poorly detected in phagosomes stained with Lysotracker and α EhADH antibodies (Figs 2 and 3). These findings corroborated the role of EhVps32 in phagocytosis, when ILVs are formed and released.

In yeast, MVBs formation is restricted to intermediate and late endocytosis; while in mammals, typical and uniform MVBs appear during intermediate endocytosis, although multivesicular vacuoles are found in all stages of the endocytic pathway [39]. *E. histolytica* trophozoites also present structures similar to MVBs (Fig 4) [13,48], but neither the time of their formation, nor molecules participating have been fully identified [16,35]. EhADH has been found in putative MVBs [16] and here we demonstrated its co-localization with EhVps32 in phagosomes between 5 to 30 min of phagocytosis, these structures may correspond to MVBs-like bodies. However, EhVps32 appeared poorly in late phagosomes and phagolysosomes that are formed after 30 min phagocytosis (Fig 4). MVBs possess an acidic pH (~5.5), and in humans, they mediate microtubule-dependent transport toward late endosomes [28]. However, in *E. histolytica*, suitable endosomal markers are not available and the existence of microtubules has been demonstrated only in dividing nuclei of trophozoites [49]. According to previous reports [50], MVBs-like structures could be also formed in trophozoites before erythrocytes digestion (Fig 4). Further studies are needed to deeply analyze putative MVBs in trophozoites and to precisely define the EhVps32 participation during formation of these structures.

In mammalian cells, an alternative ubiquitin-independent MVBs formation pathway has been reported, in which Alix and ESCRT-III proteins are involved [29]. In human, PAR1-activated receptor directly binds to Alix; then, Alix recruits CHMP4B and the rest of the ESCRT-III subunits, in an ubiquitin-independent manner [29]. This also could be happening in *E. histolytica*, where EhADH acts as an erythrocyte receptor by its adherence domain located at the carboxyl terminus, whereas by its Bro1 domain in the amino terminus, it recruits EhVps32 [2,13], as it has been experimentally proved by pull down experiments [16]. This interaction is also happening in resting conditions, probably it is due to constitutive endocytosis, as it has been seen in immunofluorescence and immunoprecipitation assays (Fig 2).

EhVps32 also participates during pinocytosis, co-localizing with EhADH and Gal/GalNac lectin, but not with actin (Fig 5). This is in agreement with many reports describing Vps32 participation in endocytosis [40] and with other reports indicating that actin is involved only in phagocytosis of *E. histolytica* [51].

Interestingly, EhVps32 participates in phagosomes formation since the beginning of the non-specific phagocytosis pathway, whereas EhADH participation appeared diminished there (S1 Fig). This gives further evidence of the presence of different mechanisms for cargo ingestion by trophozoites and distinct functions for both proteins in these pathways. Negatively stained preparations observed by TEM showed that rEhVps32 forms oligomers *in vitro* (Fig 6) that are similar to those formed by Vps32 protein in other cell types [47]. Recognition of these structures by α EhVps32 antibodies, confirmed the capacity of EhVps32 to form oligomers. Size exclusion chromatography corroborated that EhVps32 purified protein forms oligomers. Thus, it is logical to assume that fluorescence due to α EhVps32 antibodies, detected on phagosomes during phagocytosis, may correspond to EhVps32 oligomers *in vivo*. This assumption was strengthened by the differential arrays observed in trophozoites by confocal microscopy using α pEhVps32 and α rEhVps32 antibodies (Fig 6), that might specifically detected monomers and oligomers, respectively.

Confocal microscopy, TEM and SEM assays using *pNeoEhvps32-HA* transfected trophozoites evidenced the presence of tunnel-like and helicoidally arrays of different size (Figs 7 and 8). Some of these arrays are similar to those described for Vps32 and its homologues in other systems [46,47]. The filaments forming these structures (75–100 nm) appeared wider than the filaments formed *in vitro* by oligomerization of the purified rEhVps32 (10–75 nm). This may be explained because, *in vivo*, in addition to EhVps32, other proteins may be in these structures that were more abundant during phagocytosis, forming part of phagocytic cups and connecting phagosomes (Fig 7). Nakada-Tsukui, et al (2009) also visualized tunnel-like structures in *E. histolytica* trophozoites during phagocytosis using the PtdIns(3)P biomarker [3]. However, further studies are necessary to define the relationship of structures reported here with those reported by them.

An excess of EhVps32 in the cell and its permanent expression due to the presence of *pNeoEhvps32-HA* plasmid leads to an increase of membrane rings and filaments, whose fine structure was revealed by ultrastructural studies, in which EhVps32 was present (Fig 8). Differences in size of these arrays could be due to distinct stages of oligomerization. Growth in size and an increase in number of these structures may eventually lead to cell lysis, explaining why the *pNeoEhvps32-HA* transfection produced healthy trophozoites only until 72 h transfection. In non-transfected trophozoites, EhVps32 oligomerization may be controlled by the EhVps4 AAA ATPase activity [35], that in other eukaryotes catalyzes the dissociation of ESCRT-III components [27,28]. In *pNeoEhvps32-HA* transfected trophozoites, the excess of EhVps32 could alter the equilibrium between EhVps32 and EhVps3 AAA ATPase.

Although we cannot discard the presence of class E vacuoles formed by alterations in the phagocytosis process due to EVps32 overexpression, the membranous concentric structures found here do not seem to correspond to class E vacuoles. This assumption is based on: i) overexpression of EhVps32 promoted a higher rate of phagocytosis and did not abolish it, as it was the case for Bro1-truncated transfected trophozoites that resulted to be dominant negative mutants [16]. In these trophozoites, Bro-1 recruited important proteins for phagocytosis and led to the formation of class E vacuoles. ii) We did not detect empty phagosomes (without erythrocytes) stained by α rEhVps32 or α EhADH antibodies. iii) The novel structures described here appeared on erythrocytes-containing phagosomes of wild type and transfected trophozoites, although they are in smaller number in wild type trophozoites. v) These structures are very similar to those reported in other systems as ESCRT III structures involved in endocytosis [46]. vi) *EhVps32*-silenced G3 trophozoites exhibited a low rate of erythrophagocytosis. In addition to the low expression of EhVps32, the EhADH and actin re-localization and the morphological alterations (Fig 9), may explain this erythrophagocytosis activity.

A number of studies have identified at least 50 *Vps* genes and proteins in yeast and mammals. All they are involved in vesicle trafficking, forming complexes known as ESCRT, retromer, CORVET, HOPS, GARP and PI3K-III [52]. Except for a study where Nakada-Tsukui et al [53] have characterized a retromerlike complex formed by Vps26, Vps29 and Vps35, all them EhRab7A-binding proteins, little is known about the orthologues of *Vps* proteins in *E. histolytica*. Among proteins of ESCRT complex, only EhVps32 (in this paper, [16]), EhADH and Vps4 AAAtpase [16,35] have been studied. Therefore, it is relevant to characterize the *Vps* proteins in a unicellular organism with a very active membrane fusion and fission. Knowledge of *Vps*'s will provide a basis for understanding these events in *E. histolytica*. Learning more on the vesicular trafficking across species, starting with an antique protozoan parasite will supply a basis for further addressing specific roles of *Vps*, not only in *E. histolytica*, but also in other organisms.

In conclusion, EhVps32 is a vacuolar protein of the ESCRT-III complex that formed oligomers as it does its homologues in humans and yeast. Besides, this protein was involved in phagocytosis, interacted with EhADH in acidic vesicles, co-localized with Gal/GalNac lectin and actin and formed structures unveiled here. There are many reports on the role of Vps32 in endocytosis; however, this is the first study of the Vps32 role during phagocytosis in a unicellular eukaryotic organism, and its active participation in this event that is crucial for virulence expression of the parasite.

Materials and Methods

E. histolytica cultures

Trophozoites of *E. histolytica* (strain HM1:IMSS) clones A and G3 (kindly provided by Dr. David Mirelman, from Weizmann Institute of Science, Israel) were axenically cultured in TYI-S-33 medium at 37°C [45,54] and harvested in logarithmic growth phase. All experiments presented here were performed at least three times by duplicate. *EhVps32*-silenced G3 trophozoites were initially selected by adding 1 µg/ml of Neomycin (G418, Gibco) to the medium and then cultured in 7 µg/ml G418, before performing the experiments.

Generation of polyclonal antibodies against EhVps32

Escherichia coli BL21 (DE3) pLysS bacteria (Invitrogen) were transformed with the *pGEX-5X-1-EhVps32* plasmid containing the full open reading frame of *EhVps32* gene to produce a GST-tagged EhVps32 recombinant protein (rEhVps32), which was purified as described [16]. rEhVps32 (50 or 150 µg for each animal, respectively) emulsified in Titer-Max Classic adjuvant (Sigma) was subcutaneously and intramuscularly inoculated into Balb/cJ male mice and into New Zealand male rabbits. Two more doses of rEhVps32 (25 or 100 µg for each animal, respectively) were injected at 20 days intervals and then, animals were bled to obtain αEhVps32 antibodies; preimmune serum was obtained before immunization. Additionally, EYDRKMEMELEKAKEC polypeptide (27 to 44 residues in EhVps32) was synthesized together with KLH (Keyhole Limpet Hemocyanin) tag to increase the immunogenicity (GenScript). Rabbits were immunized with 100 µg of this polypeptide and then, they received two more immunizations (50 µg each) to generate αEhVps32 antibodies.

Cell fractionation

Trophozoites (10^8) were harvested, washed twice with 19 mM potassium phosphate buffer, pH 7.2, and 0.27 M NaCl (PD solution). Cellular pellet was resuspended to 2×10^7 cells/mL in PD solution containing 10 mM MgCl₂ and mixed with an equal volume of 1 mg/mL concanavalin

A. After 5 min, cells were spun at 50 g for 1 min. The supernatant was discarded and cellular pellet was resuspended in 12 mL of 10 mM Tris-HCl buffer, pH 7.5, containing 2 mM phenyl-methylsulfonyl fluoride (PMSF) and 1 mM MgCl₂. After 10 min swelling in hypotonic buffer, cells were homogenized by 20 strokes in a glass Dounce homogenizer with a tight-fitting pestle (Wheaton Scientific Div.). Cellular lysis and membrane sheets formation were verified by phase-contrast microscopy. The homogenate was layered over a two-step gradient consisting of 8 mL of 0.5 M mannitol over 4 mL of 0.58 M sucrose, both in Tris buffer, and spun at 250 ×g for 30 min. Material remaining at the top of 0.5 M mannitol was centrifuged at 40 000 ×g for 1 h to separate soluble molecules (cytoplasmic fraction) from small membrane fragments and vesicles (internal membranes). Large plasma membrane fragments and other heavy debris formed a tight pellet at the bottom of the gradient (crude membrane fraction). This pellet was resuspended in 1 mL Tris buffer containing 1 M α-methyl mannoside and left on ice for 40 min with occasional mixing. Plasma membranes free of concanavalin A were diluted into three volumes of Tris buffer, homogenized by 80 strokes with a glass Dounce homogenizer, layered on a 20% sucrose Tris gradient and spun for 30 min at 250 g. Vesiculated plasma membranes floating above the initial sucrose layer were collected and then concentrated by centrifugation at 40,000 g for 1 h. The pellet, enriched in plasma membranes, was resuspended in Tris buffer. All steps were performed at 4°C [55].

Western blot experiments

Trophozoites lysates (30 µg) or cytoplasmic or membrane fractions or internal membranes or plasmatic membranes obtained as described [2,55] were separated in 12% SDS-PAGE, transferred to nitrocellulose membranes and probed with mouse αEhVps32 (1:500), rabbit αpEhVps32 (1:3 000), mouse αGal/GalNac lectin (kindly given by Dr. William A. Petri Jr, University of Virginia, USA) (1:100) or mouse αactin (1:2 000) antibodies. Then, membranes were incubated with the corresponding α-mouse or α-rabbit HRP-labeled secondary antibodies (Zymed; 1:10 000), respectively, and revealed with ECL Prime western blotting detection reagent (GE-Healthcare). For some experiments, αpEhVps32 antibodies were pre-incubated overnight (ON) with 100 µg of rEhVps32 purified protein or membranes were pre-incubated with αrEhVps32 antibodies before incubation with αpEhVps32 antibodies.

Laser confocal microscopy assays

Trophozoites were grown on coverslips, fixed with 4% paraformaldehyde (PFA) at 37°C for 1 h, permeabilized with 0.2% Triton X-100 or non-permeabilized, and blocked with 10% fetal bovine serum (FBS) in PBS. Then, cells were incubated with mouse αrEhVps32 (1:100) or rabbit αpEhVps32 (1:100) antibodies, at 37°C for 1 h, followed by incubation for 1 h with α-mouse or α-rabbit FITC-labeled secondary antibodies (Zymed; 1:100), respectively. For co-localization experiments, samples were incubated first with mouse αrEhVps32 and rabbit αEhADH (1:100) or rabbit αrEhVps32 (1:100) and mouse αGal/GalNac lectin (1:25), followed by the corresponding α-mouse FITC-labeled, α-rabbit FITC-labeled, α-mouse Pacific blue-labeled, α-rabbit TRITC-labeled, α-mouse TRITC-labeled and α-rabbit Cy5 (Zymed, 1:100) secondary antibodies. For some experiments, Rhodamine-phalloidin (Sigma, 1:100) was employed to detect actin. For co-localization with Lysotracker, live trophozoites were incubated ON with 2 µM Lysotracker red (Molecular Probes) and then, with mouse αrEhVps32 antibodies as described above. In some experiments, nuclei were counterstained with 2.5 µg/ml 4', 6-diamidino-2-phenylindole (DAPI; Zymed) for 5 min. All preparations were preserved using Vectashield antifade reagent (Vector), examined through a Carl Zeiss LMS 700 confocal microscope and processed with ZEN 2009 Light Edition software (Zeiss). To quantify co-localization, 1 µm z-stacks of entire cells or an area

around plasma membrane were analyzed using the Just Another Co-localization Plugin (JACoP) [56] in the Image J 1.48i software [57]. Each point represented an average of 12–25 cells and values are given as means \pm standard error.

Phagocytosis and pinocytosis assays

Trophozoites were incubated with human erythrocytes (1:25 ratio) or with 2 μ g/ml FITC-dextran (70 kDa, Sigma) for 5, 10, 30, 45 and 60 min at 37°C and then, processed for immunofluorescence assays as described above. For erythrophagocytosis assay, hemoglobin concentration was quantified by spectrophotometry at OD₄₀₀ [50]. In parallel, samples of all interaction times were stained by 2 mg/ml 3,3' diaminobenzidine (Sigma) [58]. For other experiments, the proportion of erythrocytes inside phagosomes (decorated by α EhVps32 or α EhADH antibodies or LysoTracker or FITC-microspheres) with relation to total ingested erythrocytes per trophozoite was evaluated in at least 20 confocal images. For non-specific phagocytosis assays, trophozoites were incubated with FITC-label latex microspheres (1 μ m diameter; 1:100; Molecular Probes) at 37°C for different times and then, exhaustively washed and processed for immunofluorescence.

Immunoprecipitation assays

Trophozoites were lysed with 10 mM Tris-HCl, 50 mM NaCl and 100 mM protease inhibitors (PHMB, IA, NEM and TLCK), followed by cycles of freeze-thawing in liquid nitrogen and vortexing. In parallel, 200 μ l of recombinant protein G-agarose (rProtein-G; Invitrogen) were incubated with 100 μ g of rabbit α EhADH antibodies or preimmune serum for 2 h at 4°C, with gentle stirring. Then, rProtein-G beads were washed with 0.5% BSA in PBS, followed by additional washes with PBS for 5 min, under gentle stirring and centrifuged at 11,600 g for 2 min. Trophozoites lysates (1 mg) were pre-cleared with 200 μ l of rProtein-G (previously blocked with 2% BSA) and incubated 2 h at 4°C under gentle stirring. Samples were centrifuged at 11,600 g to obtain the supernatant that was added to rProtein-G previously incubated with antibodies. Preparations were incubated ON at 4°C and then, beads were recovered by centrifugation. After washes with PBS, 60 μ l of 4 x sample buffer (40% glycerol, 240 mM Tris-HCl pH 6.8, 8% SDS, 0.04% bromophenol blue and 5% β -mercaptoethanol) were added. Samples were boiled for 3 min and centrifuged again at 11,600 g for 2 min at 4°C. Supernatant (30 μ l) was loaded into 12% SDS-PAGE and subjected to western blot assays.

Transmission electron microscopy (TEM)

Samples were fixed with 2.5% (v/v) glutaraldehyde in 0.1M sodium cacodylate buffer, pH 7.2, for 60 min. Then, they were postfixed for 60 min with 1% (w/v) osmium tetroxide in the same buffer. After dehydration with increasing concentrations of ethanol and propylene oxide, samples were embedded in Polybed epoxy resins and polymerized at 60°C for 24 h. Thin sections (60 nm) were contrasted with uranyl acetate and lead citrate before being examined in a Joel JEM-1011 transmission electron microscope. For gold immunolabeling experiments, trophozoites were fixed with 4% PFA and 0.5% glutaraldehyde in PBS for 1 h at room temperature (RT). Samples were embedded in LR White resin (London Resin Co) and polymerized under UV at 4°C ON. Thin sections were incubated ON with mouse α EhVps32 antibodies (1:20) and then, ON at RT with α -mouse IgGs antibodies conjugated to 20 nm gold particles (Ted Pella Inc; 1:60).

Negative staining

rEhVps32 was purified as described [16] and the GST-tag was removed using Factor Xa protease (GE-Healthcare), according to manufacturer's instructions. rEhVps32 (2.5 μ g in 5 μ l) was pipetted onto the surface of the formvar-coated copper grids. After 5 min, samples were blotted off with filter paper and stained with 2.5% uranyl acetate. Grids were then left to air dry and carbon coated. In some experiments, samples were treated with α rEhVps32 antibodies, followed by gold-labeled secondary antibodies (30 nm). Preparations were examined through a JEM-1011 transmission electron microscope.

Scanning electron microscopy (SEM)

Glutaraldehyde fixed samples were dehydrated with increasing concentrations of ethanol and CO₂ critically point dried in a Samdri apparatus. Then, they were gold coated in an ion sputtering device (Jeol-JFC-1100) and examined with a Jeol JSM-7100F field emission scanning electron microscope.

Gel filtration chromatography

Purified rEhVps32 without GST-tag was subjected to size exclusion chromatography using a gel filtration column (2.5 cm x 30 cm), packed with 45 ml of Sephacryl-HR 100 (GE Healthcare), previously equilibrated with buffer A (20 mM Tris-HCl pH 8.0, 100 mM NaCl and 1 mM EDTA) and resolved at a flow rate of 1 ml/min using a NGC Q10 chromatographic system (Bio-Rad). The column was equilibrated with gel filtration standards containing thyroglobulin (670 kDa), γ -globulin (158 kDa), ovalbumin (44 kDa), myoglobin (17 kDa) and vitamin B12 (1.35 kDa) (Bio-Rad). The elution volume (V_e) of the ovalbumin, myoglobin and vitamin B12 were used to obtain the calibration curve by plotting the \log MW vs K_{av} . The elution volume of the first peak (thyroglobulin and γ -globulin) was taken as the void volume (V_0) to estimate K_{av} . Eluted fractions were separated by 12% SDS-PAGE and submitted to western blot assays, using α rEhVps32 antibodies.

Generation of *pNeoEhvps32-HA* transfected trophozoites

PCR-amplified *Ehvps32* full gene with the *hemagglutinin* (HA) tag in the 3' end were cloned into *pJET1.2/blunt* plasmid (Fermentas), accordingly to manufacturer's instructions. Then, *Ehvps32-HA* gene was subcloned into *Bam*HI and *Kpn*l sites of *pExEhNeo* (*pNeo*) plasmid [59], producing the *pNeoEhvps32-HA* construct. *E. coli* DH5 α bacteria were transformed with *pNeoEhvps32-HA* or *pNeo* plasmids. Plasmids were purified using Qiagen Midi kit (Qiagen) and automatically sequenced. To perform transfection, 3×10^5 trophozoites were cultivated ON with 5% CO₂, then, washed with M199 medium (Sigma) and incubated with M199 medium supplemented with 15% FBS. Subsequently, transfection mix (20 μ g of plasmid, 20 μ l of Superfect [Qiagen] in 100 μ l of M199 medium) was added and incubated 10 min at RT. Trophozoites were cultivated for 3 h at 37°C and 5% CO₂. Finally, cells were cooled and transferred to a tube with 10 ml of TYI pre-warmed medium and cultivated for 12 h at 37°C.

Generation of *EhVps32*-silenced trophozoites

The first 431 bp from the 5' end of the *Ehvps32* gene were PCR-amplified and cloned into *pJET1.2/blunt* plasmid and then, subcloned into *pSAP2/Gunma* plasmid, downstream of the 5' upstream segment of the *EhAp-A* gene [45], using a 5' *Stu*I site and a 3' *Sac*I site with the following primers: forward, 5'-AGCTAGGCCTATGTCTTGGTTCAGAAGAAATACT-3'; reverse, 5'-GCATGAGCTCATGTCTTGTAATCTTCACCTAAA-3' (restriction sites are

underlined). Trophozoites of G3 clone were transfected with *pSAP2/GunmaEhVps32-431* plasmid, using the Superfect-based method as stated above.

Statistical analysis

Statistical analyses were performed by t-Student test, using GraphPad Prism 5.0 software. The scores showing statistically significant differences are indicated with asterisks in the graphs. The corresponding *p* values are indicated in the figure legends.

Accession numbers

EhVps32 (C4M1A5/EHI_169820), EhVps2 (C4LZV3/EHI_194400), EhVps20 (C4MAC7/EHI_066730), EhVps22 (C4LXI0/EHI_131120), EhVps23 (C4LUR9/EHI_135460), EhVps24 (C4M2Y2/EHI_048690), EhVps26 (Q53UB0/EHI_137860), EhVps27 (C4LYX5/EHI_117910), EhVps29 (Q9BI08/EHI_025270) EhVps32 (C4M1A5/EHI_169820), EhVps35 (Q6Y0Y5/EHI_002990), EhVps36 (CALTE5/EHI_045320), EhVps37A (C4MAH4/EHI_077870), EhVps37D (C4M6J5/EHI_060400), EhHse1 (C4M9E1/EHI_091530), EhVta1 (C4M0R8/EHI_010040), EhADH112 (Q9U7F6/EHI_181220), EhCP112 (Q9U7F7/EHI_181230), Gal/Gal lectin (C4LTM0/EHI_012270), EhC2PK (C4M3C4/EHI_053060), EhCaBP1 (C4M7Q6/EHI_120900), EhAK1 (C4M9G9/EHI_105830).

Supporting Information

S1 Fig. Localization of EhVps32 and EhADH during phagocytosis of latex microspheres.

(A) Confocal microscopy of trophozoites incubated with FITC-microspheres for different times and then, treated with α EhVps32 or α EhADH antibodies, followed by incubation with TRITC-labeled secondary antibodies. Arrows: co-localization. (B) Pearson's coefficient (PC) to quantify co-localization of microspheres with EhVps32 or EhADH in the entire cell. (TIF)

S2 Fig. Confocal microscopy of EhVps32 membranous structures. Confocal microscopy images of structures recognized by α EhVps32 antibodies in *pNeoEhvps32-HA* (A-F) and *pNeo* (G-J) transfected and wild type clone A (K,L) trophozoites. (C) Different fluorescent patterns produced by α EhVps32 antibodies around erythrocytes-containing phagosomes observed in (B) were colored in yellow. PM: plasma membrane. e: erythrocytes. (TIF)

S3 Fig. Negative stain of rEhVps32 oligomers. (A-C) Negative stained preparations of EhVps32 purified protein resembling helicoidally structures. Square in (C): amplification of filaments. (TIF)

Acknowledgments

Authors are deeply grateful to Dr. William A. Petri Jr for kindly provide monoclonal antibodies against Gal/GalNac lectin, to Dr. David Mirelman for kindly giving us the G3 clone and the *pSAP2/Gunma* plasmid and to Dr. Jesus Valdes (CINVESTAV-IPN, Mexico) for his valuable help on transfection experiments. The authors are grateful to Dr. Michael Schnoor (CINVESTAV-IPN, Mexico) for critical review of this manuscript and to Tomas Sánchez, Alejandrina Reyes and Ivonne Flores for technical support.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: YAP EO AB RJR JO. Performed the experiments: YAP RJR GGR BCM ALG. Analyzed the data: YAP EO AB RJR. Contributed reagents/materials/analysis tools: EO BCM. Wrote the paper: YAP EO AB RJR.

References

- Mortimer L, Chadee K (2010) The immunopathogenesis of *Entamoeba histolytica*. *Exp Parasitol* 126: 366–380. doi: [10.1016/j.exppara.2010.03.005](https://doi.org/10.1016/j.exppara.2010.03.005) PMID: [20303955](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20303955/)
- García-Rivera G, Rodríguez MA, Ocádiz R, Martínez-López MC, Arroyo R, et al. (1999) *Entamoeba histolytica*: a novel cysteine protease and an adhesin form the 112 kDa surface protein. *Molecular Microbiology* 33: 556–568. PMID: [10417646](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10417646/)
- Nakada-Tsukui K, Okada H, Mitra BN, Nozaki T (2009) Phosphatidylinositol-phosphates mediate cytoskeletal reorganization during phagocytosis via a unique modular protein consisting of RhoGEF/DH and FYVE domains in the parasitic protozoan *Entamoeba histolytica*. *Cell Microbiol* 11: 1471–1491. doi: [10.1111/j.1462-5822.2009.01341.x](https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2009.01341.x) PMID: [19496789](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19496789/)
- Mansuri MS, Bhattacharya S, Bhattacharya A (2014) A novel alpha kinase EhAK1 phosphorylates actin and regulates phagocytosis in *Entamoeba histolytica*. *PLoS Pathog* 10: e1004411. doi: [10.1371/journal.ppat.1004411](https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004411) PMID: [25299184](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25299184/)
- Seigneur M, Mounier J, Prevost MC, Guillen N (2005) A lysine- and glutamic acid-rich protein, KERP1, from *Entamoeba histolytica* binds to human enterocytes. *Cell Microbiol* 7: 569–579. PMID: [15760457](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15760457/)
- Santi-Rocca J, Weber C, Guigon G, Sismeiro O, Coppee JY, et al. (2008) The lysine- and glutamic acid-rich protein KERP1 plays a role in *Entamoeba histolytica* liver abscess pathogenesis. *Cell Microbiol* 10: 202–217. PMID: [17711481](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17711481/)
- Vishwakarma RA, Anand MT, Arya R, Vats D, Bhattacharya A (2006) Glycosylated inositol phospholipid from *Entamoeba histolytica*: identification and structural characterization. *Mol Biochem Parasitol* 145: 121–124. PMID: [16242191](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16242191/)
- Teixeira JE, Huston CD (2008) Participation of the serine-rich *Entamoeba histolytica* protein in amebic phagocytosis of apoptotic host cells. *Infect Immun* 76: 959–966. PMID: [18086807](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18086807/)
- Laughlin RC, McGugan GC, Powell RR, Welter BH, Temesvari LA (2004) Involvement of raft-like plasma membrane domains of *Entamoeba histolytica* in pinocytosis and adhesion. *Infect Immun* 72: 5349–5357. PMID: [15322032](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15322032/)
- Petri WA Jr., Haque R, Mann BJ (2002) The bittersweet interface of parasite and host: lectin-carbohydrate interactions during human invasion by the parasite *Entamoeba histolytica*. *Annu Rev Microbiol* 56: 39–64. PMID: [12142490](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12142490/)
- Somlata, Bhattacharya S, Bhattacharya A (2011) A C2 domain protein kinase initiates phagocytosis in the protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. *Nat Commun* 2: 230. doi: [10.1038/ncomms1199](https://doi.org/10.1038/ncomms1199) PMID: [21407196](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21407196/)
- Sahoo N, Labryere E, Bhattacharya S, Sen P, Guillen N, et al. (2004) Calcium binding protein 1 of the protozoan parasite *Entamoeba histolytica* interacts with actin and is involved in cytoskeleton dynamics. *J Cell Sci* 117: 3625–3634. PMID: [15252130](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15252130/)
- Bañuelos C, García-Rivera G, Mendoza L, González-Robles A, López-Reyes I, et al. (2011) EhADH is a Bro1 domain-containing protein involved in the *Entamoeba histolytica* endocytic pathway. *Journal of Biochemistry & Cell*.
- Bañuelos C, García-Rivera G, López-Reyes I, Orozco E (2005) Functional characterization of EhADH12: An *Entamoeba histolytica* Bro1 domain-containing protein. *Exp Parasitol* 110: 292–297. PMID: [15955327](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15955327/)
- Odorizzi G, Katzmann DJ, Babst M, Audhya A, Emr SD (2003) Bro1 is an endosome-associated protein that functions in the MVB pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Sci* 116: 1893–1903. PMID: [12668726](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12668726/)
- Bañuelos C, García-Rivera G, Lopez-Reyes I, Mendoza L, Gonzalez-Robles A, et al. (2012) EhADH12 is a Bro1 domain-containing protein involved in the *Entamoeba histolytica* multivesicular bodies pathway. *J Biomed Biotechnol* 2012: 657942. doi: [10.1155/2012/657942](https://doi.org/10.1155/2012/657942) PMID: [22500103](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22500103/)
- Rothman JH, Howald I, Stevens TH (1989) Characterization of genes required for protein sorting and vacuolar function in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J* 8: 2057–2065. PMID: [2676511](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2676511/)
- Morita E, Sandrin V, Chung HY, Morham SG, Gygi SP, et al. (2007) Human ESCRT and ALIX proteins interact with proteins of the midbody and function in cytokinesis. *EMBO J* 26: 4215–4227. PMID: [17853893](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17853893/)

19. Guizetti J, Schemmelle L, Mantler J, Maar S, Poser I, et al. (2011) Cortical constriction during abscission involves helices of ESCRT-III-dependent filaments. *Science* 331: 1616–1620. doi: [10.1126/science.1201847](https://doi.org/10.1126/science.1201847) PMID: [21310966](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21310966/)
20. Rusten TE, Vaccari T, Stenmark H (2011) Shaping development with ESCRTs. *Nat Cell Biol* 14: 38–45. doi: [10.1038/ncb2381](https://doi.org/10.1038/ncb2381) PMID: [22193162](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22193162/)
21. Fairn GD, Grinstein S (2012) How nascent phagosomes mature to become phagolysosomes. *Trends Immunol* 33: 397–405. doi: [10.1016/j.it.2012.03.003](https://doi.org/10.1016/j.it.2012.03.003) PMID: [22560866](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22560866/)
22. Dunn KW, McGraw TE, Maxfield FR (1989) Iterative fractionation of recycling receptors from lysosomally destined ligands in an early sorting endosome. *J Cell Biol* 109: 3303–3314. PMID: [2600137](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2600137/)
23. Piper RC, Luzio JP (2001) Late endosomes: sorting and partitioning in multivesicular bodies. *Traffic* 2: 612–621. PMID: [11555415](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11555415/)
24. Gruenberg J, Griffiths G, Howell KE (1989) Characterization of the early endosome and putative endocytic carrier vesicles in vivo and with an assay of vesicle fusion in vitro. *J Cell Biol* 108: 1301–1316. PMID: [2538480](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2538480/)
25. Curtiss M, Jones C, Babst M (2007) Efficient cargo sorting by ESCRT-I and the subsequent release of ESCRT-I from multivesicular bodies requires the subunit Mvb12. *Mol Biol Cell* 18: 636–645. PMID: [17135292](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17135292/)
26. Babst M, Katzmann DJ, Snyder WB, Wendland B, Emr SD (2002) Endosome-associated complex, ESCRT-II, recruits transport machinery for protein sorting at the multivesicular body. *Dev Cell* 3: 283–289. PMID: [12194858](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12194858/)
27. Obita T, Saksena S, Ghazi-Tabatabai S, Gill DJ, Perisic O, et al. (2007) Structural basis for selective recognition of ESCRT-III by the AAA ATPase Vps4. *Nature* 449: 735–739. PMID: [17928861](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17928861/)
28. Lata S, Schoehn G, Solomons J, Pires R, Gottlinger HG, et al. (2009) Structure and function of ESCRT-III. *Biochem Soc Trans* 37: 156–160. doi: [10.1042/BST0370156](https://doi.org/10.1042/BST0370156) PMID: [19143622](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19143622/)
29. Dores MR, Chen B, Lin H, Soh UJ, Paing MM, et al. (2012) ALIX binds a YPX(3)L motif of the GPCR PAR1 and mediates ubiquitin-independent ESCRT-III/MVB sorting. *J Cell Biol* 197: 407–419. doi: [10.1083/jcb.201110031](https://doi.org/10.1083/jcb.201110031) PMID: [22547407](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22547407/)
30. Winter V, Hauser MT (2006) Exploring the ESCRTing machinery in eukaryotes. *Trends Plant Sci* 11: 115–123. PMID: [16488176](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16488176/)
31. Teis D, Saksena S, Emr SD (2008) Ordered assembly of the ESCRT-III complex on endosomes is required to sequester cargo during MVB formation. *Dev Cell* 15: 578–589. doi: [10.1016/j.devcel.2008.08.013](https://doi.org/10.1016/j.devcel.2008.08.013) PMID: [18854142](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18854142/)
32. Katoh K, Shibata H, Hatta K, Maki M (2004) CHMP4b is a major binding partner of the ALG-2-interacting protein Alix among the three CHMP4 isoforms. *Arch Biochem Biophys* 421: 159–165. PMID: [14678797](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14678797/)
33. Babst M, Katzmann DJ, Estepa-Sabal EJ, Meerloo T, Emr SD (2002) Escrt-III: an endosome-associated heterooligomeric protein complex required for mvb sorting. *Dev Cell* 3: 271–282. PMID: [12194857](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12194857/)
34. López-Reyes I, Bañuelos C, Betanzos A, Orozco E (2011) A bioinformatical approach to study the endosomal sorting complex required for transport (ESCRT) machinery in protozoan parasites: the *Entamoeba histolytica* case. In: Mahdavi MA, editor. *Bioinformatics*. Second ed. Rijeka, Croatia: Intech Open Access Publisher. pp. 289–312.
35. López-Reyes I, García-Rivera G, Bañuelos C, Herranz S, Vincent O, et al. (2010) Detection of the Endosomal Sorting Complex Required for Transport in *Entamoeba histolytica* and Characterization of the EhVps4 Protein. *J Biomed Biotechnol* 2010: 890674. doi: [10.1155/2010/890674](https://doi.org/10.1155/2010/890674) PMID: [20508821](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20508821/)
36. Petri WA Jr., Jackson TF, Gathiram V, Kress K, Saffer LD, et al. (1990) Pathogenic and nonpathogenic strains of *Entamoeba histolytica* can be differentiated by monoclonal antibodies to the galactose-specific adherence lectin. *Infect Immun* 58: 1802–1806. PMID: [1692809](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1692809/)
37. Marion S, Laurent C, Guillen N (2005) Signalization and cytoskeleton activity through myosin IB during the early steps of phagocytosis in *Entamoeba histolytica*: a proteomic approach. *Cell Microbiol* 7: 1504–1518. PMID: [16153248](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16153248/)
38. Arroyo R, Orozco E (1987) Localization and identification of an *Entamoeba histolytica* adhesin. *Mol Biochem Parasitol* 23: 151–158. PMID: [2883572](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2883572/)
39. Scott CC, Vacca F, Gruenberg J (2014) Endosome maturation, transport and functions. *Semin Cell Dev Biol* 31C: 2–10.
40. Weiss P, Huppert S, Kolling R (2009) Analysis of the dual function of the ESCRT-III protein Snf7 in endocytic trafficking and in gene expression. *Biochem J* 424: 89–97. doi: [10.1042/BJ20090957](https://doi.org/10.1042/BJ20090957) PMID: [19725809](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19725809/)

41. Henne WM, Buchkovich NJ, Zhao Y, Emr SD (2012) The endosomal sorting complex ESCRT-II mediates the assembly and architecture of ESCRT-III helices. *Cell* 151: 356–371. doi: [10.1016/j.cell.2012.08.039](https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.08.039) PMID: [23063125](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23063125/)
42. Shim S, Kimpler LA, Hanson PI (2007) Structure/function analysis of four core ESCRT-III proteins reveals common regulatory role for extreme C-terminal domain. *Traffic* 8: 1068–1079. PMID: [17547705](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17547705/)
43. Henne WM, Stenmark H, Emr SD (2013) Molecular mechanisms of the membrane sculpting ESCRT pathway. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 5.
44. Bajorek M, Schubert HL, McCullough J, Langelier C, Eckert DM, et al. (2009) Structural basis for ESCRT-III protein autoinhibition. *Nat Struct Mol Biol* 16: 754–762. doi: [10.1038/nsmb.1621](https://doi.org/10.1038/nsmb.1621) PMID: [19525971](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19525971/)
45. Bracha R, Nuchamowitz Y, Mirelman D (2003) Transcriptional silencing of an amoebapore gene in *Entamoeba histolytica*: molecular analysis and effect on pathogenicity. *Eukaryot Cell* 2: 295–305. PMID: [12684379](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12684379/)
46. Shen QT, Schuh AL, Zheng Y, Quinney K, Wang L, et al. (2014) Structural analysis and modeling reveals new mechanisms governing ESCRT-III spiral filament assembly. *J Cell Biol* 206: 763–777. doi: [10.1083/jcb.201403108](https://doi.org/10.1083/jcb.201403108) PMID: [25202029](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25202029/)
47. Hanson PI, Roth R, Lin Y, Heuser JE (2008) Plasma membrane deformation by circular arrays of ESCRT-III protein filaments. *J Cell Biol* 180: 389–402. doi: [10.1083/jcb.200707031](https://doi.org/10.1083/jcb.200707031) PMID: [18209100](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18209100/)
48. Okada M, Huston CD, Oue M, Mann BJ, Petri WA Jr., et al. (2006) Kinetics and strain variation of phagosome proteins of *Entamoeba histolytica* by proteomic analysis. *Mol Biochem Parasitol* 145: 171–183. PMID: [16290089](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16290089/)
49. Orozco E, Solis FJ, Dominguez J, Chavez B, Hernandez F (1988) *Entamoeba histolytica*: cell cycle and nuclear division. *Exp Parasitol* 67: 85–95. PMID: [2901981](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2901981/)
50. Mora-Galindo J, Gutierrez-Lozano M, Anaya-Velazquez F (1997) *Entamoeba histolytica*: kinetics of hemolytic activity, erythrophagocytosis and digestion of erythrocytes. *Arch Med Res* 28 Spec No: 200–201. PMID: [9033071](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9033071/)
51. Labruyere E, Guillen N (2006) Host tissue invasion by *Entamoeba histolytica* is powered by motility and phagocytosis. *Arch Med Res* 37: 253–258. PMID: [16380326](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16380326/)
52. Li Z, Blissard G (2014) The vacuolar protein sorting genes in insects: A comparative genome view. *Insect Biochem Mol Biol*.
53. Nakada-Tsukui K, Saito-Nakano Y, Ali V, Nozaki T (2005) A retromerlike complex is a novel Rab7 effector that is involved in the transport of the virulence factor cysteine protease in the enteric protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. *Mol Biol Cell* 16: 5294–5303. PMID: [16120649](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16120649/)
54. Diamond LS, Harlow DR, Cunnick CC (1978) A new medium for the axenic cultivation of *Entamoeba histolytica* and other *Entamoeba*. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 72: 431–432. PMID: [212851](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/212851/)
55. Aley SB, Scott WA, Cohn ZA (1980) Plasma membrane of *Entamoeba histolytica*. *J Exp Med* 152: 391–404. PMID: [6249883](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/6249883/)
56. Bolte S, Cordelières FP (2006) A guided tour into subcellular colocalization analysis in light microscopy. *J Microsc* 224: 213–232. PMID: [17210054](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17210054/)
57. Schneider CA, Rasband WS, Eliceiri KW (2012) NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat Methods* 9: 671–675. PMID: [22930834](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22930834/)
58. Vacca LL, Hewett D, Woodson G (1978) A comparison of methods using diaminobenzidine (DAB) to localize peroxidases in erythrocytes, neutrophils, and peroxidase-antiperoxidase complex. *Stain Technol* 53: 331–336. PMID: [89720](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/89720/)
59. Hamann L, Nickel R, Tannich E (1995) Transfection and continuous expression of heterologous genes in the protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92: 8975–8979. PMID: [7568055](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7568055/)