

**Centro de Investigación y de Estudios  
Avanzados del Instituto Politécnico Nacional**

**Unidad Zacatenco  
Departamento de Biología Celular**

**“Implementación de metodología *in silico*  
para la caracterización de la subunidad  
19S del proteosoma en trofozoítos del  
género *Naegleria*”**

**TESIS**

**Que presenta  
Biol. Itzel Citlalli Rubio Gutiérrez**

**Para obtener el grado de:**

**MAESTRA EN CIENCIAS EN LA ESPECIALIDAD DE  
BIOLOGÍA CELULAR**

**Directores de tesis  
Dra. Matilde Mineko Shibayama Salas †  
Dr. José de Jesús Serrano Luna**

**Ciudad de México**

**Julio 2021**

## **AGRADECIMIENTOS**

Quiero agradecer al Consejo de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo económico (CVU: 997938) que me brindó durante la realización de este proyecto. Agradezco al Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV), esta institución de enorme calidad, que me otorgó todo el apoyo durante mi estancia.

Quiero agradecerle a mi tutor y director de tesis, el Dr. José de Jesús Serrano Luna y a mi cotutora, la Dra. Matilde Mineko Shibayama Salas (QEPD) por aceptarme en ser parte de este proyecto y por todos sus conocimientos invaluable que me brindaron para realizar esta investigación. También quiero agradecer a la Dra. Paula Gabriela Guzmán Téllez por todo el apoyo y conocimiento brindado en la realización de mi proyecto. Gracias por la ayuda y confianza en mi depositada aún a la distancia en estos momentos de pandemia.

Agradezco a los miembros de mi comité la Dra. Guadalupe Mireya de la Garza Amaya y el Dr. José Eduardo Pérez Salazar, por sus valiosas contribuciones que realizaron al trabajo final y por su tiempo que dedicaron en revisarlo. De igual forma agradezco a todos los docentes del departamento de Biología celular por sus conocimientos brindados durante mi estancia en la institución. También a mis compañeros de maestría por los momentos agradables que tuvimos.

Agradezco a mi familia: mis tíos Antonino, Socorro, Lupita Gutiérrez e Isaura Garay, a mis primos Orlando Ponce y Braian Gutiérrez y mis abuelos Carmen Cuevas y Héctor Gutiérrez (QEPD), así como a toda la familia Rubio Rubio por todo el sostén brindado para lograr culminar mis estudios.

Un agradecimiento especial a mis padres Moisés Rubio y Raquel Gutiérrez por su apoyo y confianza incondicional tanto moral como económica, por educarme y por convertirme en la persona que soy en la actualidad; muchos de mis logros se los debo a ustedes entre los que se incluye este. A mis hermanos Héctor Alonso y Juan Carlos Rubio por todo su apoyo, comprensión, cariño y por estar en los momentos más importantes de mi vida.

# ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS	5
ÍNDICE DE TABLAS	6
RESUMEN	7
ABSTRACT	8
INTRODUCCIÓN	9
Género Naegleria	9
Meningoencefalitis amibiana primaria (MAP)	11
Mecanismos de patogenicidad de <i>N. fowleri</i>	15
Respuesta inmune	19
Vía ubiquitina-proteosoma (UPP)	21
Mecanismo de señalización	22
Enzima E1	23
Enzima E2	23
Enzima E3	24
Proteosoma	25
Proteosoma 20S	26
Estructura	26
Actividad hidrolítica	28
Tipos de proteosoma 20S (núcleos hidrolíticos)	29
Proteosoma 19S	29
Funciones	30
Estructura: Tapa	30
Estructura: Base	31
Conservación del proteosoma 19S	34
Modificaciones postraduccionales en el proteosoma 19S	35
ANTECEDENTES DIRECTOS	36
JUSTIFICACIÓN	40
HIPÓTESIS	41
OBJETIVO GENERAL	42
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	42
METODOLOGÍA EXPERIMENTAL	43

Análisis <i>in silico</i> de la secuencia y estructura tridimensional de las subunidades de la partícula regulatoria 19S en amibas del género <i>Naegleria</i> .....	43
Identificación de las secuencias putativas para las subunidades del proteosoma 19S en <i>Naegleria</i> spp. ....	43
Búsqueda de homología y similitud de las subunidades del proteosoma 19S de <i>Naegleria</i> spp. comparado con organismos modelo .....	43
Localización de los dominios característicos de las subunidades del proteosoma 19S en las secuencias putativas de <i>Naegleria</i> spp. ....	44
Identificación de modificaciones postraduccionales en las subunidades del proteosoma 19S en <i>Naegleria</i> spp. ....	44
Modelamiento tridimensional de las subunidades del proteosoma 19S de <i>Naegleria</i> spp. ....	45
Análisis <i>in silico</i> de la secuencia y estructura tridimensional del dominio PRU de la subunidad Rpn13 de la partícula regulatoria 19S en amibas del género <i>Naegleria</i> .....	45
Análisis <i>in silico</i> de la secuencia y estructura tridimensional de la proteína ubiquitina en amibas del género <i>Naegleria</i> .....	46
RESULTADOS .....	47
Homología de las subunidades no ATPasas y ATPasas en <i>Naegleria</i> spp. comparadas con los organismos modelo <i>H. sapiens</i> y <i>S. cerevisiae</i> .....	47
Análisis <i>in silico</i> del dominio PRU de la subunidad putativa Rpn13 del complejo regulatorio en <i>Naegleria</i> spp .....	50
Alineamiento por conservación de las secuencias de la partícula regulatoria 19S entre <i>H. sapiens</i> , <i>S. cerevisiae</i> , <i>N. fowleri</i> y <i>N. gruberi</i> .....	54
Identificación de dominios en las subunidades putativas de la partícula regulatoria de <i>Naegleria</i> spp. ....	57
Búsqueda de modificaciones postraduccionales presentes en las secuencias de las subunidades de la partícula regulatoria en <i>Naegleria</i> spp .....	62
Modelamiento tridimensional de las subunidades no ATPasas y ATPasas putativas del proteosoma 19s en amibas del género <i>Naegleria</i> .....	65
Análisis <i>in silico</i> de la proteína ubiquitina putativa de las amibas del género <i>Naegleria</i> .....	69
DISCUSIÓN .....	76
CONCLUSIÓN .....	83
PERSPECTIVAS .....	84
BIBLIOGRAFÍA .....	85
TABLAS SUPLEMENTARIAS .....	99

# ÍNDICE DE FIGURAS

Fig. 1. Ciclo de vida de <i>N. fowleri</i> .....	10
Fig. 2. Ruta de infección de <i>N. fowleri</i> .....	12
Fig. 3. Mecanismo de ubiquitinación de proteínas.....	22
Fig. 4. Representación esquemática del proteosoma 26S.....	26
Fig. 5. Representación esquemática del proteosoma 20S.....	27
Fig. 6. Posición de los centros catalíticos en el núcleo del proteosoma 20S.....	28
Fig. 7. Representación esquemática del proteosoma 19S.....	29
Fig. 8. Alineamiento por conservación del dominio PRU (Rpn13) del proteosoma 19S .....	52
Fig. 9. Conservación de motivos de interacción del dominio PRU (Rpn13) del proteosoma 19S .....	52
Fig. 10. Alineamiento tridimensional del dominio PRU (Rpn13) de <i>Naegleria</i> spp.....	53
Fig. 11. Alineamiento por conservación de las subunidades no ATPasas del proteosoma 19S .....	55
Fig. 12. Alineamiento por conservación de las subunidades ATPasas del proteosoma 19S.....	56
Fig. 13. Alineamiento estructural de la subunidad Rpn10.....	65
Fig. 14. Alineamiento estructural de la subunidad Rpn11.....	66
Fig. 15. Alineamiento estructural de la subunidad Rpn13.....	66
Fig. 16. Alineamiento estructural de la subunidad Rpt2.....	67
Fig. 17. Alineamiento estructural de la subunidad Rpt3.....	68
Fig. 18. Alineamiento estructural de la subunidad Rpt5.....	68
Fig. 19. Alineamiento por conservación de la proteína ubiquitina .....	70
Fig. 20. Residuos de importancia que presentan las secuencias de la ubiquitina en <i>N. gruberi</i> y <i>N. fowleri</i> comparada con los organismos <i>H. sapiens</i> y <i>S. cerevisiae</i> .....	72
Fig. 21. Alineamiento tridimensional de la proteína ubiquitina .....	73
Fig. 22. Estructura secundaria y predicción del desorden de la proteína ubiquitina .....	74
Fig. 23. Templados para la estructura secundaria y predicción del desorden de la proteína ubiquitina.....	75

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Dominios y motivos presentes en las subunidades del proteosoma 19S de <i>H. sapiens</i> y <i>S. cerevisiae</i> .....	33
Tabla 2. Porcentajes de identidad y similitud entre las subunidades ATPasas y no ATPasas de la partícula regulatoria de <i>N. fowleri</i> y <i>N. gruberi</i> en comparación con <i>H. sapiens</i> .....	48
Tabla 3. Porcentajes de identidad y similitud entre las subunidades ATPasas y no ATPasas de la partícula regulatoria de <i>N. fowleri</i> y <i>N. gruberi</i> en comparación con <i>S. cerevisiae</i> .....	49
Tabla 4. Porcentajes de identidad y similitud entre la subunidad Rpn13 de la partícula regulatoria de <i>N. fowleri</i> y <i>N. gruberi</i> en comparación con <i>S. cerevisiae</i> . .....	50
Tabla 5. Porcentajes de identidad y similitud entre el dominio PRU de la subunidad Rpn13 de la partícula regulatoria de <i>N. fowleri</i> y <i>N. gruberi</i> en relación con los organismos modelos .....	51
Tabla 6. Dominios característicos encontrados en las subunidades no ATPasas de la partícula regulatoria 19S de <i>N. fowleri</i> y <i>N. gruberi</i> .....	58
Tabla 7. Dominios característicos encontrados en las subunidades ATPasas de la partícula regulatoria 19S de <i>N. fowleri</i> y <i>N. gruberi</i> .....	60
Tabla 8. Dominio “Coiled Coil” encontrado en las subunidades ATPasas de la partícula regulatoria 19S de <i>N. fowleri</i> y <i>N. gruberi</i> .....	62
Tabla 9. Modificaciones postraduccionales encontradas en las subunidades no ATPasas de la partícula regulatoria 19S de <i>N. fowleri</i> y <i>N. gruberi</i> .....	63
Tabla 10. Modificaciones postraduccionales encontradas en las subunidades ATPasas de la partícula regulatoria 19S de <i>N. fowleri</i> y <i>N. gruberi</i> .....	64
Tabla 11. Porcentajes de identidad y similitud entre la proteína ubiquitina de <i>N. fowleri</i> y <i>N. gruberi</i> en relación con los organismos modelos.....	69
Tabla 12. Dominios encontrados en la proteína ubiquitina de <i>N. fowleri</i> y <i>N. gruberi</i> en relación con los organismos modelos.....	70

## RESUMEN

Las amibas del género *Naegleria* pertenecen al grupo de las amibas de vida libre, consideradas microorganismos anfizoicos y ubicuos. Este género se encuentra conformado por alrededor de 47 especies, dentro de las cuales destacan la amiba no patógena *Naegleria gruberi* reportada como modelo de estudio de diferenciación celular, y *Naegleria fowleri* única especie patógena para el ser humano que ocasiona una enfermedad altamente mortal y para la cual no existe tratamiento específico, denominada meningoencefalitis amibiana primaria (MAP).

Por otra parte, el proteosoma 26S es el complejo catalítico de reciclamiento y degradación de proteínas intracelulares más importante en células eucariotas. Éste se encuentra conformado por un núcleo catalítico o proteosoma 20S y una partícula reguladora o proteosoma 19S. Este último se encarga de reconocer y procesar proteínas ubiquitinadas, así como dirigir las hacia el sitio de degradación. El proteosoma 26S ha sido caracterizado en diversos protozoarios patógenos, encontrando componentes tanto del proteosoma 20S como del 19S; sin embargo, en el género *Naegleria* solo se ha descrito al núcleo catalítico 20S. Por lo tanto, el objetivo de este proyecto fue demostrar la presencia de las subunidades del complejo regulador 19S en *N. fowleri* y *N. gruberi*, utilizando un análisis *in silico*. Por medio de análisis bioinformáticos y a partir de secuencias en organismos modelo, se estableció la presencia y homología de las subunidades no ATPasas (Rpn10, Rpn11 y Rpn13), ATPasas (Rpt2, Rpt3 y Rpt5) y de la proteína ubiquitina en estas amibas. Además, se investigó la presencia de dominios, motivos y modificaciones postraduccionales característicos de cada subunidad o proteína analizada; y finalmente se realizó la predicción y alineamiento estructural de cada una de ellas.

Con base en los resultados obtenidos, se concluyó que *N. fowleri* y *N. gruberi*, presentan subunidades putativas del proteosoma 19S, las cuales tienen las características, tanto de secuencia como estructurales necesarias para el funcionamiento del complejo. Asimismo, ambas amibas cuentan con la ubiquitina, indispensable para el reconocimiento de las proteínas sustrato de la actividad de este complejo.

## ABSTRACT

Amoebae of the *Naegleria* genus belong to the group of free-living amoebae, considered amphizoic and ubiquitous microorganisms. This genus includes around of 47 species, among which stand out the non-pathogenic amoeba *Naegleria gruberi*, reported as a study model of cell differentiation, and *Naegleria fowleri*, the only pathogenic species for humans that causes a highly fatal disease and for which there is no specific treatment, named primary amoebic meningoencephalitis (PAM).

On the other hand, the 26S proteasome is the most important catalytic complex for the recycling and degradation of intracellular proteins in eukaryotic cells. This is comprised of a catalytic nucleus or 20S proteasome and a regulatory particle or 19S proteasome. The latter is responsible for recognizing and processing ubiquitinated proteins, as well as directing them to the degradation site. The 26S proteasome has been characterized in various pathogenic protozoa, finding components of both the 20S and 19S proteasomes; however, only the 20S catalytic core has been described in the *Naegleria* genus. Therefore, the aim of this project was to demonstrate the presence of the 19S regulatory complex subunits in *N. fowleri* and *N. gruberi*. Through bioinformatic analysis and from sequences in model organisms, the presence and homology of non-ATPase subunits (Rpn10, Rpn11 and Rpn13), ATPases (Rpt2, Rpt3 and Rpt5) and of the ubiquitin protein in these amoebas were established. In addition, the presence of domains, motifs and post-translational modifications characteristic of each subunit or protein analyzed was investigated; and finally, the prediction and structural alignment of each of them was performed.

Based on the results obtained, it was concluded that *N. fowleri* and *N. gruberi* present putative subunits of the 19S proteasome. These subunits have the necessary sequence and structural characteristics for the functioning of the protein complex. Likewise, both amoebas have ubiquitin, essential for the recognition of substrate proteins for the activity of this complex.

# INTRODUCCIÓN

## Amibas de vida libre

Las amibas de vida libre (AVL) son protozoarios que se encuentran en cuerpos de agua dulce o salada, suelo y en partículas suspendidas de agua y suelo presentes en aire (Trabelsi *et al.*, 2012). Existen diversos géneros pertenecientes a estas amibas, sin embargo, solo algunos de éstos contienen microorganismos patógenos (*Acanthamoeba* spp, *Balamuthia mandrillaris*, *Sapinia pedata*, *Naegleria fowleri*) debido a que causan infecciones en otros organismos y al ser humano (Visvesvara *et al.*, 2007; Król-Turmińska y Olender, 2017). Las amibas de estos cuatro géneros causan infecciones agudas y fatales del sistema nervioso central (SNC), aunque también pueden ocasionar infecciones de la piel, ojos, senos nasales, pulmones y riñones. Estas patologías humanas son raras, sin embargo, han sido reportadas a nivel mundial y su mayor preocupación es la elevada tasa de mortalidad que presentan las personas infectadas, así como la falta de un tratamiento específico (Schuster y Visvesvara, 2004; Król-Turmińska y Olender, 2017).

## Género *Naegleria*

Las amibas de vida libre del género *Naegleria* se encuentran distribuidas principalmente en cuerpos de agua dulce como ríos, lagos, canales de riego, balnearios, manantiales geotérmicos y suministros de agua domésticos no tratados, entre otros, (Siddiqui *et al.*, 2016). Este protozoario, a diferencia de los otros géneros de amibas de vida libre tiene la característica de ser ameboflagelado, esto quiere decir que tiene una fase flagelada transitoria junto con estadios de trofozoíto y quiste en su ciclo de vida (Visvesvara *et al.*, 2007). Su fase de trofozoíto es ameboide, mide aproximadamente de 10-25  $\mu\text{m}$  y se caracteriza por tener un solo núcleo con un nucleolo prominente; además las mitocondrias presentan una característica forma de campana o bien se observan alargadas, y su locomoción se realiza por medio de lobopodios presentes en el extremo anterior (Marciano-Cabral, 1988; Visvesvara *et al.*, 2007). Se alimenta de bacterias y de restos celulares, y se reproduce por fisión binaria por medio de mitosis intranuclear conocida como criptomitosis (Marciano-Cabral, 1988; González-Robles *et al.*, 2009). Cuando la concentración iónica del medio, pH o temperatura cambian, el trofozoíto se

transforma a su fase flagelada (Marciano-Cabral, 1988). El flagelado también presenta un solo núcleo con un nucleolo grande, suele ser piriforme, con un tamaño de 10–16  $\mu\text{m}$  y generalmente es biflagelado (Oddó, 2006; Chalmers, 2014). Por otro lado, el enquistamiento ocurre cuando las condiciones de crecimiento son adversas (alimento escaso o hábitat seco), permitiéndole a la amiba sobrevivir al estrés ambiental (ej. Desección) (De Jonckheere, 2011; Chalmers, 2014). La fase de quiste es esférica con un diámetro de 8-12  $\mu\text{m}$ , presenta un solo núcleo y una pared quística protectora que contiene poros u ostiolos (Fig. 1) (Oddó, 2006; Fouque *et al.*, 2012). Entre los componentes de la pared del quiste se ha descrito experimentalmente la presencia de la enzima enolasa y existen trabajos que señalan que está conformada de quitina (Chávez-Munguía *et al.*, 2011; Fouque *et al.*, 2012). En algunas especies como en *N. gruberi* esta pared cuenta con una doble capa (ectoquiste de 25nm y endoquiste de 200 a 450 nm de espesor). En cambio, especies como *N. fowleri* y *N. jadini* presentan la capa externa de la pared muy delgada dando la apariencia de que no se encuentra; sin embargo se ha logrado observar como una capa delgada completa con apariencia fibrilar (Schuster, 1975; Chávez-Munguía *et al.*, 2009). Además, el número de poros presente en la pared consituye una diferencia morfológica principal entre los quistes de las especies de *Naegleria* (Chávez-Munguía *et al.*, 2009; Fouque *et al.*, 2012). Las fases de flagelado y quiste solo se han reportado en el ambiente, mientras que los trofozoítos son los únicos observados en los tejidos, siendo esta última su fase infectiva (Martínez *et al.*, 1971; Ferrante, 1991).

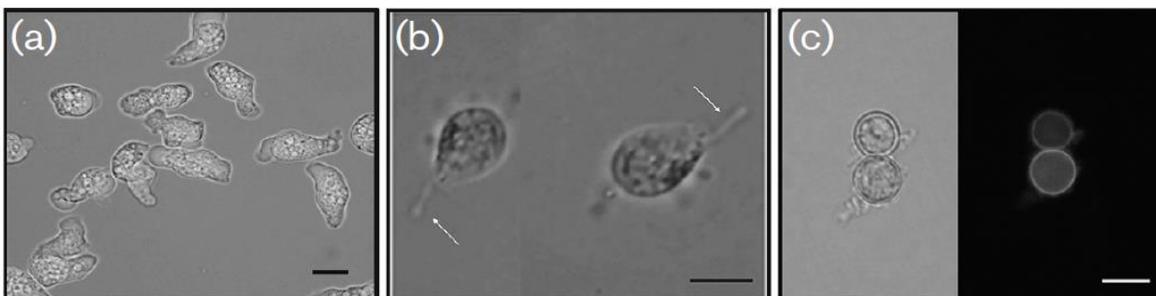


Fig. 1. Ciclo de vida de *N. fowleri*

(a) Morfología típica de un trofozoíto de *N. fowleri*. (b) Biflagelados piriformes característicos del género. Flagelos señalados con flechas. (c) Quistes de *N. fowleri*. Se observa la doble pared típica.

El género *Naegleria* comprende aproximadamente 47 especies diferentes, de las cuales, tres son consideradas patógenas: *N. australiensis* y *N. italica* que provocan infecciones en ratones que son utilizados como modelos experimentales, mientras que *N. fowleri* es conocida por causar una infección del sistema nervioso central (SNC) altamente mortal en humanos denominada meningoencefalitis amibiana primaria (MAP) (De Jonckheere, 2002; Trabelsi *et al.*, 2012; De Jonckheere, 2014). Dentro de este mismo género, la especie *N. gruberi* es inofensiva siendo la cepa NEG-M la primera especie de este género con el genoma completamente secuenciado. Además, es comúnmente ocupada como modelo de estudio para observar el ensamblaje flagelar y del cuerpo basal *de novo*, esto debido a que el tiempo de diferenciación de trofozoíto a flagelado es muy corto (<1,5h) (Fritz-Laylin *et al.*, 2010; Fritz-Laylin *et al.*, 2011).

### **Meningoencefalitis amibiana primaria (MAP)**

*N. fowleri* causa una infección aguda, necrosante y hemorrágica, conocida como meningoencefalitis amibiana primaria (MAP), la cual es una enfermedad fatal que puede llevar al individuo a la muerte entre el 5° al 8° día después del contacto inicial con el patógeno, teniendo una tasa de mortalidad aproximada del 98% (Heggie, 2010). Por lo general ocurre en niños y adultos jóvenes inmunocompetentes con historia reciente de natación, por lo que *N. fowleri* no es considerada como un patógeno oportunista (Marciano-Cabral, 1988; Visvesvara *et al.*, 2007). La MAP se presenta cuando los trofozoítos entran al organismo a través de la cavidad nasal, penetran el neuroepitelio olfatorio, migran a través de los nervios olfatorios y cruzan la placa cribiforme hasta alcanzar los bulbos olfatorios (BO) (Fig.2), en donde causan un cuadro de meningoencefalitis caracterizado macroscópicamente por edema cerebral, resultando en una hernia cerebelosa. Además, los bulbos olfatorios y las cortezas orbitofrontales se vuelven necróticos y hemorrágicos. (Siddiqui y Khan, 2014; Martínez-Castillo *et al.*, 2016).

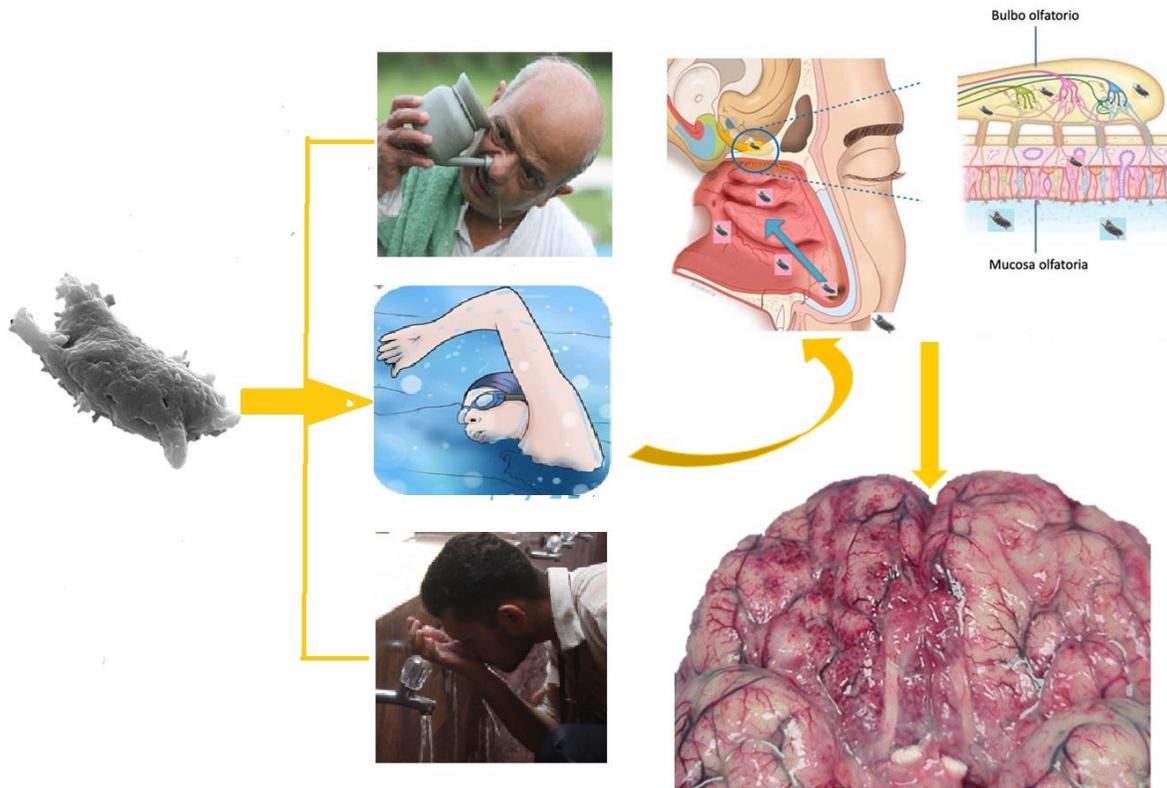


Fig.2. Ruta de infección de *N. fowleri*

Tomada y modificada: Siddiqui y Khan, 2014; <https://www.elsevier.es/es-revista-medicina-clinica-2-avance-resumen-perdida-del-sentido-del-olfato->

Los síntomas que se presentan no son considerados específicos para esta infección lo que puede generar confusión con meningitis de origen bacteriano o viral. En los primeros días involucran dolor de cabeza, fiebre de 39°C a 41°C, náuseas, vómito en proyectil, alteraciones en el gusto y olfato, rigidez en la nuca, signos de Kernig y Brudzinski positivos y fotofobia. Los síntomas y signos generalmente continúan con confusión, convulsiones y finalmente sobreviene el coma (Heggie, 2010). En algunos casos se han reportado anomalías del ritmo cardíaco y necrosis del miocardio, así como aumento en la presión intracraneal y del líquido cefalorraquídeo (LCR), siendo estos dos últimos los que llevan al deceso del individuo (Grace *et al.*, 2015; Gharpure *et al.*, 2020).

*N. fowleri* ha sido detectada en todos los continentes excepto en la Antártida, sin embargo, los casos de MAP se han reportado principalmente en zonas templadas

(De Jonckheere, 2011). A pesar de esto, los periodos prolongados de calor así como las sequias que ocurren con mayor frecuencia debido al cambio climático, están provocando un aumento en la temperatura del agua dulce incrementado a su vez la densidad de amibas presentes en los cuerpos de agua; lo que conlleva a un aumento en los factores de riesgo para contraer MAP debido a la inhalación profunda por las fosas nasales de agua contaminada durante las actividades recreativas o mediante la práctica de rituales religiosos como la ablución, e incluso usando técnicas de intervención terapéutica como los lavados nasales que utilizan algunas personas para aliviar molestias como sinusitis, rinorrea y congestión nasal (Fig.2) (Siddiqui y Khan, 2014). Hasta principios del año 2020 se contabilizaban 381 casos a nivel mundial, siendo Estados Unidos de América (E.U.A.) el que presenta el mayor número de casos con 156, seguido de Pakistán con 41 casos, mientras que en México se tienen identificados 33 (Gharpure *et al.*, 2020). Hasta el momento se conocen ocho tipos diferentes de *N. fowleri* caracterizados utilizando espaciadores transcritos internos (ITS) y secuencias de ADNr 5.8S, los cuales presentan una distribución desigual entre los continentes. En Oceanía y Japón se encuentra el tipo 5, en Asia están presentes los tipos 2 y 3, en América (E.U.A. y México) se encuentran los tipos 1, 2 y 3, mientras que en Europa se presentan el 2, 3, 4, 5, 6, 7 y 8. Respecto al continente africano se desconoce qué tipos específicos están presentes. A pesar de su amplia distribución de los diferentes tipos, en pacientes solo se han encontrado los tipos 1, 2, 3 y 5 (De Jonckheere, 2011; De Jonckheere, 2014).

Considerando la progresión rápida de la enfermedad, así como su alta tasa de mortalidad, el diagnóstico preciso y rápido de MAP es fundamental en el éxito del tratamiento del paciente. La historia clínica del paciente que describe contacto con cuerpos de agua dulce es indispensable para sugerir un caso de esta patología (da Rocha-Azevedo *et al.*, 2009). Las metodologías para el diagnóstico de la MAP son el análisis del líquido cefalorraquídeo (LCR) por medio de una punción lumbar. Esta muestra se analiza macroscópicamente observando parámetros en su coloración si se muestra purulento, turbio o hemorrágico, también se realizan pruebas bioquímicas para analizar los niveles de glucosa o de proteínas elevadas. Asimismo,

el LCR es analizado en microscopía de campo claro para observar la presencia de amibas móviles las cuales pueden ser diferenciadas de los macrófagos por su núcleo y nucleolo grande y redondo. También se pueden realizar tinciones de preparaciones fijas como Wright, Giemsa o hematoxilina y eosina (H & E), para tener una mejor observación de los trofozoítos. Debido a que *N. fowleri* puede ser fácilmente confundida con los macrófagos o con otras amibas (*Acanthamoeba* spp. *E. histolytica*) se debe de realizar una prueba de enflagelación, la cual consiste en centrifugar la muestra de LCR, y el sedimento recuperado colocarlo en una solución salina isotónica durante 2h, posteriormente se analiza una muestra en el microscopio en busca de biflagelados móviles, los cuales son característicos de las amibas del género *Naegleria*, confirmando el diagnóstico de MAP. (Behets *et al.*, 2003; da Rocha-Azevedo *et al.*, 2009; Baig y Khan, 2015). El uso de anticuerpos monoclonales específicos (5D12) es de gran ayuda para la detección de la amiba utilizando metodologías inmunológicas como inmunofluorescencia o ensayos de ELISA. Asimismo, ensayos PCR en tiempo real y altamente específicos utilizando cebadores para la región ITS, así como para la subunidad 18S del rRNA permiten la detección de los trofozoítos de *N. fowleri* (Behets *et al.*, 2003; da Rocha-Azevedo *et al.*, 2009).

La MAP tiene una tasa de mortalidad elevada, sin embargo, hasta la fecha no tiene un tratamiento específico. Actualmente el medicamento que ha demostrado efectividad es la anfotericina B (AnfoB), el cual es un polieno antifúngico que ejerce su mecanismo de acción sobre los esteroides localizados en la membrana celular, específicamente los ergosteroides, formando poros transmembranales por los cuales los componentes citoplasmáticos se filtran, dando como resultado una muerte celular tipo apoptosis. Además, se ha observado que AnfoB induce alteraciones como: mayor plasticidad nuclear, aumento de las membranas citoplasmáticas (retículo endoplásmico liso y rugoso), disminución del número de vacuolas alimentarias y degeneración mitocondrial en los trofozoítos de *Naegleria* spp (Schuster y Rechthand 1975; Cárdenas-Zúñiga *et al.*, 2017). AnfoB es comúnmente administrada en combinación con otros medicamentos como fluconazol, miconazol, miltefosina, azitromicina y rifampicina, (Kim *et al.*, 2008a; Grace *et al.*, 2015). El

Centro para el Control y Prevención de Enfermedades (CDC) recomienda el tratamiento con anfotericina B de forma intravenosa (dosis de 1,5 mg / kg / día) y de forma intratecal (1,5 mg / día) (Grace *et al.*, 2015). Otro fármaco que ha demostrado tener eficacia en ensayos *in vitro* e *in vivo* para el tratamiento de la MAP es el denominado “corifungin” que actualmente se encuentra considerado un “orphan drug” en Estados Unidos (Debnath *et al.*, 2012).

### **Mecanismos de patogenicidad de *N. fowleri***

*N. fowleri* cuenta con diversos factores de virulencia, los cuales le permiten invadir y establecerse en el hospedero. Estos pueden dividirse en mecanismos de patogenicidad dependientes e independientes de contacto (Siddiqui *et al.*, 2016).

La adhesión es el principal mecanismo dependiente de contacto, y es esencial para que la amiba se establezca en la mucosa nasal. Los trofozoítos emplean una molécula tipo integrina  $\alpha 5/\text{FnR}$  (60 kDa) para adherirse a elementos de la matriz extracelular como la fibronectina, y después a través de la señalización por la vía PKC forma placas de actina, las cuales facilitan el proceso de infección al cambiar el equilibrio de G-actina a F-actina (Hang *et al.*, 2004). También se ha demostrado que los residuos de manosa son esenciales para la adhesión, por medio de ensayos de inmunodetección (Western blot) y citometría de flujo se ha demostrado que los trofozoítos de *N. fowleri* tienen niveles elevados de glicoconjugados en su membrana celular, siendo D-manosa y L-fucosa los que mostraron una mayor presencia en la superficie amibiana (Cervantes-Sandoval *et al.*, 2010 Carrasco-Yépez *et al.*, 2013).

Un mecanismo fundamental para la sobrevivencia de los trofozoítos de *N. fowleri* es la fagocitosis, la cual utiliza como medio para la obtención de nutrientes, alimentándose principalmente de bacterias tanto Gram- positivas como Gram negativas, así como de algas y levaduras (Jahangeer *et al.*, 2020). También se ha observado que los trofozoítos de *N. fowleri* tienen la capacidad de ingerir células del neuroblastoma y de la microglía en modelos experimentales con ratas (Marciano-Cabral y John, 1983; Oh *et al.*, 2005). Asimismo, se ha descrito que los trofozoítos

producen apéndices citoplasmáticos en forma de ventosas o amebostomas, esenciales para este proceso (John *et al.*, 1984; Visvesvara *et al.*, 2007). El gen *Nf-actina* fue clonado y caracterizado, observando así, que se encuentra expresado fuertemente, sugiriendo que la actina juega un papel importante en la actividad fagocítica y en la patogénesis de la amiba (Sohn *et al.*, 2010)

Por otro lado, los mecanismos independientes de contacto abarcan la producción y secreción de proteínas que participan en el daño a las células del hospedero (Siddiqui *et al.*, 2016). A través de los años, se han descrito diversas proteínas y enzimas que posee *N. fowleri* y que participan en su patogenicidad. Se ha observado que el daño que ocurre en el epitelio olfatorio puede deberse a sustancias citolíticas que producen las amibas (Martínez *et al.*, 1971). Además, utilizando medios de cultivo enriquecidos con fosfolipasas secretadas por los trofozoítos, se demostró que estas enzimas causan la degradación de la mielina humana por medio de la hidrólisis de los fosfolípidos (Hysmith y Franson, 1982). Asimismo, *N. fowleri* presenta una enorme actividad citolítica contra células del hospedero, la cual se ha atribuido a proteínas formadoras del poro (N PFP), ya que despolarizan la membrana y forman canales iónicos (Young y Lowrey, 1989). Trece años después estas proteínas formadoras de poro fueron aisladas, identificando el gen que las codifica y determinando su estructura primaria. Además, se purificaron dos polipéptidos con actividad citotóxica denominados Naegleriaporos A y B (Herbst *et al.*, 2002).

La elevada actividad proteolítica que presentan los trofozoítos de *N. fowleri* es considerada un importante factor de virulencia, siendo uno de los más estudiados en estas amibas. Se ha reportado la presencia de una elastasa, la cual podría degradar proteínas del tejido conectivo tales como colágeno y proteoglicanos, promoviendo así la invasión y destrucción del tejido (Ferrante y Bates, 1988). Por otra parte, se han descrito dos proteasas de cisteína tipo catepsina B que pueden degradar IgA, IgG, IgM, colágeno, fibronectina, hemoglobina y albúmina (Aldape *et al.*, 1994). Un estudio preliminar por medio de análisis electroforéticos reportó la presencia de dos proteasas de cisteína de alto peso molecular (128 y 170 kDa) en

los lisados amibianos, que podrían estar involucradas en la destrucción del tejido (Amin, 2004). Además, también se ha realizado la caracterización bioquímica de la actividad de proteasas en los extractos celulares crudos y en medios condicionados de *N. fowleri* y *N. gruberi*. Se ha descrito la presencia de al menos cuatro actividades proteolíticas y mediante el uso de inhibidores específicos se determinó que las proteasas de cisteína son las principales responsables de estas actividades. Además, se observó que los trofozoítos de ambas especies también muestran actividades de serina proteasas, aunque en menor proporción (Serrano-Luna *et al.*, 2007). Estas proteasas también han sido involucradas en la actividad mucinolítica que emplea la amiba como mecanismo de evasión hacia las mucinas (moco) de las vías respiratorias, las cuales impiden que los trofozoítos se adhieran al epitelio, siendo las proteasas de cisteína las que tienen un papel importante en la degradación de la mucina MUC5AC presente en el moco del epitelio nasal (Cervantes-Sandoval *et al.*, 2008a). En otro estudio utilizando co-cultivos de los trofozoítos y células MDCK se observó que *N. fowleri* induce daño a las células epiteliales, caracterizado por cambios en el anillo apical de actina y alteración de proteínas de las uniones estrechas (ZO-1 y Claudina-1). Además, usando E-64, un inhibidor específico de proteasas de cisteína se determinó que el daño a las uniones estrechas es producido por este tipo de actividad proteolítica (Shibayama *et al.*, 2013). Recientemente, se utilizó un modelo *in vitro* de la barrera hematoencefálica utilizando células endoteliales de la microvasculatura cerebral de rata, en donde se demostró que *N. fowleri* puede disminuir la resistencia eléctrica transendotelial desencadenando la degradación y desestabilización de las proteínas de las uniones estrechas claudina-5, ocludina y ZO-1, así como la reorganización del citoesqueleto de actina, alterando las propiedades de la barrera hematoencefálica y aumentando su permeabilidad. Además, las proteasas de cisteína que producen los trofozoítos de *N. fowleri* y los medios condicionados producen un efecto citopático sobre las células endoteliales (Coronado-Velázquez *et al.*, 2018). Por medio de ensayos *in vitro* e *in vivo* se demostró que los trofozoítos y los extractos crudos totales de *N. fowleri* pueden degradar la mucina MUC5AC, además se observó una glucosidasa de 94 kDa (Nf-GH) la cual promueve la degradación de la mucina permitiendo la

evasión de la respuesta inmune innata (Martínez-Castillo *et al.*, 2017). Otra forma de actividad proteolítica que ha sido descrita en los trofozoítos de *N. fowleri* es la secreción de gránulos electrodensos (GED), los cuales son liberados por los trofozoítos en el curso de la invasión de los tejidos cerebrales, y en contacto con células epiteliales o sustratos de colágeno. Mediante microscopía electrónica de transmisión estos gránulos electrodensos fueron visualizados en el citoplasma de la amiba, sin embargo, fueron observados con mayor frecuencia en los trofozoítos recuperados de lesiones cerebrales de ratones experimentales. Estos GED presentan actividad lítica la cual está involucrada en los mecanismos citopáticos durante el comportamiento patógeno de *N. fowleri* (Chávez-Munguía *et al.*, 2014).

Un factor de virulencia independiente de contacto que ha sido observado es la proteína purificada NACM (*Naegleria amoebae* cytopathogene material), de manera que mediante el uso de medios condicionados se observó que induce una muerte apoptótica en menos de una hora de exposición a los fibroblastos de embrión de pollo (CEF) y a las células de ovario de hámster chino (CHO), después del desarrollo de la confluencia celular; esto se evaluó debido a la presencia de anomalías como rotura cromosómica, fragmentación del ADN, formación de ampollas, encogimiento y formación de cuerpos apoptóticos en las células blanco (Dunnebacke y Walen, 1999). El uso de moléculas liberadas por *N. fowleri* que inducen apoptosis en las células, también fue demostrado en un estudio con células humanas de la microglía (U87MG) en un sistema de cultivo sin contacto, en donde éstas mostraban cambios morfológicos como la destrucción de su membrana celular, así como una reducción en la población cuando eran co-cultivadas con trofozoítos de *N. fowleri*. Además, los análisis realizados por citometría de flujo mostraron un aumento significativo de células apoptóticas en comparación con el control o el lisado de la amiba, al medir la tinción de anexina V en combinación con fosfatidilserina en la fase temprana de la apoptosis (Kim *et al.*, 2008b). Por otra parte, los microorganismos patógenos necesitan adaptarse a cambios ambientales drásticos durante sus ciclos de vida; por lo tanto, se ha sugerido que las proteínas de choque térmico (HSP) desempeñan papeles importantes en las respuestas adaptativas para su supervivencia (Polla, 1991). Se ha identificado un gen que codifica a HSP-70 en *N. fowleri* (*Nf-cHSP70*)

con un tamaño de 2,062 bp. Por ensayos de inmunofluorescencia se demostró que HSP-70 se localiza en el citosol amibiano y por ensayos de PCR y Western blot se sugirió que la inducción de este gen puede ser un factor de virulencia importante, que puede participar en la adaptación de *N. fowleri* a los cambios ambientales y modulando la respuesta inmune del hospedero (Song *et al.*, 2007). Posteriormente, este grupo evaluó el papel de *Nf-cHSP70* en la patogenicidad de *N. fowleri*. Utilizando un inhibidor (KNK437) y mediante ensayos de expresión, proliferación y de citotoxicidad *in vitro* observaron que HSP70 está involucrado en estos procesos dentro de los trofozoítos de *N. fowleri* (Song *et al.*, 2008).

### **Respuesta inmune**

La exposición a los trofozoítos de *N. fowleri* induce la activación de la respuesta inmune innata en el hospedero. Durante los estadios iniciales de la infección, está orquestada por la secreción de mucinas (MUC5AC) presentes en el moco que secretan las células de Goblet del epitelio respiratorio. Estas mucinas atrapan a los trofozoítos evitando que se adhieran a la mucosa epitelial (Cervantes-Sandoval *et al.*, 2008a). También se ha descrito que la amiba induce la expresión de citocinas proinflamatorias tales como interlucina-8 (IL-8) e interlucina-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) en células epiteliales respiratorias, y la producción de estas citocinas es parcialmente dependiente de la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) y de la activación del receptor del factor de crecimiento epidermal (EGFR) (Cervantes-Sandoval *et al.*, 2009). En un estudio *in vitro* realizado con células de la microglía se observó que los lisados de *N. fowleri* inducen la producción de citocinas IL-1 $\beta$ , IL-6 y TNF- $\alpha$  (Lee *et al.*, 2011). De igual forma, se ha demostrado que los astrocitos expuestos a los lisados de las amibas producen la expresión IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8 de una manera dependiente de cinasa regulada por señales extracelulares (ERK), cinasa C-Jun N-terminal (JNK), y la cinasa activada por mitógenos p38 (MAPK) (Kim *et al.*, 2013). Por otra parte, se ha observado la presencia de neutrófilos y eosinófilos durante la reacción inflamatoria, sin embargo, cuando este estado avanza la presencia de eosinófilos disminuye, mientras que la de neutrófilos es más prominente durante el proceso inflamatorio tardío (Cervantes-Sandoval *et al.*,

2008b). En un estudio *in vitro* utilizando anticuerpos de inmunoglobulina A secretora (sIgA) obtenidos de calostro humano, se analizó su interacción con los trofozoítos de *N. fowleri* y se observó que los anticuerpos inhiben la adherencia de las amibas al colágeno tipo I (Shibayama *et al.*, 2003).

A pesar del despliegue del sistema inmune del hospedero activado por la exposición a *N. fowleri*, la amiba es capaz de secretar enzimas y proteínas que le ayudan a evadir a las células del sistema inmune y así generar daño a las células del hospedero. Como se mencionó anteriormente, la mucosa nasal, particularmente las mucinas, son la primera línea de defensa ante *N. fowleri*. Sin embargo, esta amiba tiene la capacidad de degradar estas proteínas por medio de proteasas (proteasas de cisteína y glucosidasa), permitiendo así su paso hacia el SNC (Cervantes-Sandoval *et al.*, 2008b; Martínez-Castillo *et al.*, 2017).

Se ha demostrado que *N. fowleri* también es resistente al sistema del complemento. Se han analizado los componentes de la superficie amibiana para determinar si estaban relacionados con su resistencia a la lisis. Por medio de análisis de lectinas específicas para la detección de residuos de manosa y fucosa, se observó que las proteínas de superficie involucradas en este mecanismo de evasión son glicoproteínas (Toney y Marciano-Cabral, 1992). Además, se han examinado los eventos de fosforilación durante la exposición de los trofozoítos al suero humano normal, y mediante ensayos de renaturalización se demostró que las amibas poseen proteínas cinasas de tirosina y de serina/treonina, las cuales desempeñan papeles importantes al proteger a la amiba de la lisis mediada por el complemento (Chu *et al.*, 2000). Además, *N. fowleri* expresa una proteína de superficie similar a CD59, la cual desempeña un papel en la resistencia al complemento, protegiendo a la amiba de citotoxinas o de moléculas formadoras del poro (Fritzinger y Marciano-Cabral, 2004; Fritzinger *et al.*, 2006). Otro mecanismo que ocupan las amibas para evadir la respuesta inmune del hospedero y que ha sido descrito es la remoción de los anticuerpos por medio del “capping” o encasquetamiento y endocitosis. En dos estudios distintos se ha observado como las amibas son capaces de volver a un estado original de movimiento ameboide después de eliminar el complejo antígeno-

anticuerpo que se produce en su superficie (Ferrante y Thong, 1979; Shibayama *et al.*, 2003).

### **Vía ubiquitina-proteosoma (UPP)**

En los organismos eucariotas, la vía ubiquitina-proteosoma (UPP por sus siglas en inglés “Ubiquitin-Proteasome Pathway”) es esencial para la degradación de proteínas mal plegadas, defectuosas, así como reguladoras de vida media corta. Esta vía regula muchos procesos celulares fundamentales, como son: el control de calidad de las proteínas, la reparación del ADN y la transducción de señales (Lasker *et al.*, 2011). En esta vía, las proteínas se dirigen a la degradación mediante la unión covalente con ubiquitina. La ubiquitinación es el proceso mediante el cual se marca a la proteína diana con proteínas similares a la ubiquitina (UBL) tal como la ubiquitina, o con el modificador pequeño similar a la ubiquitina (SUMO) y NEDD8 (Muñoz *et al.*, 2014). La ubiquitina es una proteína de 76 aminoácidos, altamente conservada, presenta una forma globular, rígida y muy estable con un peso molecular de 8.5 kDa (Finley y Chau, 1991; Wilkinson, 2000; Zelada-Valdés, 2019). Se han identificado dos sitios funcionales en su extremo carboxilo terminal (C-terminal) que tiene dos residuos del aminoácido de glicina (G), siendo el último residuo (G-76) por el cual la ubiquitina se liga al  $\epsilon$ - amino del residuo de lisina (K) de las proteínas aceptoras. La ubiquitina presenta siete residuos internos de lisina: K-6, K-11, K-27, K-29, K-33, K-48 y K-63, de éstos, los que se encuentran en la posición K-48, K-63 Y K-11 son los sitios aceptores de ubiquitinación más comunes relacionados a la degradación proteosomal (Finley y Chau, 1991; Zelada-Valdés, 2019; Martínez-Fonts *et al.*, 2020). Las cadenas de ubiquitina unidas a K-63 están asociadas principalmente con la endocitosis, traducción, señalización en vías de inmunidad innata y reparación del ADN. Sin embargo, también marcan a las proteínas para su degradación *in vitro*. Por otro lado, las cadenas de ubiquitina unidas a K-11 se dirigen a la degradación proteosomal en la vía ERAD (Degradación proteica asociada al retículo endoplásmico) y en la progresión del ciclo celular mediante la destrucción de los reguladores del ciclo celular (Martínez-Fonts *et al.*, 2020).

Existen diversas señales que activan la ubiquitinación en las proteínas sustrato, pueden ser señales que se programan genéticamente o que se adquieren a través de la fosforilación, por medio de la unión a una proteína adaptadora o por algún daño proteico, como es la fragmentación, oxidación o envejecimiento (Wilkinson, 2000).

### Mecanismo de señalización

La degradación de las proteínas por medio de la vía de la ubiquitina involucra dos pasos: señalización de la proteína por la unión covalente de múltiples ubiquitinas y la degradación de la proteína sustrato con la liberación de la(s) ubiquitina(s) para su reciclaje (Ciechanover, 1994). El proceso de ubiquitinación es realizado por tres enzimas específicas: enzima activadora de ubiquitina (E1), enzima conjugadora de ubiquitina (E2) y enzima ligadora de ubiquitina (E3) (Udeshi *et al.*, 2012). Este mecanismo comienza con la activación de la ubiquitina en su C-terminal, esta activación es llevada a cabo por la enzima E1 en presencia de ATP, resultando en la formación de ubiquitina-AMP como producto intermedio. A continuación, un residuo de cisteína se une al carboxilo terminal de la ubiquitina formando un enlace tioéster, dando como resultado ubiquitina-E1. Posteriormente el tioéster de ubiquitina es reconocido por la enzima E2, siendo transferida a un residuo de cisteína en esta enzima. Finalmente se liga a su proteína sustrato por medio de interacciones específicas entre E2 y E3. La ubiquitina se acopla al sustrato a través de la formación de un enlace isopeptídico entre G-76 de

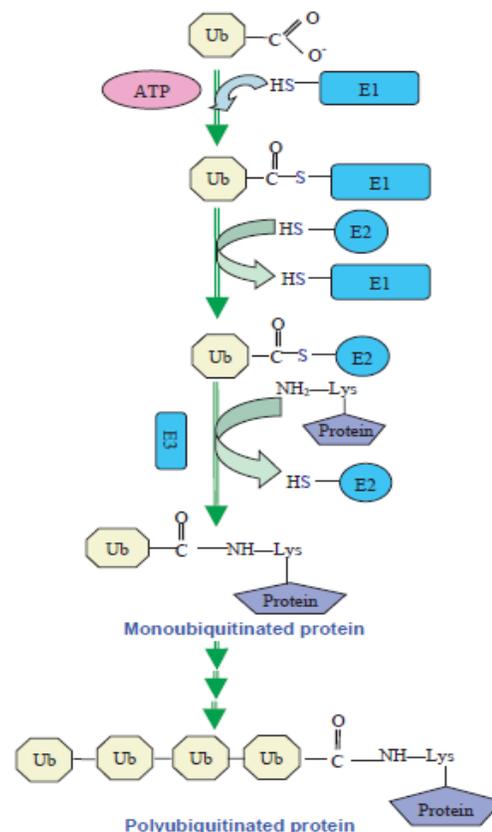


Fig. 3. Mecanismo de ubiquitinación de proteínas

(Tomado de Nandi *et al.*, 2006)

la ubiquitina y el grupo amino de una lisina del sustrato (Fig. 3) (Ciechanover, 1994; Nandi *et al.*, 2006; Udeshi *et al.*, 2012).

La ubiquitinación es un proceso reversible que ocurre cuando proteínas específicas catalizan la hidrólisis del enlace peptídico en G-76 del dominio de ubiquitina. Las enzimas que realizan este proceso son conocidas como enzimas desubiquitinizantes (DUB) y debido a que la ubiquitina se une por medio de enlaces tiol las enzimas desubiquitinizantes son tiol proteasas. Existen dos clases de estas proteasas que realizan el corte sobre la ubiquitina, las hidrolasas C-terminales de ubiquitinas (UBH) y las proteasas de procesamiento específicas de ubiquitina (UBP). Las UBP remueven la ubiquitina de proteínas poli-ubiquitinadas, mientras que UBH remueve pequeños aductos de ubiquitina y regenera a la ubiquitina monomérica libre (Wilkinson, 2000; Nandi *et al.*, 2006).

### **Enzima E1**

La primera enzima de la vía de ubiquitinación es denominada enzima activadora de ubiquitina o E1. En la mayoría de los organismos (incluso en la levadura *S. cerevisiae* y en los seres humanos) una única enzima E1 activa a la ubiquitina para su paso a las enzimas conjugadoras posteriores. E1 lleva a cabo la “activación” de la ubiquitina, es decir la adenilación y posteriormente la formación del enlace tioéster. Cada molécula E1 que se encuentra completamente cargada lleva dos moléculas de ubiquitina activada: una como tioéster y la otra como adenilato. Para iniciar la activación, primero se une Mg-ATP y después la ubiquitina, esto lleva a la formación de un intermedio de adenilato de ubiquitina el cual funciona como donante de ubiquitina a una cisteína en el sitio activo E1. La ubiquitina que se encuentra unida a tiol es transferida a la siguiente enzima de la cascada, la E2 (Pickart, 2001; Callis, 2014).

### **Enzima E2**

Las enzimas E2 son típicamente llamadas enzimas conjugadoras de ubiquitina (UBC), aunque también son denominadas conjugasas de ubiquitina o proteínas transportadoras de ubiquitina. E2 acepta la ubiquitina que se encuentra unida como

tioéster en E1, y de igual forma que E1, la enzima E2 lleva unida la ubiquitina a través de un enlace tioéster en su residuo de cisteína. E2 puede transferir la ubiquitina directamente a un sustrato con la ayuda de E3 o puede transferirla a un residuo de cisteína de la enzima E3 (Pickart, 2001; Callis, 2014).

Todas las enzimas E2 comparten un dominio central conservado que consta de 140 a 200 aminoácidos llamado dominio UBC. En este dominio se encuentra el residuo de cisteína que es requerido para la formación del enlace tioéster. El dominio UBC es una región de pliegue  $\alpha/\beta$  de cuatro hélices  $\alpha$  y una lámina  $\beta$  antiparalela de cuatro hebras con una hélice variable corta cerca de la cisteína catalítica. Además, casi todas las E2 en su dominio UBC presentan un tripéptido HPN (Histidina-Prolina-Asparagina) conservado de aproximadamente 10 residuos. La función de la asparagina presente en el tripéptido es catalítica ya que estabiliza el oxianión transitorio que se forma durante la formación del enlace isopeptídico, mientras que histidina presenta un papel estructural al estabilizar estos residuos en un giro cerrado facilitado por el residuo de prolina. Por otra parte, ciertas enzimas E2 presentan extensiones N- o C- terminales que pueden facilitar las interacciones específicas (Pickart, 2001; Callis, 2014).

### **Enzima E3**

La tercera enzima de la vía de ubiquitinación es denominada E3 o ubiquitina ligasa, la cual puede realizar dos mecanismos: servir como intermediario catalítico en la ubiquitinación al igual que E1 y E2 o servir de apoyo en la transferencia de la ubiquitina directamente de E2 al sustrato. E3 es un grupo grande de diversas proteínas, que se pueden dividir en tres tipos HECT, RING finger y U-box, en función de si tienen la ubiquitina ligada a tioéster (Metzger *et al.*, 2014; Callis, 2014).

El dominio más pequeño HECT (homólogos con la proteína C-terminal asociada a E6), nombrada debido a que su extremo carboxilo terminal de 350 aminoácidos está conservado de la proteína E6 del virus de papiloma humano (Neutzner y Neutzner, 2012; Callis, 2014). Este dominio presenta forma de L, los 100 residuos finales

adoptan una estructura  $\alpha/\beta$  formando el brazo corto, mientras que su N-terminal es helicoidal y forma su brazo largo (Pickart, 2001).

El dominio RING finger (nuevo gen realmente interesante) tiene una región de ~ 40-60 aminoácidos el cual contiene un octeto de residuos de cisteína (C) e histidina conservados que se unen a dos átomos de zinc (Zn). Una característica de estas enzimas es que no funcionan como catalizadores químicos sino como proteínas de andamio, las cuales reconocen a las proteínas sustrato y las unen con la ubiquitina activa, promoviendo así la transferencia de Ub directamente de la E2 a la proteína blanco (Pickart, 2001; Neutzner y Neutzner, 2012). En el dominio RING se han identificado algunos subgrupos en función de la presencia de los residuos C o H o si se presentan algunas sustituciones en estos residuos conservados (Callis, 2014).

U-box es un motivo de aproximadamente 70 aminoácidos, cuya función se ha descrito como sitio de acoplamiento de E2. Este motivo se encuentra estrechamente relacionado al dominio RING finger, con la diferencia de que este presenta puentes de sal y enlaces de hidrógeno en lugar de iones de zinc. Se cree que U-box evolucionó del dominio RING intercambiando los iones por puentes de sal (Neutzner y Neutzner, 2012; Callis, 2014).

### **Proteosoma**

El proteosoma es un complejo multicatalítico que se ha conservado en los 3 dominios de la vida (Bacteria, Archaea y Eukarya). Se considera la proteasa central de la vía de degradación y reciclamiento intracelular de proteínas de vida media corta dependiente de ubiquitina. Su función es indispensable en procesos celulares tales como: la proliferación, la diferenciación y ciclo celular, así también como en la apoptosis (Bohn y Förster, 2013; Gräwert y Groll, 2013).

El proteosoma 26S llamado proteosoma constitutivo o clásico, es una estructura macromolecular multiprotéica con carácter enzimático que tiene un peso molecular de aproximadamente 2.5 MDa (Gräwert y Groll, 2013; Zelada-Valdés, 2019). Su actividad proteolítica es dependiente de ATP y se encuentra conformado por al menos 33 subunidades, arregladas en dos subcomplejos: la proteasa central (CP por sus siglas en inglés “Core Protease”) o proteosoma 20S, con un peso molecular de alrededor de 700 kDa y la partícula regulatoria (RP por sus siglas en inglés “Regulatory Particle”) o proteosoma 19S con un peso molecular cercano a los 900 kDa (Fig. 4) (Smalle y Vierstra, 2004; Zelada-Valdés, 2019c). Los términos 26S, 20S y 19S se refieren al coeficiente de sedimentación del complejo (Gräwert and Groll, 2013).

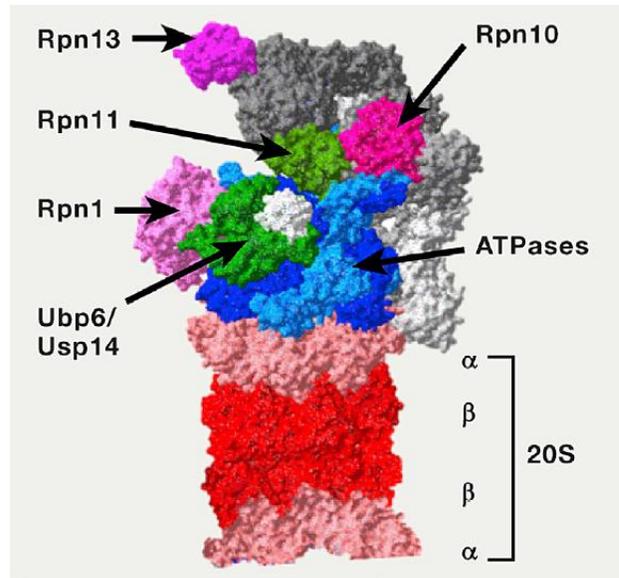


Fig. 4. Representación esquemática del proteosoma 26S

(Tomado de Collins y Goldberg, 2017)

## Proteosoma 20S

### Estructura

El proteosoma central 20S o núcleo del proteosoma, está conformada por 28 subunidades, arregladas en cuatro anillos heteroheptaméricos, dándole una conformación típicamente descrita en forma de barril, ésta es el resultado de un apilamiento axial de dos anillos  $\alpha$  externos y dos anillos  $\beta$  internos. Cada anillo interno está formado por siete subunidades tipo  $\beta$ , mientras que los anillos externos presentan 7 subunidades tipo  $\alpha$  (Finley, 2009), obteniendo una configuración  $\alpha 1-7/\beta 1-7/\beta 1-7/\alpha 1-7$ . Los anillos exteriores formados por las subunidades de tipo  $\alpha$  pueden actuar como una plataforma de ensamblaje para las subunidades de la partícula regulatoria 19S, actuando como una puerta hacia el interior del proteosoma

20S (Bohn y Förster, 2013). Las micrografías electrónicas han revelado que sus dimensiones moleculares son de aproximadamente 160 Å de longitud y 120 Å de diámetro. El complejo en forma de barril se encuentra atravesado por un canal interno que se ensancha en tres cavidades (una cámara central y dos antecámaras) que se encuentran conectadas por dos puertas estrechas. Un pequeño poro axial en el centro de los anillos  $\alpha$  da acceso a las antecámaras desde el exterior, permitiendo así la entrada de la proteína sustrato y la liberación del producto (Fig. 5) (Groll *et al.*, 2005; Gräwert y Groll, 2013).

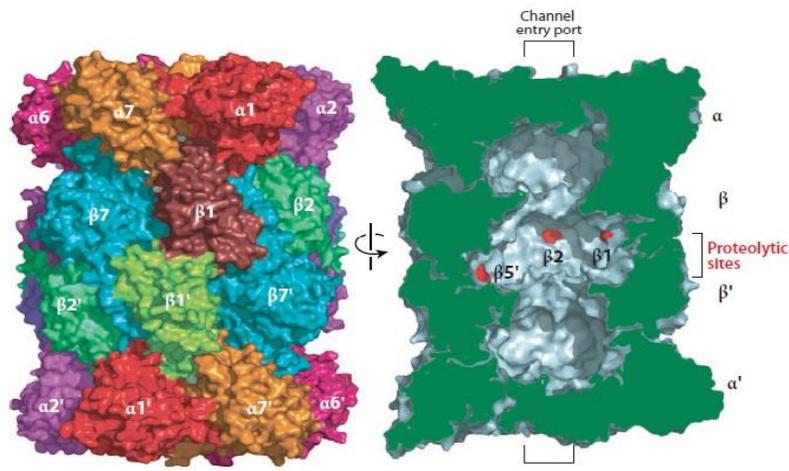


Fig. 5. Representación esquemática del proteosoma 20S

(Modificado de Finley, 2009)

El proteosoma 20S que como se mencionó anteriormente se ha descrito en los tres dominios de la vida, presenta diferencias estructurales y de organización en cada uno de ellos. En arqueas (*Thermoplasma acidophilum*) este complejo tiene una organización sencilla, compuesto de una única subunidad tipo  $\alpha$  y una única subunidad tipo  $\beta$ ; mientras que las eubacterias poseen un sistema relacionado con el proteosoma llamado HsIV (compuesto solo de un tipo de subunidad  $\beta$ ) o por dos subunidades  $\alpha$  y dos  $\beta$  (ej. *Rhodococcus erythropolis*). Por otro lado, en los organismos eucariotas cada subunidad del anillo está codificada por un gen independiente, teniendo así siete subunidades tipo  $\alpha$  y siete subunidades tipo  $\beta$  (Groll *et al.*, 2005; Bibo-Verdugo *et al.*, 2017). El proteosoma 20S está presente en

el citoplasma y en el núcleo de las células, anclado a membrana y recientemente se ha descrito de manera extracelular (Wang *et al.*, 2020).

### Actividad hidrolítica

Las subunidades responsables de la hidrólisis de los péptidos se encuentran contenidas en los anillos  $\beta$  del complejo. En el proteosoma de las arqueas, las 14 subunidades tipo  $\beta$  son enzimáticamente activas y presentan una especificidad amplia; en cambio en los eucariotas solo las subunidades  $\beta 1$ ,  $\beta 2$  y  $\beta 5$  presentan actividad hidrolítica dada por los residuos de treonina en sus extremos N-terminal. Además, cada subunidad tiene una especificidad de sustrato diferente. Por otro lado, las subunidades  $\beta$  restantes ( $\beta 3$ ,  $\beta 4$ ,  $\beta 6$ ,  $\beta 7$ ) permanecen inactivas (Groll *et al.*, 2005; Bibo-Verdugo *et al.*, 2017). La subunidad  $\beta 1$  muestra una preferencia para escindir sobre el extremo carboxilo ( $\text{COO}^-$ ) de los aminoácidos ácidos, confiriéndole una actividad tipo peptidil-glutamil-peptidasa o caspasa, la subunidad  $\beta 2$  presenta actividad tipo tripsina que actúa sobre residuos básicos, finalmente  $\beta 5$  exhibe actividad tipo quimiotripsina escindiendo aminoácidos hidrófobos (Fig. 6) (Smalle y Vierstra, 2004; Muñoz *et al.*, 2015). La longitud de los oligopéptidos que son generados por la escisión de las proteínas varía de 3 a 25 aminoácidos, sin embargo, tienen una longitud promedio de 7 a 8 aminoácidos (Groll *et al.*, 2005; Gräwert y Groll, 2013). Los oligopéptidos resultantes se hidrolizan posteriormente a aminoácidos por medio de oligopeptidasas y/o aminocarboxipeptidasas (Muñoz *et al.*, 2015).

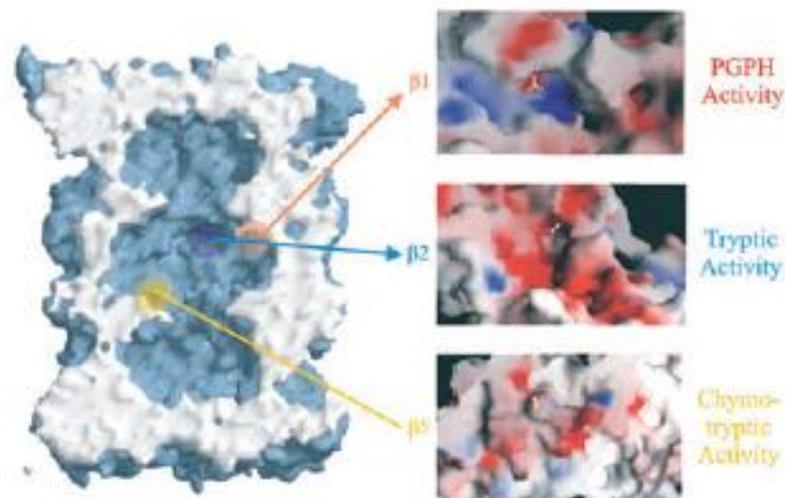


Fig. 6. Posición de los centros catalíticos en el núcleo del proteosoma 20S

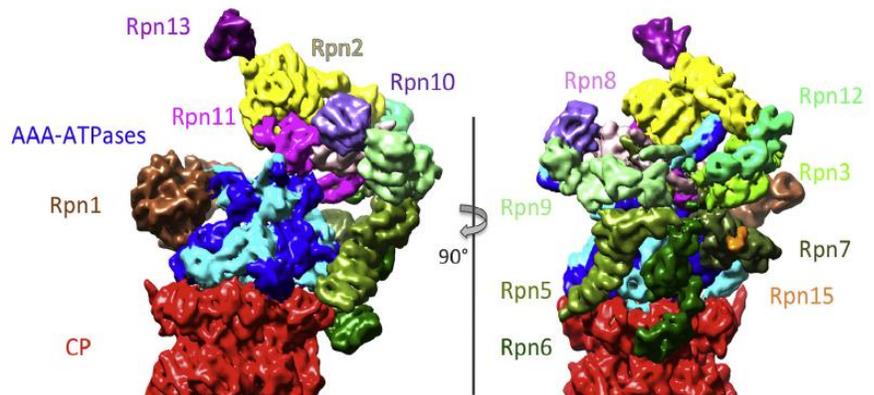
### Tipos de proteosoma 20S (núcleos hidrolíticos)

El proteosoma constitutivo 20S se expresa en la mayoría de los tipos celulares, sin embargo, se conocen otras tres isoformas específicas. En las células del sistema inmune, como las células presentadoras de antígeno, se encuentra el inmunoproteosoma 20S. Este tiene subunidades catalíticas alternativas denominadas  $\beta 1i$ ,  $\beta 2i$  y  $\beta 5i$ , las cuales generan péptidos para el complejo mayor de histocompatibilidad de clase I (MHC-I). Estas sustituciones le proporcionan al inmunoproteosoma una actividad reducida sobre la escisión de aminoácidos ácidos (caspasa), mientras que su actividad de preferencia de aminoácidos de cadena ramificada (BrAAP) y tipo quimiotripsina se encuentran aumentadas. Por otro lado, en las células epiteliales tímicas corticales se expresa el timoproteosoma 20S que contiene subunidades  $\beta 1i$ ,  $\beta 2i$  y  $\beta 5t$ . Además, las espermátidas y espermatozoides maduros expresan el espermato proteosoma, el cual es muy similar al inmunoproteosoma excepto por la presencia de la subunidad alternativa  $\alpha 4s$  (Groll *et al.*, 2005; Bibo-Verdugo *et al.*, 2017).

### Proteosoma 19S

La partícula reguladora también conocida como PA700 o proteosoma 19S, es el componente regulatorio del proteosoma 26S y se encuentra asociado por uno o ambos extremos a la proteasa central (DeMartino, 2005). El proteosoma 19S está conformado por al menos

19 subunidades que forman 2 subcomplejos: la base y la tapa. La base contiene seis subunidades con actividad de ATPasa



pertenecientes a la familia AAA (ATPasas asociadas con una variedad de actividades celulares) denominadas RPT 1-6, y tres subunidades no ATPasa RPN1, 2 y 10. Por su parte la tapa contiene las subunidades no ATPasa restantes RPN3, 5-9 y 11-12 (Fig. 7) (Smalle y Vierstra, 2004; Gillete *et al.*, 2001). El ensamble de la base depende de varias chaperonas: Rpn14, Nas2 (levadura) / p27 (humano), Nas6/Gankyrin y Hsm3/S5b (Bohn y Förster, 2013).

## **Funciones**

Dentro de las funciones descritas para el proteosoma 19S se encuentran el reconocimiento y desnaturalización de las proteínas ubiquitinadas, la eliminación de las uniones covalentes de las ubiquitinas, la apertura del anillo  $\alpha$ , así como la dirección de los péptidos hacia la proteasa central para su escisión (Smalle y Vierstra, 2004; Bohn y Förster, 2013). Por otro lado, la superfamilia de proteínas AAA ATPasa está involucrada en numerosos aspectos del metabolismo celular y también realiza funciones de chaperona que ayudan al ensamblaje y desensamblaje de los complejos proteicos (Gillete *et al.*, 2001).

## **Estructura: Tapa**

La tapa está formada por ocho subunidades: Rpn3, 5, 6, 7, 8, 9, 11 y 12. Se han descrito dos motivos estructurales presentes en varias de estas subunidades. Rpn3, 5, 6, 7, 9 y 12 contienen un dominio PCI C-terminal (proteosoma-CSN-eIF3), el cual tiene una longitud de hasta 200 aminoácidos y forma una estructura helicoidal, tiene funciones de andamiaje y permite el contacto entre las subunidades (Glickman *et al.*, 1999; Lander *et al.*, 2012). Estas subunidades PCI se encuentran dispuestas en forma de herradura formando un “techo” que cubre una gran parte del heterohexámero de AAA-ATPasas. Esta herradura muestra un orden Rpn9 / Rpn5 / Rpn6 / Rpn7 / Rpn3 / Rpn12 (Lasker *et al.*, 2011). Por otra parte, las dos proteínas faltantes de la tapa Rpn11 y Rpn8 presentan un dominio N-terminal MPN (Mpr1/Pad1). Este abarca aproximadamente 140 residuos de aminoácidos y podría asumir una estructura  $\alpha/\beta$ . El dominio MPN de la metaloproteasa Rpn11 alberga al motivo JAMM de unión a zinc (Zn) catalíticamente activo siendo este el responsable

de su actividad como desubiquitina, mientras que Rpn8 se encuentra inactivo porque carece del ion  $Zn^{2+}$  (Lasker *et al.*, 2011; Bohn y Förster, 2013). Rpn8 y Rpn11 forman un heterodímero el cual se encuentra cerca del hexámero de AAA-ATPasa, lo que podría explicar la dependencia de ATP de la actividad desubiquitinizante (Lasker *et al.*, 2011).

### **Estructura: Base**

Las AAA ATPasas forman un anillo heterohexamérico que se une al anillo  $\alpha$  de la partícula central. Las seis subunidades están asociadas en tres pares Rpt 1-2, 6-3 y 4-5, los cuales se organizan en forma de anillo mostrando una conformación Rpt1/ Rpt2/ Rpt6/ Rpt3/ Rpt4/ Rpt5. Cada subunidad Rpt contiene una  $\alpha$  hélice N-terminal seguido de un dominio de unión de oligonucleótidos/oligosacáridos (OB) y un dominio helicoidal C-terminal formado por la heterodimerización de proteínas Rpt vecinas, mientras que la actividad de ATPasa involucra un dominio AAA grande y uno pequeño. Los residuos C-terminales de las subunidades Rpt2, Rpt3 y Rpt5 tienen un motivo HbYX conservado, el cual se une a los “*pocket*” de las subunidades  $\alpha$  de la proteasa central para inducir la apertura de la puerta hacia el proteosoma 20S. Por otro lado, Rpt 1, 4 y 6 carecen de este motivo y su unión al 20S no incide sobre la apertura del núcleo (Besche *et al.*, 2009; Lander *et al.*, 2012; Bohn y Förster, 2013; Budenholzer *et al.*, 2017). Los movimientos de los dominios AAA impulsan la translocación del sustrato. Estos dominios tienen una configuración similar a una “escalera de caracol” con un orden Rpt3-Rpt4-Rpt5-Rpt1-Rpt2 (de arriba hacia abajo con relación al CP), Rpt6 se encuentra aproximadamente a la misma altura que Rpt5. Cuando este anillo se une a un sustrato, esta conformación en espiral cambia a una más plana, la cual alinea a las ATPasas del RP con los canales centrales de la proteasa central (Finley *et al.*, 2016; Budenholzer *et al.*, 2017). Los dominios OB definen el puerto de entrada del sustrato, ya que forman un anillo (anillo N) adyacente a los dominios AAA catalíticos. La región helicoidal C-terminal (CC por sus siglas en inglés “*coiled coil*”) promueve el ensamblaje adecuado del RP, haciendo contacto con regiones tanto de la base como de la tapa (Finley *et al.*, 2016).

El paso inicial para que la proteína sustrato sea degradada es la unión de la cadena de ubiquitina a subunidades del proteosoma que funcionan como receptores. Dos subunidades que también forman parte de la base del 19S y que realizan la función de reconocer a las proteínas poliubiquitinadas son Rpn10 y Rpn13. Además, hay otros receptores denominados de transporte que interactúan con el proteosoma, tales como Rad23, Dsk2 y Ddi1 (Finley *et al.*, 2016; Collins y Goldberg, 2017). Rpn13 tiene una localización apical, mientras que Rpn10 se encuentra cerca de las ATPasas y Rpn11. Rpn10 se une a las cadenas de ubiquitina a través de UIM (motivo que interactúa con ubiquitina) localizado en la parte C-terminal, mientras que su dominio Von Willebrand A (VWA) que se encuentra en el extremo N-terminal, está acoplado a la estructura del proteosoma. Por otro lado, Rpn13 se une a las cadenas de ubiquitina a través de su dominio PRU (Receptor de ubiquitina similar a Pleckstrin). Los otros receptores de ubiquitina (Rad23, Dsk2 y Ddi1) presentan un dominio asociado a ubiquitina (UBA) con el cual se unen a las cadenas de ubiquitina, y por medio del dominio similar a ubiquitina (UBL) localizado en la parte N-terminal se unen al proteosoma de una forma reversible; este dominio es reconocido por Rpn1 y por los sitios de unión de Rpn10 y Rpn13. De esta manera, se ha clasificado a estos receptores de transporte como parte de la familia de proteínas UBA/UBL (Bohn y Förster, 2013; Finley *et al.*, 2016). Rpn10 funciona como el receptor primario de la cadena de ubiquitina, mientras que Rpn13 y Rpn1 pueden cooperar para mejorar la degradación de algunas proteínas (Martínez-Fonts *et al.*, 2020).

Las subunidades más grandes de la base son Rpn1 y Rpn2, homólogos pertenecientes a las no ATPasas. La región central de ambas proteínas contiene 11 repeticiones de un motivo secuencia de 35-40 residuos de aminoácidos denominado proteosoma/ciclosoma (PC). Rpn2 presenta tres dominios distintos: el dominio PC central que está flanqueado por un dominio N-terminal en forma de varilla y un dominio globular C-terminal. Las repeticiones PC forman una doble capa de hélices y su curvatura genera una estructura toroidal cerrada que consta de dos anillos concéntricos pertenecientes a las hélices ubicadas en el exterior y en el interior. De igual forma Rpn1 presenta un dominio central PC, un dominio N-terminal con una serie de segmentos  $\alpha$  helicoidales similares a Rpn2 y un dominio C-terminal

de aproximadamente la mitad de longitud que Rpn2 con un conjunto de hebras  $\beta$  homologas a las de Rpn2 (He *et al.*, 2012; Budenholzer *et al.*, 2017). Rpn1 y Rpn2 son descritos como los andamios para el ensamblaje del proteosoma 26S, sin embargo, también cuentan con una función muy importante, ya que ambos se unen a receptores de ubiquitina, así Rpn1 se une a Rad23, mientras que Rpn2 con Rpn13 (Da Fonseca *et al.*, 2012).

Tabla 1. Dominios y motivos presentes en las subunidades del proteosoma 19S de *H. sapiens* y *S. cerevisiae*

Subcomplejo	Subunidad	Actividad	Dominio	Referencia
<b>Tapa</b>	Rpn3, 5, 6, 7, 9, 12	no ATPasa	PCI C-terminal (proteosoma- CSN-eIF3)	Glickman <i>et al.</i> , 1999 Lander <i>et al.</i> , 2012
	Rpn8	no ATPasa	MPN N-terminal (Mpr1/Pad1)	Lasker <i>et al.</i> , 2011
	Rpn11	no ATPasa	MPN N-terminal (Mpr1/Pad1) Motivo JAMM	Lasker <i>et al.</i> , 2011
<b>Base</b>	Rpt 1, 4, 6	ATPasas	Dominio de unión de oligonucleótidos / oligosacáridos (OB) Dominio AAA (grande y pequeño)	Besche <i>et al.</i> , 2009 Lander <i>et al.</i> , 2012 Bohn y Förster, 2013 Budenholzer <i>et al.</i> , 2017
	Rpt 2, 3, 5	ATPasas	Dominio de unión de oligonucleótidos / oligosacáridos (OB) Dominio AAA (grande y pequeño) Motivo HbYX	Besche <i>et al.</i> , 2009 Lander <i>et al.</i> , 2012 Bohn and Förster, 2013 Budenholzer <i>et al.</i> , 2017

---

PC (proteosoma/ciclosoma)			
RPN1, 2	no ATPasa	Dominio N-terminal en forma de varilla	He <i>et al.</i> , 2012 Budenholzer <i>et al.</i> , 2017
		Dominio globular C-terminal.	
Rpn10	no ATPasa	UIM (motivo que interactúa con ubiquitina) -C-terminal- Von Willebrand A (VWA) -N-terminal-	Bohn y Förster, 2013 Finley <i>et al.</i> , 2016
Rpn13	no ATPasa	PRU (Receptor de ubiquitina similar a Pleckstrin)	Bohn y Förster, 2013 Finley <i>et al.</i> , 2016

---

### Conservación del proteosoma 19S

El proteosoma 26S en células eucariotas tiene como precursor evolutivo al complejo PAN 20S. Éste se ha reportado como el conjunto proteolítico homólogo en las arqueas, el cual está conformado por 28 subunidades y un RP de seis subunidades (un complejo de anillo de ATPasa homomérico). En el linaje bacteriano también existe una proteasa similar: el complejo en forma de anillo (ARC) de AAA ATPasa actinobacteriana (Finley *et al.*, 2016).

Recientemente, la presencia de nuevas subunidades del RP en el proteosoma eucariota se ha relacionado con la introducción de la ubiquitina como señal para la degradación, ya que muchas de las subunidades específicas en los eucariotas son receptores de ubiquitina, enzimas deubiquitinizantes o proteínas de andamiaje (Finley *et al.*, 2016). Además, es de consideración que en los eucariotas el proteosoma se encuentra altamente conservado; de manera que la mayoría de las subunidades conocidas del RP de levadura tienen homólogos de mamíferos. Por ejemplo, las subunidades Rpt son 66-76% idénticas entre levaduras y humanos, las subunidades no ATPasa muestran un 33-47% de identidad de secuencia, mientras que Rpn11 tiene un 65% idéntico a su homólogo humano (Glickman *et al.*, 1999).

## **Modificaciones postraduccionales en el proteosoma 19S**

Frecuentemente las proteínas son modificadas co- o postraduccionalmente. Estas modificaciones se encuentran involucradas en su función, ya sea por la activación o inactivación de estas o mediante la interacción proteína-proteína / proteína-célula (Hirano *et al.*, 2016). El proteosoma requiere de las modificaciones postraduccionales (MPT) para realizar adecuadamente la proteólisis de sustratos, éstas parecen ser dirigidas a subunidades específicas y entre las que se han descrito están la fosforilación, metilación, acetilación, ubiquitinación y miristoilación (Kikuchi *et al.*, 2010; Kors *et al.*, 2019). A pesar de que han sido ampliamente reportadas y su estudio es importante para entender las propiedades funcionales del proteosoma, su análisis es complejo debido a que la presencia y los sitios de algunas MPT difieren entre las especies (Kors *et al.*, 2019).

## ANTECEDENTES DIRECTOS

Los parásitos protozoarios se someten a diferentes eventos de diferenciación con el fin de adaptarse a las condiciones de su entorno físico, así como a sus diversos hospederos. Para que estos eventos ocurran adecuadamente ciertas enzimas, como las proteasas, deben de estar implicadas; de esta manera, los cambios que ocurren durante las fases del ciclo de vida deben ser cuidadosamente controlados a través de mecanismos que involucren la proteólisis, siendo el complejo del proteosoma uno de los más importantes (Muñoz *et al.*, 2015). Actualmente, se ha descrito que los genomas de los microorganismos patógenos codifican proteosomas que son estructural y funcionalmente similares a los complejos que se presentan en los mamíferos (Bibo-Verdugo *et al.*, 2017).

En diversas patologías tales como cáncer, enfermedades neurodegenerativas y autoinmunes, el proteosoma es utilizado como un blanco terapéutico. En el caso de los padecimientos causados por organismos parásitos como los protozoarios, se ha descrito que la inhibición de la actividad del proteosoma previene los cambios morfológicos (diferenciación) y la proliferación, los cuales se consideran procesos indispensables durante la etapa infectiva. De tal manera, el estudio, purificación y caracterización del proteosoma en algunos protozoarios parásitos ha cobrado relevancia e incluso ha sido considerado un importante blanco terapéutico (Paugam *et al.*, 2003; Muñoz *et al.*, 2015).

En el caso del parásito *Leishmania mexicana*, se describió la purificación y caracterización del proteosoma 20S. Esto se logró mediante experimentos con extractos del promastigote los cuales mostraron actividad hidrolítica dependiente del sustrato peptídico fluorogénico SuccLLVY-AMC (utilizado para detectar actividad del proteosoma). Los análisis de corrimiento electroforético en geles de poliacrilamida en presencia de SDS (SDS-PAGE) mostraron el enriquecimiento de seis proteínas en un rango de masa molecular de 22-32 kDa, las cuales son similares a las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  del proteosoma de otros organismos. Además, por medio de cromatografía de exclusión se identificó una banda con un peso

molecular de aproximadamente 670 kDa (consistente con el tamaño de los proteosomas de otras especies) y mediante ensayos con ATP se demostró que los promastigotes de *L. mexicana* presentan actividad similar al proteosoma 26S. Además, utilizando inhibidores específicos del complejo, se observó que tanto ALLN (N-acetil-leucil-leucil-norleucinal) como MG132, afectan el crecimiento del promastigote y del amastigote y no así el uso de lactacistina. Por lo tanto, se llegó a la conclusión de que *L. mexicana* cuenta con el complejo del proteosoma y que su actividad proteolítica es esencial para el crecimiento y en la regulación del ciclo celular del microorganismo (Robertson, 1999).

En los protozoarios del género *Trypanosoma* también se ha descrito la existencia de este complejo, tal es el caso de *T. brucei* donde se monitoreó la actividad similar al proteosoma 26S en lisados crudos usando caseína [metil-14C] como sustrato. La degradación de la caseína se inhibió cuando se reemplazó el ATP con el análogo inactivo (ATPyS) o al agregar el inhibidor lactacistina. Por lo tanto, la presencia del proteosoma 26S fue sugerida mediante la hidrólisis de caseína en lisados celulares. Por medio de la clonación de seis ADNc que codifican los homólogos de las ATPasas, se demostró que *T. brucei* presenta seis genes homólogos a las subunidades Rpt 1-6. Además, para determinar si el proteosoma 26S está presente y si se encuentra dissociado en el proteosoma 20S y la partícula regulatoria 19S, el lisado fue fraccionado en una columna de superose 6, posteriormente estas fracciones fueron teñidas con antisueros de conejo contra las subunidades Rpt2, Rpt5, Rpt6 y 20S mediante técnicas de inmunoblot (Western blot). Asimismo, para determinar su función y conocer si el deterioro de ésta resulta en una acumulación de proteínas ubiquitinadas, se realizó la interferencia del ARN mediante la construcción de plásmidos, utilizando fragmentos parciales de ADNc de siete subunidades del proteosoma 20S y los seis homólogos de Rpt para así bloquear selectivamente la expresión del núcleo del proteosoma 20S y de las subunidades Rpt, dio como resultado una acumulación de proteínas ubiquitinadas acompañadas del detenimiento del crecimiento celular, lo cual sugiere que la pérdida de cualquiera de las proteínas  $\alpha$ ,  $\beta$  o Rpt conduce a una disfunción del proteosoma en *T. brucei* (Li *et al.*, 2002). Por otro lado, se documentó la presencia del proteosoma 26S y de

la vía de ubiquitina en *T. cruzi*. Los autores identificaron un complejo de alto peso molecular (1400 kDa) con una composición que se asemeja a la del proteosoma 26S. Por medio de la incubación de tripomastigotes en un medio libre de glucosa y en presencia de 2-desoxiglucosa (para agotar el ATP), se demostró que la degradación de proteínas de vida media corta es dependiente de ATP. Utilizando análisis cromatográficos se llevó a cabo la purificación del proteosoma 26S de los epimastigotes, además se identificó que el complejo contenía actividad dependiente de ATP similar a la quimotripsina. Además, a través de SDS-PAGE y Western blot se observaron aproximadamente 30 proteínas en un rango de 25 a 110 kDa, y utilizando anticuerpos específicos se reconocieron a los miembros de la familia AAA ATPasas del 26S. Su papel biológico fue determinado por medio de ensayos de conjugación de ubiquitina durante el tiempo de remodelación del parásito, en donde se demostró que el recambio proteico es dependiente del proteosoma y que su inhibición resulta en la acumulación de proteínas ubiquitinadas en el parásito. (De Diego et al., 2001).

En el caso del género *Entamoeba* por medio de análisis *in silico* se demostró que en tres especies de amibas: *E. histolytica* (protozooario parásito que causa disentería amibiana), *E. dispar* (especie avirulenta) y *E. invadens* (parásito de reptiles), se encuentra codificada la información genética de todos los componentes del sistema ubiquitina-proteosoma (UPP). Las secuencias de los genomas de las especies se obtuvieron de la base de datos NCBI (National Center for Biotechnology Information) y analizando secuencias/dominios de similitud (Ub, Ubls, E1s, E2s, y E3s) en programas como BLAST y TBLASTN, se demostró que las especies de *Entamoeba* codifican todos los componentes de la UPP y que, además, tienen aproximadamente el mismo nivel de complejidad de modificaciones Ub/Ubl presentes en los organismos eucariotas superiores. Adicionalmente observaron que las enzimas activadoras de Ubl (E1) están codificadas y expresadas en las amibas y que, todas las clases de ligasas Ub (HECT, RING, finger, PHD y U-box) se encontraron en su genoma (Arya et al., 2012).

En otro trabajo, se clonaron y caracterizaron los diversos componentes del sistema de ubiquitinación (ubiquitina y sus enzimas: activadora E1, conjugadora E2 y ligasa E3) de *E. histolytica*. Por medio de difusión de vapor de gotas colgantes a 18°C se obtuvieron las estructuras cristalinas de la ubiquitina, las cuales revelaron una agrupación de residuos únicos (incluida lisina) en la superficie de  $\alpha$ 1 hélice, lo cual le permite realizar un enlace poliubiquitina único en esta especie. Además, los ensayos de transferencia de ubiquitina demostraron que ésta se activa y forma un enlace tioéster con EhUba (E1), de una manera dependiente de ATP y magnesio (Bosch y Siderovski, 2013).

Recientemente en el género *Naegleria* y mediante el uso de análisis bioinformático, se describió la presencia del núcleo catalítico 20S del proteosoma en las especies *N. fowleri* y *N. gruberi*. Por ensayos de Western blot, Dot blot y actividad enzimática con sustratos específicos se detectaron las subunidades estructurales y catalíticas del complejo, y mediante microscopía confocal se observó su localización principalmente citoplasmática. Adicionalmente, se demostró la participación de este complejo con un papel significativo en la proliferación y diferenciación de los trofozoítos de ambas especies de amibas (Guzmán-Téllez *et al.*, 2020).

## JUSTIFICACIÓN

El proteosoma es un complejo multicatalítico indispensable en el reciclamiento y degradación de las proteínas intracelulares de vida media corta en células eucariotas. Recientemente se describió la presencia del proteosoma 20S en amibas del género *Naegleria* tanto en la especie patógena *N. fowleri*, como en la no patógena *N. gruberi*. Sin embargo, se desconoce la presencia de la partícula reguladora, conocida como proteosoma 19S, la cual es la encargada de reconocer a las proteínas sustrato marcadas con ubiquitina y permitir su paso hacia el complejo catalítico. Por lo tanto, su identificación permitirá conocer si las amibas del género *Naegleria* cuentan con el proteosoma 26S completo y si está constituido típicamente.

## HIPÓTESIS

*N. fowleri* y *N. gruberi* cuentan con la partícula reguladora 19S del proteosoma. Ésta se encuentra conformada por subunidades ATPasas AAA y no ATPasas, las cuales tienen funciones de reconocimiento de sustratos ubiquitinados, desubiquitinación de las proteínas, así como de regulación del acceso hacia el núcleo catalítico 20S para la degradación de proteínas sustrato.

## OBJETIVO GENERAL

Demostrar a través de ensayos *in silico* la presencia de subunidades del complejo regulatorio 19S del proteosoma y de la proteína ubiquitina en trofozoítos de *Naegleria fowleri* y *Naegleria gruberi*

## OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificar secuencias homólogas a las subunidades Rpn10, 11 y 13, así como a las Rpt2, 3 y 5 del proteosoma 19S en *N. fowleri* y *N. gruberi*.
- Determinar los porcentajes de identidad, similitud y valor de *e* de las secuencias correspondientes a las subunidades putativas del proteosoma 19S de las amibas *Naegleria* spp. en comparación con las de los organismos modelo (*H. sapiens* y *S. cerevisiae*).
- Identificar los dominios y modificaciones postraduccionales característicos de las subunidades Rpn10, 11 y 13 y Rpt2, 3 y 5 en las secuencias recuperadas de *N. fowleri* y *N. gruberi*.
- Realizar el modelamiento tridimensional y la comparación estructural de las subunidades del proteosoma 19S (Rpn10, 11 y 13 y Rpt2, 3 y 5) en *N. fowleri* y *N. gruberi* en comparación con las secuencias de los organismos modelo.
- Determinar la presencia, estructura y los motivos característicos de la proteína ubiquitina en *Naegleria* spp

## METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

### **Análisis *in silico* de la secuencia y estructura tridimensional de las subunidades de la partícula regulatoria 19S en amibas del género *Naegleria***

#### **Identificación de las secuencias putativas para las subunidades del proteosoma 19S en *Naegleria* spp.**

El análisis bioinformático de las subunidades putativas de la partícula regulatoria 19S en las amibas del género *Naegleria* se realizó tomando como referencia las secuencias de aminoácidos previamente reportadas para los organismos modelo *Saccharomyces cerevisiae* y *Homo sapiens*, así como de la amiba no patógena *Naegleria gruberi* en la base de datos KEGG Orthology (KO) (<https://www.genome.jp/kegg/pathway.html>) (fechas de consulta: 17-19/Noviembre/2020) en el mapa del proteosoma (ref: 03050). Se analizaron las subunidades ATPasas AAA: Rpt2, Rpt3 y Rpt5 (ref: K03062, K03063 y K03065); además de las subunidades no ATPasas Rpn10, Rpn11 y Rpn13 (ref: K03029, K03030 y K06691). Para obtener las secuencias de las subunidades de *N. fowleri* se realizó un alineamiento usando la herramienta BLAST-P con los parámetros pre-establecidos en el servidor AmoebaDB (<https://amoebadb.org/amoeba/app>). Los criterios utilizados en la selección de las secuencias fueron: significancia del valor de e, así como los porcentajes de identidad y similitud que comparten las secuencias de *N. fowleri* con la especie de referencia *N. gruberi*.

#### **Búsqueda de homología y similitud de las subunidades del proteosoma 19S de *Naegleria* spp. comparado con organismos modelo**

A partir de las secuencias de las subunidades recuperadas de *N. fowleri* y *N. gruberi*, se realizó la obtención de la homología que presentan estas en comparación con *H. sapiens* y *S. cerevisiae*. Se utilizaron diferentes programas de alineamiento de múltiples secuencias que incluyen: NCBI (Blast-P) (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE=Proteins>), UniProt (Clustal W) (<https://www.uniprot.org/blast/>), MAFFT (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/mafft/>), Clustal omega (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>), y T-Coffee

(<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/tcoffee/>), configurados con los parámetros establecidos previamente. Los criterios utilizados para la obtención de la homología fueron: significancia del valor de *e* y los porcentajes de identidad y similitud.

Finalmente, se realizó la representación gráfica de los alineamientos utilizando el programa Jalview (<http://www.jalview.org/getdown/release/>), configurado para la representación por conservación de todas las secuencias previamente mencionadas.

### **Localización de los dominios característicos de las subunidades del proteosoma 19S en las secuencias putativas de *Naegleria* spp.**

Se llevó a cabo la identificación de dominios característicos en las secuencias de *Naegleria* spp, utilizando diferentes bases de datos que incluyen: Conserved Domain Database (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>), InterPro (<https://www.ebi.ac.uk/interpro/search/sequence/>), Pfam (<http://pfam.xfam.org/>) y Prosite (<https://prosite.expasy.org/>) (fecha de consulta: 27/Noviembre/2020) y comparándolos con los dominios ya reportados de los organismos modelos (*H. sapiens* y *S. cerevisiae*). Los criterios de inclusión considerados corresponden al valor de *e* (confidencialidad de resultado más certero, en un rango de 0 o un valor cercano a éste) y bit score (coincidencia de la secuencia analizada con el perfil de la base de datos, donde entre más alto sea el valor obtenido, el resultado es considerado mejor) para la base de datos Pfam.

De igual forma, se realizó la búsqueda del motivo “*coiled coil*” presente en las subunidades Rpt de *Naegleria* spp., por medio del programa Marcoil1.0 (<https://bcf.isb-sib.ch/webmarcoil/webmarcoilC1.html>) empleando el criterio Threshold (estimación del valor mínimo de una variable aleatoria, en un rango de inclusión superior al 50%).

### **Identificación de modificaciones postraduccionales en las subunidades del proteosoma 19S en *Naegleria* spp.**

Se realizó la identificación de las modificaciones postraduccionales que presentan cada una de las subunidades en las especies *N. fowleri* y *N. gruberi*, a partir de las descritas en los organismos modelos (*H. sapiens* y *S. cerevisiae*), investigadas por medio de información bibliográfica. Cada modificación fue procesada en dos programas diferentes: miristoilación (NMT - The MYR Predictor (<https://mendel.imp.ac.at/myristate/SUPLpredictor.htm>) y ExPASy Myristoylator (<https://web.expasy.org/myristoylator/>), acetilación (The CUCKOO Workgroup (<http://pail.biocuckoo.org/online.php>) y DTU Health Tech (<https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?NetAcet-1.0>), ubiquitinación (The CUCKOO Workgroup (<http://bdmpub.biocuckoo.org/index.php>) y iUbiq-Lys (<http://www.jci-bioinfo.cn/iUbiq-Lys>), sumoilación (The CUCKOO Workgroup (<http://sumosp.biocuckoo.org/>) y SUMOgo (<http://predictor.nchu.edu.tw/SUMOgo/>) y fosforilación (The CUCKOO Workgroup (<http://gps.biocuckoo.cn/online.php>) y NetPhos (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/>) (fecha de consulta: 14/Diciembre/2020).

### **Modelamiento tridimensional de las subunidades del proteosoma 19S de *Naegleria* spp.**

Los modelos tridimensionales de las subunidades analizadas de las dos especies de *Naegleria* fueron obtenidos utilizando la herramienta Structure Prediction del servidor Raptor X (<http://raptorx.uchicago.edu/ContactMap/>). Adicionalmente se realizó el alineamiento tridimensional y comparación entre *H. sapiens* y *S. cerevisiae* con *N. fowleri* y *N. gruberi*, utilizando los criterios de porcentaje de homología dado a partir de la herramienta MatchMaker del programa USCF Chimera 1.11.3, así como porcentaje de similitud obtenido por el programa DALI (<http://ekhidna2.biocenter.helsinki.fi/dali/>).

### **Análisis *in silico* de la secuencia y estructura tridimensional del dominio PRU de la subunidad Rpn13 de la partícula regulatoria 19S en ambas del género *Naegleria***

El análisis específico del dominio PRU (Rpn13), el cual es indispensable para la unión del proteosoma a la cadena de ubiquitina de la proteína sustrato; fue realizado siguiendo el procedimiento previamente descrito. Con las regiones N-terminales

específicas y obtenidas en las secuencias de los organismos modelo, se identificaron las correspondientes al dominio en *Naegleria* spp., se realizó la obtención de la homología utilizando las mismas bases de datos con los parámetros por *default*. Los criterios utilizados para la homología fueron: significancia del valor de e, así como los porcentajes de identidad y similitud. De igual forma se realizó la representación gráfica por conservación del alineamiento ocupando el programa Jalview. Los modelos tridimensionales fueron obtenidos mediante el servidor Raptor X y comparados tridimensionalmente contra los dominios en los organismos modelo, siguiendo la metodología anteriormente mencionada.

### **Análisis *in silico* de la secuencia y estructura tridimensional de la proteína ubiquitina en amibas del género *Naegleria***

El análisis bioinformático de la proteína ubiquitina en las amibas del género *Naegleria* se realizó tomando como referencia la secuencia de aminoácidos reportada en la base de datos KEGG Orthology (KO) (ref: 04121) para los organismos *S. cerevisiae*, *H. sapiens* y de la amiba no patógena *N. gruberi*. La obtención de la secuencia de *N. fowleri*, fue realizada con el mismo procedimiento descrito para las subunidades del proteosoma. De igual forma la obtención de la homología y la identificación de dominios se realizó con los programas anteriormente mencionados. Además, se identificaron motivos y residuos de importancia en la secuencia proteica de la ubiquitina por medio del programa MOTIF Search (<https://www.genome.jp/tools/motif/>). El modelamiento y el alineamiento tridimensional fueron realizados a través del mismo procedimiento utilizado para las subunidades del proteosoma 19S. Asimismo, utilizando el programa Phyre<sup>2</sup> (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/~phyre2/html/page.cgi?id=index>) (fecha de consulta: 21/marzo/2021) se obtuvieron las estructuras secundarias y la predicción del desorden de la proteína ubiquitina en los cuatro organismos (con los criterios de inclusión clave de confianza basándose en la escala de colores, así como la SS confianza).

## RESULTADOS

La partícula regulatoria 19S es la encargada de regular el acceso de los sustratos hacia la partícula central o proteosoma 20S. Esta se encuentra conformada por subunidades ATPasas AAA y no ATPasas, las cuales cuentan con dominios y motivos característicos que les permiten ser identificados y clasificados como parte del subcomplejo de la tapa o de la base. Se identificaron en las especies del género *Naegleria*, a través de análisis *in silico*, la presencia y características de las secuencias peptídicas de las subunidades ATPasas AAA: Rpt2, Rpt3 y Rpt5, que son las encargadas de abrir la puerta hacia el proteosoma 20S y de las subunidades no ATPasas: Rpn10 y Rpn13 encargados de reconocer a las proteínas poliubiquitinadas, funcionando como receptores del proteosoma, además de Rpn11, la cual es la encargada de eliminar el enlace covalente entre la ubiquitina y la proteína sustrato funcionando como enzima desubiquitinizante.

### **Homología de las subunidades no ATPasas y ATPasas en *Naegleria* spp. comparadas con los organismos modelo *H. sapiens* y *S. cerevisiae***

A partir de las secuencias recuperadas para las subunidades ATPasas (Rpt2, 3 y 5) y no ATPasas (Rpn10, 11 y 13) del proteosoma 19S, en ambas especies de *Naegleria* se calcularon a través del análisis por BLAST-P los porcentajes de similitud e identidad de cada una de las secuencias en ambas especies amibianas en comparación con los organismos modelos *H. sapiens* y *S. cerevisiae*.

De acuerdo con los resultados obtenidos a partir de los diferentes programas mencionados, cuando se hizo la comparación con *H. sapiens* las subunidades ATPasas y Rpn11 muestran identidades que van entre el 68 al 79% y similitudes en un rango entre 85 y 91% en *N. fowleri* y de 69 a 79% de identidad y 84 a 91% de similitud en *N. gruberi*. Cabe mencionar que los valores de e obtenidos para las subunidades Rpt en ambas amibas fueron de 0.0, consiguiendo así el mejor resultado esperado, de acuerdo con los parámetros de inclusión del programa utilizado. Para el caso de los receptores de ubiquitina los porcentajes obtenidos fueron más bajos, con identidades entre 34 al 55% y similitudes entre 58 al 71%

para *N. fowleri*, y de 34 a 49% de identidad y 61 a 69% de similitud en *N. gruberi* (Tabla 2).

Tabla 2. Porcentajes de identidad y similitud entre las subunidades ATPasas y no ATPasas de la partícula regulatoria de *N. fowleri* y *N. gruberi* en comparación con *H. sapiens*.

<b><i>H. sapiens – N. fowleri</i></b>						
Secuencia	% identidad				% similitud (Positividad)	Valor de e
	Clustal W	MAFFT	T-coffee	NCBI	NCBI	
<b>Rpn10</b>	40.23	44.73	46.97	40	58	7e-67
<b>Rpn13</b>	34.32	39.17	38.44	55	71	3e-35
<b>Rpn11</b>	73.03	75	73.68	75	85	7e-164
<b>Rpt2</b>	73.80	74.94	74.72	74	87	0.0
<b>Rpt3</b>	74.64	74.64	74.64	79	91	0.0
<b>Rpt5</b>	68.56	69.02	69.02	70	85	0.0
<b><i>H. sapiens – N. gruberi</i></b>						
<b>Rpn10</b>	42.21	44.76	43.75	40	61	2e-58
<b>Rpn13</b>	34.16	40.88	35.09	49	69	2e-30
<b>Rpn11</b>	71.52	74.50	72.17	74	84	1e-161
<b>Rpt2</b>	73.80	74.49	74.49	74	88	0.0
<b>Rpt3</b>	76.01	76.52	76.52	79	91	0.0
<b>Rpt5</b>	69.72	70.72	70,66	70.19	86	0.0

Cuando se hizo la comparación con *S. cerevisiae* los porcentajes que se obtuvieron para las subunidades ATPasas y Rpn11 en *N. fowleri* van del 60 al 75% de identidad y del 74 al 86% de similitud, y en *N. gruberi* de 60 a 74% de identidad y de 74 a 85% en similitud. La subunidad Rpn10 mostró valores de 44 a 47% de identidad y 64% en similitud en *N. fowleri*, y de 41 a 44% de identidad y 64% en similitud para *N. gruberi*. De igual forma, en ambas especies de amibas, se obtuvieron valores de e para las subunidades Rpt de 0.0, consiguiendo así el mejor resultado esperado (Tabla 3).

Tabla 3. Porcentajes de identidad y similitud entre las subunidades ATPasas y no ATPasas de la partícula regulatoria de *N. fowleri* y *N. gruberi* en comparación con *S. cerevisiae*.

<b><i>S. cerevisiae</i> – <i>N. fowleri</i></b>						
Secuencia	% identidad				% similitud (Positividad)	Valor de e
	Clustal W	MAFFT	T-coffee	NCBI	NCBI	
<b>Rpn10</b>	45.08	47.35	46.97	44	64	5e-59
<b>Rpn11</b>	60.66	61.31	60.98	61	74	4e-129
<b>Rpt2</b>	68.19	69.98	68.58	67	83	0.0
<b>Rpt3</b>	67.37	69.50	67.92	75	86	0.0
<b>Rpt5</b>	63.64	64.80	63.40	65	82	0.0
<b><i>S. cerevisiae</i> – <i>N. gruberi</i></b>						
<b>Rpn10</b>	41.13	44.32	43.40	42	64	7e-57
<b>Rpn11</b>	60.33	60.98	60.66	60	74	1e-127
<b>Rpt2</b>	67.51	69.52	68.35	67	83	0.0
<b>Rpt3</b>	68.51	70.03	69.52	74	85	0.0
<b>Rpt5</b>	65.41	66.12	64.95	67	83	0.0

Para el caso del receptor Rpn13 de ambas amibas en comparación con *S. cerevisiae*, se encontraron porcentajes de identidad menores al 30%. Cabe destacar, que mientras para *N. fowleri* el porcentaje de similitud y valor de e no fueron obtenidos, para *N. gruberi* su porcentaje de similitud fue de 48% y un valor de e superior a 0 (tabla 4). A partir de este resultado, se realizó una búsqueda bibliográfica en donde se encontró que esta subunidad en *S. cerevisiae* se encuentra truncada y que su región N-terminal solo es un 25% idéntica a la forma de los mamíferos, estando su dominio PRU (esencial para la unión a la ubiquitina) solo un 25% conservado (Husnjak *et al.*, 2008).

Tabla 4. Porcentajes de identidad y similitud entre la subunidad Rpn13 de la partícula regulatoria de *N. fowleri* y *N. gruberi* en comparación con *S. cerevisiae*.

<b><i>S. cerevisiae</i> – <i>N. fowleri</i></b>						
Secuencia	% identidad				% similitud (Positividad)	Valor de e
	Clustal W	MAFFT	T-coffee	NCBI	NCBI	
<b>Rpn13</b>	23.81	28.57	24.49	-	-	-
<b><i>S. cerevisiae</i> – <i>N. gruberi</i></b>						
<b>Rpn13</b>	26.09	33.11	27.89	25	48	0.002

De acuerdo con los resultados obtenidos, las secuencias peptídicas correspondientes a las subunidades de la partícula regulatoria (no ATPasas y ATPasas) en ambas especies de *Naegleria* presentan un mayor porcentaje de homología e identidad con las de *H. sapiens*, en comparación con las de *S. cerevisiae*.

#### **Análisis *in silico* del dominio PRU de la subunidad putativa Rpn13 del complejo regulatorio en *Naegleria* spp**

El dominio PRU es característico del receptor Rpn13 ya que le permite unirse a las cadenas de poliubiquitina de las proteínas sustrato. Sin embargo, se sabe que esta subunidad se encuentra truncada en la levadura *S. cerevisiae* y por lo tanto presenta una homología menor comparada con las subunidades descritas en otros organismos. De esta manera, al realizar los alineamientos correspondientes a la búsqueda de identidad y similitud únicamente de esta región (N-terminal) en *Naegleria* spp. comparada con esta misma secuencia en los organismos modelo; se encontró que los porcentajes de identidad y similitud del dominio en el caso de ambas especies de *Naegleria* en comparación con *H. sapiens* fue de 46-55% de identidad y 68-70% de similitud, mientras que con *S. cerevisiae* fue de 24-28% de identidad y 48% en similitud (tabla 5).

Tabla 5. Porcentajes de identidad y similitud entre el dominio PRU de la subunidad Rpn13 de la partícula reguladora de *N. fowleri* y *N. gruberi* en relación con los organismos modelos

<b>Dominio PRU (Rpn13)</b>						
<b>Organismos</b>	<b>% identidad</b>				<b>% similitud</b>	<b>Valor de</b>
	Clustal W	MAFFT	T-Coffee	NCBI	(positividad)	e
<b><i>H. sapiens</i> – <i>N. fowleri</i></b>	52.68	53.57	52.68	55	70	8e-42
<b><i>H. sapiens</i> – <i>N. gruberi</i></b>	46.43	49.11	46.43	49	68	1e-37
<b><i>S. cerevisiae</i> – <i>N. fowleri</i></b>	25.66	28.32	27.43	27	48	9e-10
<b><i>S. cerevisiae</i> – <i>N. gruberi</i></b>	24.78	25.44	25.44	25	48	4e-10

Al analizar la secuencia se observaron segmentos que se encuentran conservados entre los cuatro organismos (Fig. 8. Tonalidad azul fuerte), los cuales se relacionan con los porcentajes de identidad mencionados anteriormente; también se observaron diversos aminoácidos que son similares entre *H. sapiens* o *S. cerevisiae* y las especies de *Naegleria* (Fig. 8. Tonalidad azul clara).

De igual forma se identificaron los motivos de las secuencias de aminoácidos que son indispensable para la interacción del receptor Rpn13 con otras subunidades o proteínas dentro del mismo complejo regulatorio. Considerando los porcentajes de homología previamente descritos, esta comparación únicamente se realizó contra la secuencia de *H. sapiens*, de manera tal que se puede observar que *N. fowleri* y *N. gruberi* presentan motivos conservados para la interacción del dominio PRU de Rpn13 con la subunidad Rpn2 lo que le permite unirse al proteosoma (Fig. 9.

Tonalidad morada), así como los necesarios para la interacción con la proteína ubiquitina (Fig. 9. Tonalidad turquesa).



Fig. 8. Alineamiento por conservación del dominio PRU (Rpn13) del proteosoma 19S

El orden de las secuencias mostradas corresponde a: *H. sapiens*, *S. cerevisiae*, *N. fowleri* y *N. gruberi*, respectivamente.

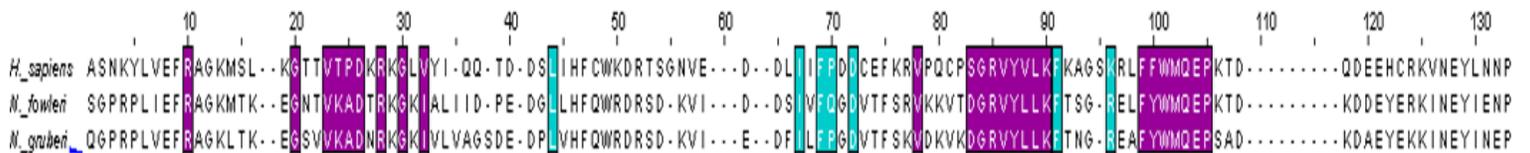


Fig. 9. Conservación de motivos de interacción del dominio PRU (Rpn13) del proteosoma 19S

El orden de las secuencias mostradas corresponde a: *H. sapiens*, *N. fowleri* y *N. gruberi*, respectivamente.

A continuación, se realizó el modelamiento y alineamiento tridimensional del dominio PRU. De este se obtuvieron valores de identidad y similitud semejantes a los obtenidos en la homología. El dominio de la secuencia en *H. sapiens* presentó valores de 44-46% en identidad y de 46-51% en similitud en relación con ambas amibas. Mientras que con *S. cerevisiae* se obtuvieron identidades de 24% y similitudes de 25-26% (Fig. 10).

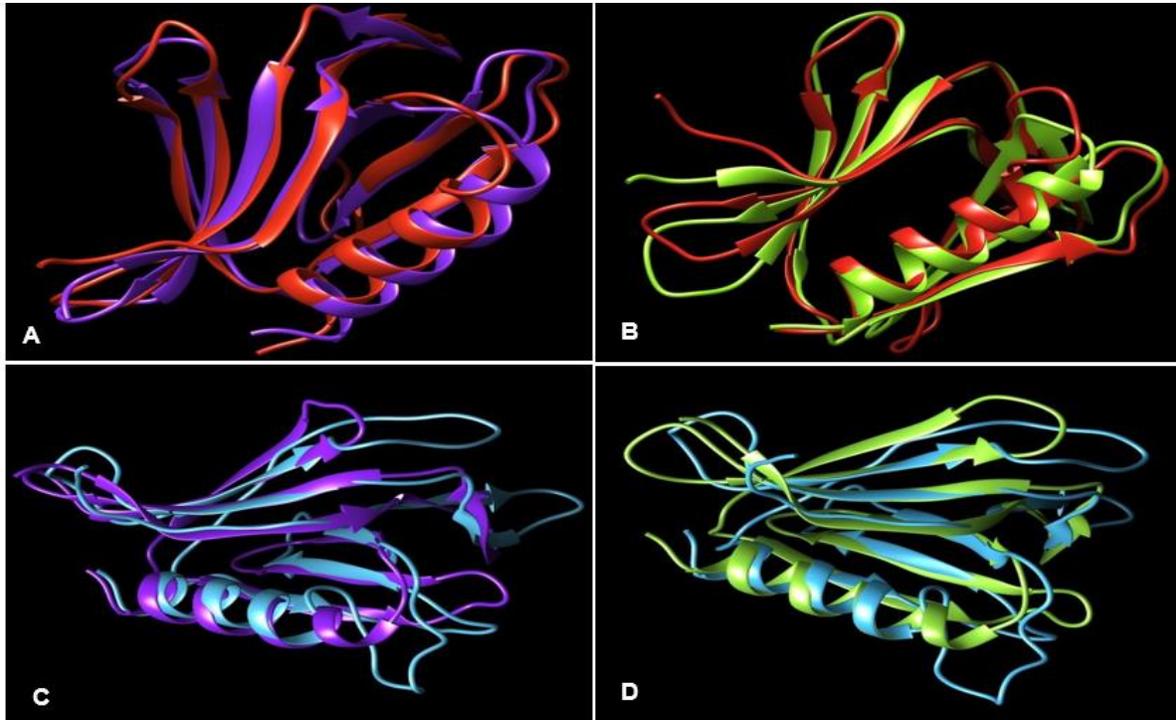


Fig. 10. Alineamiento tridimensional del dominio PRU (Rpn13) de *Naegleria* spp

Comparación estructural que presenta la secuencia del dominio PRU. A. *H. sapiens* (rojo) con *N. fowleri* (morado). B. *H. sapiens* con *N. gruberi* (verde). C. *S. cerevisiae* (azul) con *N. fowleri*. D. *S. cerevisiae* con *N. gruberi*.

De acuerdo con los resultados obtenidos, el dominio PRU de ambas especies del género *Naegleria* presenta mayor homología con el de *H. sapiens*, en relación con su secuencia primaria y los residuos de aminoácidos conservados para la interacción con otras proteínas, así como a su estructura tridimensional. Sin embargo, *S. cerevisiae* conserva los aminoácidos importantes para la función de Rpn13.

### **Alineamiento por conservación de las secuencias de la partícula regulatoria 19S entre *H. sapiens*, *S. cerevisiae*, *N. fowleri* y *N. gruberi***

Al alinear y analizar las secuencias con el algoritmo Clustal W (Jalview), las subunidades no ATPasas del proteosoma 19S de ambas especies de amibas mostraron regiones altamente conservadas (Fig. 11, tonalidad de azul fuerte), esto de acuerdo con los porcentajes de identidad obtenidos anteriormente. De la misma manera, la subunidad Rpn11 presentó mayores secuencias de conservación, mientras que Rpn13 obtuvo menor cantidad de estas áreas. Los residuos de menor grado de conservación entre todas las secuencias se observan en tonalidad azul claro (Fig. 11).

De acuerdo con los resultados de homología mostrados anteriormente, las subunidades ATPasas mostraron mayores regiones de conservación, siendo este superior al 60% de las secuencias (Fig. 12, tonalidad azul fuerte). De igual forma, se presentan residuos con menor grado de conservación entre las amibas del género *Naegleria* en relación con *H. sapiens* o *S. cerevisiae* (Fig. 12, tonalidad azul claro). Así, de acuerdo con los resultados obtenidos, las subunidades ATPasas muestran mayor porcentaje de conservación de secuencia peptídica entre los organismos modelos y las amibas del género *Naegleria* en comparación con las subunidades no ATPasas.

### Rpn10

<i>H. sapiens</i>	1	MVLESTMVVDNSSEYMRNGDFLPTRLQAQDQAVNIVCHSKTRSNPENNVGLITLAND-CELTTLTPDTRILSKLHTVQPKKITECTGIRVHHLALKHRQK--NHKRIIAFVGSFVEDNEKDLVKLAKR	130
<i>S. cerevisiae</i>	1	MVLEATVLVINDSEYSRNGDFPRTRFAEQIDSVEFIQAKRNSNPENTVGLISGAGANPRVLTSTFAEFGKILAGLHDTQIEGKLHMATALQIQLTLKHRQK--VQHQRIIAFVCSPIISDSRDELIRLAKT	131
<i>N. gruberi</i>	1	MK-EQCMICIDNSEWMRNGDYAPTRLDQAQLEAANLICGSKTQSNPETTIGVLTMGDSNPSVKVAPTTDLGKLLSSSSVSVGGDTHFSKALQIAYLVLKNRAPDQGTNRRLVIFVGSPIEENKDDLVLKGLR	132
<i>N. fowleri</i>	1	MK-EQCMICIDNSEWMRNGDYAPSRLAGQVEAANLICGSKTQSNPETTIGVLTMAEENPSVKVAPTTDLGKLLSSSVEIIGKQLQSKALQIAYLVLKNRAPDQGTNRRLVIFVGSPIEENKDDLVLKGLR	132
<i>H. sapiens</i>	131	LKKEKVVVDIINFGSEEVNTEKLTAFVNTLNGKDGTSHLVTVPPGPS-LADALISSPILAGEGGA-----MLGLGASDFEFGVDPSADPELALALRVSMEEQRQRQEEEARRAAASAAEAGI	248
<i>S. cerevisiae</i>	132	LKKNNVAVDIINFGIEQNTLELDEFIAAVNNPQETSHLLVTPGPRLLYENIASSPIILEEESGGMG-AFGGSG--GSDSANGTFMDFGVDPSMDPELAMALRLSMEEEQRQERLRQQQQQQDQPE--	258
<i>N. gruberi</i>	133	MKKNGVACDVIINFGEVHENTAKLEAFISSVNRD--DNSRMETIPGPHILSDMLLSSPIVGMGGAG-VSSSPSGTG-GAATGEGGGDFEFGVDPSLDPELAMAIRLSLEEKRRQEREKQSSGTSSTEQQA	261
<i>N. fowleri</i>	133	MKKNNVACDVIINFGEVQENTAKLEAFINAVNRD--DNSRMETVPPGPHILSDMLFSSPIVGMGGAG-VGAATGGAGVGTGEAGAGGGDFEFGVDPLDPELAMAIRLSLEEKRRQEREKQASASSATTQPE	262
<i>H. sapiens</i>	249	ATTGTED-----SDDALLKMTISQQEFGRTGLPDLSSMTEEEQIAYAMQMSLQGRFEGQAESA-----DIDASSAMDTSE--P-AKEEDDYDVMQDPEFLQSVLENLPGVDPNNEAIRNAMGSLA	360
<i>S. cerevisiae</i>	259	-----SEPEEQHDD-----	287
<i>N. gruberi</i>	262	AGSSSTE-----STSALPTTAASEP----TD-DDDIEMEDDEALEKALLSKDEAGMADEEEEMDEDAALAAALRMSME--SKKNDENIDDIVEDQEFMDLVG-----GLG	359
<i>N. fowleri</i>	263	TGATASSSTTAETSSTAAGTSTQAVPTTA--PP----QE-DEDVMDDDDALEKALLSKDEAGMVDEDD-----ELQQALKMSIDEAQNKKKNDENIEDIVEDQEFMDLVG-----GLG	364
<i>H. sapiens</i>	361	SQATKQ--GKKDKKEEDKK	377
<i>S. cerevisiae</i>		-----K	268
<i>N. gruberi</i>	360	KNVNSDEVLKKDKKDEEKK	378
<i>N. fowleri</i>	365	KNVNSDEVLK-KKKDEEKK	382

### Rpn11

<i>H. sapiens</i>	1	MD-RLRLGGGMPGLGQGPPTDAPAVDTAEQVYISSLALLKMLKHGRAGVPMVEMGLMLGEFVDDYTVRVIDVFAFPQSGTGVSVEAVDPVFAKMLDMLKQTRPEMVGWYHSHPGFGCWLSSVDINTQSS	132
<i>S. cerevisiae</i>	1	ME-RLQRLMMNSKVGS---ADTGRDDTKETVYISSIALLKMLKHGRAGVPMVEMGLMLGEFVDDYTVNVVDVFAFPQSGTGVSVEAVDDVFAKMMDMLKQTRDQVVVGWYHSHPGFGCWLSSVDVNTQKS	128
<i>N. gruberi</i>	1	MDPRLQRLIMDQMGGGGGMQGDQPLPDTAETVYISSLALLKMLKHGRAGVPMVEMGLMLGEFIDDYTVRCIDVFAFPQSGTGVSVEAVDPVFTKMLELLKQTRPEMVGWYHSHPGFGCWLSSVDINTQSS	133
<i>N. fowleri</i>	1	MDPRLQRLIMDQMGGGGMPNVGDQPLPDTAETVYISSLALLKMLKHGRAGVPMVEMGLMLGEFIDDYTVRCIDVFAFPQSGTGVSVEAVDPVFTKMLELLKQTRPEMVGWYHSHPGFGCWLSSVDINTQSS	133
<i>H. sapiens</i>	133	FEALSERAVAVVVDPIQSVKGVVVIDAFRLINANMMVLGHEPRQTTNGLHNLKPSIQALIHGLNRHYYSITINRYKNELEQKMLNLHKKSMGELTLDYSEHCKHNESVVKEMLELAKNYNKAVEEEDKM	265
<i>S. cerevisiae</i>	129	FEQLNSRAVAVVVDPIQSVKGVVVIDAFRLIDTGALENNLEPRQTTNGLLNKANIQALIHGLNRHYYSINIDYHKTAKETKMLMNLHKEQWQSGKLMYDYEKEESNLAATKSMVKIAEQYSKRIEELKEL	261
<i>N. gruberi</i>	134	FESLTKRSVAVVVDPIQSVKGVVVIDAFRLINPQLAMFGQEPQSTSVQGHNLKPTIQALIHGLNRHYYSMPISYRKNLELEQMLLHVHKKTWTEGLKLVDFHEHEKETEKTKSMVQLAKTYNKMVDEEGKS	266
<i>N. fowleri</i>	134	FESLTKRSVAVVVDPIQSVKGVVVIDAFRLINPQLAMFGQEPQSTSVQGHNLKPTIQALIHGLNRHYYSMPISYRKNLELEQMLLHVHKKTWTEGLKLVDFHEHEKETEKVLSMVELAKTYNKMIDEEGKT	266
<i>H. sapiens</i>	266	TPQLAIKNVGGKQDPKRHL EEHV DVLMTSNIVDCLAAMLDTVVEK	310
<i>S. cerevisiae</i>	262	TEELKTRYVGRQDPKKHLSETADELENNIVSVLTAGVNSVAIK	306
<i>N. gruberi</i>	267	SREEYQLANVGKLD SKRHLENSVETLMGSNVNDLGMMLNTIIF-	310
<i>N. fowleri</i>	267	SREYQLANVGKLDPKRHLESSEALMGSNVNDLGMMLNTVIF-	310

### Rpn13

<i>H. sapiens</i>	1	MTTSGALFPLVPGSRGASNKYLVEFRAGKMSL-KGTTVTPDKRKLVIYI-QQ-TD-DSLHFCWKDRTSQNV-E--D--DLIFPDCEFKRVPQCPSSGRVYVLFKAGSKRFLFWMQEPKTDQDEEHRK	123
<i>S. cerevisiae</i>	1	MSMS-----STVIKFRAGVCEYNEDSRLECTPIPVQGEIEIKPNEEEELGFWDFEWRPTEK-PVGRLEDLSLILIPGETMWPVVKSSKSGRIFALVFSN-ERYFWLDEKNSGNL-----	109
<i>N. gruberi</i>	1	MSSIN-LFNTP-----QGPRPLVEFRAGKLTKE-EGSVVKADNRKGIIVLVAGSDE-DPLVHFQWRDRSD-KVI---E--DFILFGQDVTFSKVDKVKDGRVYLLKFTNG-REAFYWMQEPKTDKDAEYK	116
<i>N. fowleri</i>	1	MSNIN-LFDRPA-----SGPRPLIEFRAGKMTK-EGNTVKADTRKGIKALIID-PE-DGLLHFQWRDRSD-KVI---D--DSVFGQDVTFSRVKVDGRVYLLKFTSG-RELFYWMQEPKTDKDEYERK	116
<i>H. sapiens</i>	124	VNEYLNPPMPGALGASGSSGHELSSALGGEGGLQSLLGNNMSSQLMQLIGPAAGLGGGLGALTGPGLASLLGSSGPPGSSSSSSSSRSQSAAVTPSSTTSSSTRATPAPSAPAAASATSPSP-----A	246
<i>S. cerevisiae</i>	110	-----P-----	110
<i>N. gruberi</i>	117	INEYINPPLEGDDM-----ADED-----LLP---T-----SS-----SQS-ATAPTSTNTSSQSAVQLDQLTRIIQGINPTG-----A	174
<i>N. fowleri</i>	117	INEYIENPPMEG-M-----NDED-----IPP---Q-----PT-----ATT-TPSETSTPPQNAVQLDQLSRIIQGINPTAPTSGTQQASAT	184
<i>H. sapiens</i>	246	PSSGNGASTAASPTPIQLSDLSILATMNVPAAGGQVQLASVLTPEIMAPILAN-ADV--QE-RLLPYLPSGESLPQTADIEQNTLTSPPQFQALGMFSAALASGQLGPLMCCFGLPAEAVEAANKGD	373
<i>S. cerevisiae</i>	111	-----LNELSAKDKETYNKMIQVNLNMSSEDEE-ESND-----	142
<i>N. gruberi</i>	175	QPQSSSQSSSQGSSSQ-NESASLQEI MKSLD---RQKQSIGLDQILTSSELSLTKRNTSINNRD-ELFSNLPEGDNE-KSTQNLLSHIRSPQFRQLDVFGTALATGQLGGLMREFGLDPSVVDPMRGGG	300
<i>N. fowleri</i>	185	TPSQSSSQSSSQGSSSQ-NTEASLQELLRNFQEHQ-RERKQIJALEHVLSQDAINEIKRHPSELNRD-ELFANLPEGDD-RSAQTLSSHIRSPQFRQLDVFSGSAMSTGQLSGLMRDFGLDPSVADPFRGGG	313
<i>H. sapiens</i>	374	VEAFAKAMQNAKPE-QKEGDTKDKKDEEEDMSL-D	407
<i>S. cerevisiae</i>	143	-----E-KQKA-----QDVVDSMQD	156
<i>N. gruberi</i>	301	LLKFLDALAK--KEEKKPEDKMEDDKKE-----	327
<i>N. fowleri</i>	314	LLSFLTALAK--KEE-KKEGDKMEDENQEGKQ----	342

Fig. 11. Alineamiento por conservación de las subunidades no ATPasas del proteosoma 19S  
El orden de las secuencias mostradas corresponde a: *H. sapiens*, *S. cerevisiae*, *N. gruberi* y *N. fowleri*, respectivamente.

### Rpt2

<i>H. sapiens</i>	1	MGQSQGGHGPE----GGGKKDD-----KDKKKYEPVPTRVKKKKTKGPDASKFLVTFHTQRLKLLKLERIKOYLLMEEFIRNQEOMKPLEEK---QEERSKVDLDRGTPMSVGTLEEIIDN	119
<i>S. cerevisiae</i>	1	MGQGVSSGQDK-----KK---KKGSNQPKYEPVQSKFRKRRK--GGPATAEKLRFNIYPTSTRCKLKLRLMERIKDHLLEEFVSNSEILKPFEEK---QEEEKQLEEIRGNPLSIGTLEEIIDD	116
<i>N. gruberi</i>	1	MGNAPSGGQDPFQ-LPGAGKKQNKDDKKKKKKEKKEFEPVPTRIQRKRRK-KGPQIAEKLPEVTPVSKCKLRILRLERVKDYLTMEKEFVTNQTLLTAQEKSKDMEEERNMVDLRSMPMAVGTLEEIIDN	131
<i>N. fowleri</i>	1	MGNVPSGGQNPFNQLPGAGSQKKKDDKKKKKKEKKEFEDPTTRIGRKKRK-KGPQIAEKLPEVTPLSKCKLRLLRLERIQDYLTMEKEFVTNQAQLLSAQEKSKDMQERNMVDLRSMPMAVGTLEEIIDN	132
<i>H. sapiens</i>	120	HAI VSTSVGSEHYVSLSFVDDKDLLEPGCSVLLNHKVVHAIIVGLMDDTDFLTVMMKVEKAPQETIADTGGLEDNDIQEIKESVELPLTHPEYIEMGIKPPKGVILYGPFGTGKTLAKAVANQTSATFLRVVG	252
<i>S. cerevisiae</i>	117	HAI VTSPTMPDYYSILSFVDEKLELPGCSVLLHHTMSIVGLQDDADPMVSMVMKDKSPTESYSDTGGLESQIQEIKESVELPLTHPELYEMGIKPPKGVILYGPFGTGKTLAKAVANQTSATFLRVVG	249
<i>N. gruberi</i>	132	HAI VSSVSGPEFYVSLISIVDDKQLEPGCSILMHNRYLAVVGI LQDEADPMVSMVKVDKAPLESYSQ TGGLEDQIQEIKEAVEFPLTHPELYEDIKIKPPKGVILYGPFGTGKTLAKAVAHHTSATFLRVVG	264
<i>N. fowleri</i>	133	HAI VSSVSGPEFYVSLISIVDDKQLEPGCSVLMHNRYLAVVGI LQDEADPMVSMVKVDKAPLESYSQ TGGLEDQIQEIKEAVEFPLTHPELYEDIKIKPPKGVILYGPFGTGKTLAKAVAHHTSATFLRVVG	265
<i>H. sapiens</i>	253	SEL IQKYLGDGPKLVRELFRVAEEHAPSIVFIDEIDAIGTKRYDSN SGGEREIQRTMLELLNQLDGFDSRQDVKVI MATNR IETLDPALIRPGRIDRKIEFELPDEKTKRIFQIHTSRMTLADVTLDDLIM	385
<i>S. cerevisiae</i>	250	SEL IQKYLGDGPRLCRQIFKVAENAPSIVFIDEIDAIGTKRYDSN SGGEREIQRTMLELLNQLDGFDDRQDVKVI MATNR IETLDPALIRPGRIDRKILFENPDLSTKKILGHTSKMNLSEDVNLLETVT	382
<i>N. gruberi</i>	265	SEL IQKYLGEQPKLVRELFRVAEELAPSIVFIDEIDAIGTKRFDSTSGGEREIQRTMLELLNQLDGFDSRQDVKVI MATNR IESLDTALIRPGRIDRKIKFPPFDVKTARKIFEIHTRKMNSKATDVNLDEFIS	397
<i>N. fowleri</i>	266	SEL IQKYLGEQPKLVRELFRVAEELAPSIVFIDEIDAIGTKRFDSTSGGEREIQRTMLELLNQLDGFDSRQDVKVI MATNR IESLDTALIRPGRIDRKIKFPPFDVKTARKIFEIHTRKMNSKATDVNLDEFIS	398
<i>H. sapiens</i>	386	AKDLSGADIKAICTEAGLLALRERRRMMKVTNEDFKKSKENVLYKKQEGTPEGLYL	440
<i>S. cerevisiae</i>	383	TKDLSGADIQAMCTEAGLLALRERRRMMKVTNEDFKKSKENVLYKKQEGTPEGLYL	437
<i>N. gruberi</i>	398	SKDLSGADIKAICTEAGLLALRERRRMMKVTNEDFKKSKENVLYKKQEGTPEGLYL	462
<i>N. fowleri</i>	399	SKDLSGADIKAVCTEAGLLALRERRRMMKVTNEDFKKSKENVLYKKQEGTPEGLYL	463

### Rpt3

<i>H. sapiens</i>	1	MEEIGIL--VEKA-----QDEIPALSV-SRPQTGLSFL-GP--EPE-DLEDLVSRYKQLQEELEFLEVDEEYIKDEQKNLKEFLHAQEEVKRIGIPLVIGQFLEAVDQNTAVGTTGSSNYVVRILS	117
<i>S. cerevisiae</i>	1	MEELGIVTPVEKA-----VEEKPAVKSYASLALQNLNGTVNNSALSNNVSDIYFKLKKLEKEYELLTDEEYIKDEQRHLKRELKRAQEEVKRIGIPLVIGQFLEAVDQNTAVGTTGSSNYVVRILS	124
<i>N. gruberi</i>	1	MSSEAAP-----PL--VPDITEQDLKYLKXHI ESELEFNDIQEYVYKQKRLKRELMRAKEEVKRIKSVPLVIGQFLEMIDQNSGIISSTTGSSSHVRILS	95
<i>N. fowleri</i>	1	MDELGLG--KHKQSPGGADQMDVDEVSQAQAQATEQQDELSVLLKPL--LQELSEQDLKYLKXHI ESELEFNDIQEYVYKQKRLKRELMRAKEEVKRIKSVPLVIGQFLEMIDQNTGIISSTTGSSSHVRILS	129
<i>H. sapiens</i>	118	TIDRELLKPNASVALHKSVALVDVLPPEADSSIMMLTSDQKPDVMYADIGGMDIQKQEVREAVELPLTHFELYKQIGIDPPRGVLLYGGPGGKTMKAKAVAHHTTAAFI RVVGSSEFVQKYLGEGRPMVRDV	250
<i>S. cerevisiae</i>	125	TIDRELLKPNASVALHKSVALVDVLPPEADSSIMMLTSDQKPDVMYADIGGMDIQKQEVREAVELPLTHFELYKQIGIDPPRGVLLYGGPGGKTMKAKAVAHHTTAAFI RVVGSSEFVHKKYLGEGRPMVRDV	257
<i>N. gruberi</i>	96	TIDRELLKPNASVALHKSVALVDVLPPEADSSIQLVASDERPDVYSDIGGLDIQKQEI REAVELPLTHFELYKQIGIDPPRGVLLYGGPGGKTMKAKAVAHHTTAAFI RVVGSSEFVQKYLGEGRPMVRDV	228
<i>N. fowleri</i>	130	TIDRELLKPNASVALHKSVALVDVLPPEADSSIQLVGANERPDMYADIGGLDIQKQEI REAVELPLTHFELYKQIGIDPPRGVLLYGGPGGKTMKAKAVAHHTTAAFI RVVGSSEFVQKYLGEGRPMVRDV	262
<i>H. sapiens</i>	251	FRLAKENAPATIFIDEIDAIA TKRFDAQTGADREVQRILLELLNQMDGFDQNVNKKVIMATNRADTLDPALLRPGRDRKIEFF-LPDRRQKRLIFSTITSKMNLSEEDVLEDYMARPKISGADNSICDES	382
<i>S. cerevisiae</i>	258	FRLARENAPATIFIDEVDSIATKRFDAQTGADREVQRILLELLNQMDGFDQNTNKKVIMATNRADTLDPALLRPGRDRKIEFF-LPDRRERRLIFGTIASKMSLAPEADLDSLIRNDLSGAVIAAMDEA	390
<i>N. gruberi</i>	229	FRLARENAPATIFIDEVDSIATKRFDAQTGADREVQRILLELLNQMDGFDQNTNKKVIMATNRADTLDPALLRPGRDRKIEFF-LPDRRQKRLVQVCTSKMNLSEEDVLEDVSRPKISCAEITACDEA	360
<i>N. fowleri</i>	263	FRLARENAPATIFIDEVDSIATKRFDAQTGADREVQRILLELLNQMDGFEQNTNKKVIMATNRADTLDPALLRPGRDRKIEFF-LPDRRQKRLVQVCTSKMNLSEEDVLEDVSRPKISCAEITACDEA	394
<i>H. sapiens</i>	383	GMLAVRENRYIVLAKDFEKAYKTVIKKDEQEH--EFY-K	418
<i>S. cerevisiae</i>	391	GLRAVRKNRYVILQSDLEEAYATQVKTNTVDKDFDY-K	428
<i>N. gruberi</i>	361	GMQAVRKNRYVVTSKDFEKGKAVRKTGGEH--EYLLK	397
<i>N. fowleri</i>	395	GMQAVRKNRYVVTAKDFEKGKTHVRKTGGDH--EYLLR	431

### Rpt5

<i>H. sapiens</i>	1	-----MNLNPIESPVRQEKMAT---VWDEA-EQDGI SEEVLKMSTEEIIQRTRLDSEIKIMKSEVLVTHELQAMKDKIKENSEKIKVNTLPLYVSNVIELLDVDP-----NDQ	104
<i>S. cerevisiae</i>	1	-----MATLEELDA-----QTLP-GDDELQDEILNLSSTQELQTRAKLDNEIRIFRSELQRLSHENVMLEKIKDNKEIKNNRQLPLYVANVVEVMDMNEIEDKENSE	98
<i>N. gruberi</i>	1	-----MQSSQKKWTKDEVLETFEGDIACAGTDEIEHRSRLIDNEIHVFRNEKKRIQYEENTMKEKIKENVEKIKLNKQLPLYVATVVEILETDE-----NEE	92
<i>N. fowleri</i>	1	KIRSSWPLHTMRMKTGMFKLLIVFQIQQFIFKQKKMQSSQKKWTKEEVLTFEGDIACAGTDEIEHRSRLIDNEIHVFRNEKKRIQYDETTMKEKIKENTEKIKLNKQLPLYVATVVEILETDE-----NEE	128
<i>H. sapiens</i>	105	EEDGANIDLQSRKQKCAVIKTSTRQTYFLPVIGLVDAEKLKPGDLVGVNKSDFLILETLPTPEYDSRVKAMEVDERPTEQYSDIGGLDKDIQELVEAIVLPMNHKEKFNELGIQPPKGVLMYGGPGTGKTL	238
<i>S. cerevisiae</i>	99	STTDGQNVNLDNTAVGHAAVVKTSSRQTYFLPMVGLVDPKLKPNDLVGVNKSDFLILETLPTPEYDSRVKAMEVDEKPTETYSDDVGLDKDIQELVEAIVLPMKRADKFKDMGIRAPKALMYGGPGTGKTL	231
<i>N. gruberi</i>	93	IQQGSSVDLDEERKGSAAVIKTSTRQTIYLPVIGLVDSDELKPGELVGVNKSDFLVLEKLPSEYDSRVKAMEVDEKPKEDYSDIIGGCAADIKEMYEAIVLPMNQADRFTKIGISPPKGVLLYGGPGTGKTL	225
<i>N. fowleri</i>	129	IQQGSSIALDEDKKGSAAVIKTSTRQTIYLPVIGLVDSDELKPGELVGVNKSDFLVLEKLPSEYDSRVKAMEVDERPKEDYDQIIGGCAADIKEMYEAIVLPMTEADRKKIGIQPPKGVLLYGGPGTGKTL	261
<i>H. sapiens</i>	237	ARACAQTKATFLKLAGPQLVQMFIGDGAKLVRDAFALAKEKAPSIIFIDEIDAIGTKRFDSEKSGDREVQRTMLELLNQLDGFQPNQVQVIAATNRVDILDPALLRSGRDRKIEFPMPNEEARARIMQIH	369
<i>S. cerevisiae</i>	232	ARACAQTNATFLKLAGPQLVQMYIGEBAKLVRDAFALAKEKAPSIIFIDEIDAIGTKRFDSEKSGDREVQRTMLELLNQLDGFSSDQVQVIAATNRVDILDPALLRSGRDRKIEFPMPNEEARARIMQIH	364
<i>N. gruberi</i>	226	ARACAQTKATFLKLAGPQLVQMFIGDGAKLVRDAFALAREKAPSIIFIDEIDAIGTKRFDSEKSGDREVQRTMLELLNQLDGFSDQTRVQVIAATNRVDILDPALLRSGRDRKIEFPMPNEEARARIMQIH	358
<i>N. fowleri</i>	262	ARACAQTKATFLKLAGPQLVQMFIGDGAKLVRDAFALAREKAPSIIFIDEIDAIGTKRFDSEKSGDREVQRTMLELLNQLDGFSDQTRVQVIAATNRVDILDPALLRSGRDRKIEFPMPNEEARARIMQIH	394
<i>H. sapiens</i>	370	SRKMNVS-PDVNYEELARCTDDFNGAQCKAVCEAGMIALRRGATELTHEDYMEGILEVQAKKANLQYYA	439
<i>S. cerevisiae</i>	365	SRKMTTD-DDINWQELARSTDEFNGAQLKAVTVEAGMIALRRGQSSVHKHEDFVEGISEVQARKSKSVSFFYA	434
<i>N. gruberi</i>	359	SKRMTVH-EDVNWEEISRCCDFNGAQMKAVCEAGMIALRRDQATQVMHEDFMEGVAAVQAKKKVALNYYA	428
<i>N. fowleri</i>	395	SKRMNWFDDVNYEELARCCDFNGAQLKAVCEAGMIALRRDQATQIMHEDFMEGIAAVQAKKKVALDYYA	465

Fig. 12. Alineamiento por conservación de las subunidades ATPasas del proteosoma 19S  
El orden de las secuencias mostradas corresponde a: *H. sapiens*, *S. cerevisiae*, *N. gruberi* y *N. fowleri*, respectivamente

## Identificación de dominios en las subunidades putativas de la partícula reguladora de *Naegleria* spp.

A partir de las secuencias, tanto ATPasas como no ATPasas identificadas en el género *Naegleria*, se realizó la búsqueda y comparación de los dominios funcionales característicos de cada subunidad. De manera tal que, al realizar la búsqueda de los dominios específicos que cada subunidad no ATPasa analizada presente, se identificó la presencia en Rpn10 del dominio VWA (Von Willebrand A) el cual permite la unión de esta subunidad con el proteosoma, y se encuentra presente en ambas especies de amiba. En esta misma subunidad también fue posible identificar al dominio UIM, indispensable para la unión a la cadena de ubiquitina. Para el receptor Rpn13, se identificaron los dominios PRU (también mostrado como PH o Rpn13) el cual se une con la cadena de ubiquitina y el dominio DEUBAD (Rpn13\_C) ubicado en el extremo C-terminal, que le permite unirse a otra enzima desubiquitinizante conocida como Uch37. Por otra parte, la subunidad Rpn11 presentó el dominio MPN (JAB) presente en su región N-terminal, asimismo se identificó el motivo JAMM el cual es esencial para su función como enzima desubiquitinizante. En las tres subunidades analizadas, los dominios se encuentran en intervalos similares entre ambas especies de amiba, en relación con cada programa utilizado; el valor de  $e$  obtenido es cercano a 0 e incluso el valor del Bit score en todos los casos es superior al 50%, dándonos así una buena confiabilidad (tabla 6).

Cabe mencionar que en los organismos modelos (*H. sapiens* y *S. cerevisiae*), también se analizó la presencia de estos dominios, para realizar una comparación con los encontrados en las especies de *Naegleria*. Todos los dominios mencionados, así como los criterios de evaluación adecuados para el estudio fueron encontrados en los organismos modelos; a excepción del dominio Rpn13\_C en *S. cerevisiae*. Es necesario recordar que la secuencia de Rpn13 en este organismo no presenta esta región C-terminal (tabla suplementaria 1). Así, se puede señalar que, tanto *N. fowleri* como *N. gruberi*, presentan los dominios característicos de las subunidades Rpn10, Rpn13 y Rpn11, considerados indispensables para el

reconocimiento de los sustratos, así como el rompimiento de las cadenas de ubiquitina.

Tabla 6. Dominios característicos encontrados en las subunidades no ATPasas de la partícula reguladora 19S de *N. fowleri* y *N. gruberi*

	NCBI Conserved Domain	InterPro	Pfam	Prosite
<b>Rpn10</b>				
<i>N. fowleri</i>	<b>Superfamilia vWFA</b> Intervalo: 3-188 Valor de e: 2.57e-82	<b>VWF_A</b> Intervalo: 2-189  <b>UIM</b> Intervalo: 225-340	<b>VWA_2</b> Intervalo: 6-114 Bit score: 67.6 Valor de e: 1.3e-18	<b>VWFA</b> Intervalo: 4-189 Score: 9.161  <b>UIM (2)</b> Intervalo: 225-244 / 301-320 Score: 9.601 / 8.766
<i>N. gruberi</i>	<b>Superfamilia vWFA</b> Intervalo: 3-188 Valor de e: 1.35e-79	<b>VWFA</b> Intervalo: 2-189  <b>UIM</b> Intervalo: 224-337	<b>VWA_2</b> Intervalo: 6-114 Bit score: 74.1 Valor de e: 1.2e-20	<b>VWFA</b> Intervalo: 4-189 Score: 10.499  <b>UIM (3)</b> Intervalo: 224-243 / 291-310 / 318-337 Score: 9.761 / 9.264 / 9.601
<b>Rpn13</b>				
<i>N. fowleri</i>	<b>Superfamilia tipo PH</b> Intervalo: 18-121 Valor de e: 2.35e-46  <b>Superfamilia RPN13_C</b> Intervalo: 210-321 Valor de e: 1.44e-23	<b>RPN13_C</b> Intervalo: 207-321	<b>RPN13_C</b> Intervalo: 207-321 Bit score: 82.0 Valor de e: 3.3e-23  <b>Proteasome_Rpn13</b> Intervalo: 23-104 Bit score: 86.3 Valor de e: 1.5e-24	<b>PRU</b> Intervalo: 12-124 Score: 46.8.97  <b>DEUBAD</b> Intervalo: 217-331 Score: 14.919
<i>N. gruberi</i>	<b>Superfamilia tipo PH</b> Intervalo: 17-121 Valor de e: 5.29e-45  <b>Superfamilia RPN13_C</b> Intervalo: 204-308 Valor de e: 8.38e-27	<b>RPN13_C</b> Intervalo: 197-308	<b>RPN13_C</b> Intervalo: 197-308 Bit score: 86.9 Valor de e: 9.7e-25  <b>Proteasome_Rpn13</b> Intervalo: 25-104 Bit score: 84.5 Valor de e: 5.5e-24	<b>PRU</b> Intervalo: 11-124 Score: 46.258  <b>DEUBAD</b> Intervalo: 204-318 Score: 16.748

<b>Rpn11</b>				
<i>N. fowleri</i>	<b>Superfamilia MPN</b>	<b>MPN</b> Intervalo: 32-167	<b>JAB</b> Intervalo: 29-137	<b>MPN</b> Intervalo: 32-167 Score: 34.630
	Intervalo: 22-287	<b>JAMM/PMN+_dom</b> Intervalo: 29-166	Bit score: 106.9	
	Valor de e: 4.82e-147	<b>Rpn11/EIF3F_C</b> Intervalo: 174-303	Valor de e: 5.7e-31	
		<b>MitMen_reg</b> Intervalo: 174-302	Bit score: 44.0	
		Valor de e: 2.5e-11		
<i>N. gruberi</i>	<b>Superfamilia MPN</b>	<b>MPN</b> Intervalo: 32-167	<b>JAB</b> Intervalo: 29-137	<b>MPN</b> Intervalo: 32-167 Score: 34.630
	Intervalo: 22-287	<b>JAMM/PMN+_dom</b> Intervalo: 29-166	Bit score: 108.6	
	Valor de e: 9.32e-148	<b>Rpn11/EIF3F_C</b> Intervalo: 174-303	Valor de e: 1.8e-31	
		<b>MitMen_reg</b> Intervalo: 174-301	Bit score: 40.8	
		Valor de e: 2.5e-10		

Por otra parte, las subunidades ATPasas en ambas especies de *Naegleria* mostraron la presencia de los dominios AAA (grande y pequeño), considerados indispensables en estas subunidades, ya que su movimiento impulsa la translocación del sustrato hacia el centro catalítico del proteosoma 20S. Además, se encontró el dominio OB encargado de definir el puerto de entrada del sustrato hacia el complejo multicatalítico. Ambos dominios mostraron valores de e cercanos a 0 y un valor de Bit score superior al 100%, para el caso del dominio AAA grande, mientras que para los dominios AAA pequeños y OB se obtuvieron valores del 30-40% (tabla 7).

Estos dominios también fueron analizados y comparados con los de *H. sapiens* y *S. cerevisiae* (tabla suplementaria 2), mostrando que ambas amibas están presentando los dominios característicos de las subunidades ATPasas que han sido reportados en los organismos modelos.

Tabla 7. Dominios característicos encontrados en las subunidades ATPasas de la partícula regulatoria 19S de *N. fowleri* y *N. gruberi*

NCBI Conserved Domain		InterPro	Pfam	Prosite
<b>Rpt2</b>				
<i>N. fowleri</i>	<b>PTZ00361</b> Intervalo: 1-453 Valor de e: 0e-00	<b>Prot_ATP_ID_OB</b> Intervalo: 122-176  <b>ATPasa_AAA_core</b> Intervalo: 235-367  <b>AAA+ATPasa</b> Intervalo: 231-370  <b>AAA_lid_3</b> Intervalo: 390-433	<b>AAA</b> Intervalo: 235-367 Bit score: 139.2 Valor de e: 1.0e-40  <b>Prot_ATP_ID_OB</b> Intervalo: 122-176 Bit score: 38.2 Valor de e: 1.0e-09  <b>AAA_lid_3</b> Intervalo: 390-433 Bit score: 41.1 Valor de e: 1.1e-10	<b>AAA</b> Intervalo: 338-356
<i>N. gruberi</i>	<b>PTZ00361</b> Intervalo: 38-452 Valor de e: 0e-00	<b>Prot_ATP_ID_OB</b> Intervalo: 121-175  <b>ATPasa_AAA_core</b> Intervalo: 234-366  <b>AAA+ATPasa</b> Intervalo: 230-369  <b>AAA_lid_3</b> Intervalo: 389-432	<b>AAA</b> Intervalo: 234-366 Bit score: 140.7 Valor de e: 3.6e-41  <b>Prot_ATP_ID_OB</b> Intervalo: 121-175 Bit score: 35.5 Valor de e: 6.8e-09  <b>AAA_lid_3</b> Intervalo: 389-432 Bit score: 39.4 Valor de e: 3.7e-10	<b>AAA</b> Intervalo: 337-355
<b>Rpt3</b>				
<i>N. fowleri</i>	<b>PTZ00454</b> Intervalo: 47-428 Valor de e: 0e+00	<b>Prot_ATP_ID_OB</b> Intervalo: 101-156  <b>ATPasa_AAA_core</b> Intervalo: 214-347  <b>AAA+ ATPasa</b> Intervalo: 210-349  <b>AAA_lid_3</b> Intervalo: 369-413	<b>AAA</b> Intervalo: 214-347 Bit score: 148.4 Valor de e: 1.4e-43  <b>Prot_ATP_ID_OB</b> Intervalo: 101-156 Bit score: 30.0 Valor de e: 3.6e-0  <b>AAA_lid_3</b> Intervalo: 369-413 Bit score: 39.4 Valor de e: 3.7e-10	<b>AAA</b> Intervalo: 317-335
<i>N. gruberi</i>	<b>PTZ00454</b> Intervalo: 1-394 Valor de e: 0e+00	<b>Prot_ATP_ID_OB</b> Intervalo: 67-122  <b>ATPasa_AAA_core</b> Intervalo: 180-313  <b>AAA+ ATPasa</b> Intervalo: 176-315  <b>AAA_lid_3</b> Intervalo: 335-379	<b>AAA</b> Intervalo: 180-313 Bit score: 147.5 Valor de e: 2.7e-43  <b>Prot_ATP_ID_OB</b> Intervalo: 67-122 Bit score: 33.5 Valor de e: 3.0e-08  <b>AAA_lid_3</b> Intervalo: 335-379 Bit score: 39.0	<b>AAA</b> Intervalo: 283-301

Rpt5				
Valor de e: 5.0e-10				
<i>N. fowleri</i>	Superfamilia RPT1 Intervalo: 62-458 Valor de e: 0e+00	Prot_ATP_ID_OB Intervalo: 114-190	AAA Intervalo: 248-381 Bit score: 142.8 Valor de e: 8.2e-42	AAA Intervalo: 351-369
		ATPasa_AAA_core Intervalo: 248-381	Prot_ATP_ID_OB Intervalo: 114-190 Bit score: 70.0 Valor de e: 1.2e-19	
		AAA+_ATPasa Intervalo: 244-383	AAA_lid_3 Intervalo: 404-448 Bit score: 46.2 Valor de e: 2.9e-12	
		AAA_lid_3 Intervalo: 404-448	AAA_lid_3 Intervalo: 404-448 Bit score: 46.2 Valor de e: 2.9e-12	
		Prot_ATP_ID_OB Intervalo: 78-154	AAA Intervalo: 212-345 Bit score: 144.2 Valor de e: 2.9e-42	
		ATPasa_AAA_core Intervalo: 212-345	Prot_ATP_ID_OB Intervalo: 78-154 Bit score: 70.5 Valor de e: 8.3e-20	
<i>N. gruberi</i>	Superfamilia RPT1 Intervalo: 25-421 Valor de e: 0e+00	AAA+_ATPasa Intervalo: 208-347	AAA_lid_3 Intervalo: 367-411 Bit score: 40.3 Valor de e: 2.0e-10	AAA Intervalo: 315-333
		AAA_lid_3 Intervalo: 367-411	AAA_lid_3 Intervalo: 367-411 Bit score: 40.3 Valor de e: 2.0e-10	
		Prot_ATP_ID_OB Intervalo: 78-154	AAA Intervalo: 212-345 Bit score: 144.2 Valor de e: 2.9e-42	
		ATPasa_AAA_core Intervalo: 212-345	Prot_ATP_ID_OB Intervalo: 78-154 Bit score: 70.5 Valor de e: 8.3e-20	
		Prot_ATP_ID_OB Intervalo: 114-190	AAA Intervalo: 248-381 Bit score: 142.8 Valor de e: 8.2e-42	
		ATPasa_AAA_core Intervalo: 248-381	Prot_ATP_ID_OB Intervalo: 114-190 Bit score: 70.0 Valor de e: 1.2e-19	

El dominio “coiled coil” presente en las subunidades ATPasas es el encargado de promover el ensamblaje adecuado de la partícula regulatoria, ya que hace contacto con regiones de la base y de la tapa de ésta. Así, en *N. fowleri* se determinó que para el caso de Rpt2 fue encontrado este dominio utilizando el programa Marcoil.01 (Last modified: Feb 11, 2008) (fecha consulta: 27/noviembre/2020) tomando en cuenta el criterio de evaluación Threshold (superior al 50%): este valor nos indica que entre más alto sea menor es la probabilidad de que el resultado obtenido sea azaroso; sin embargo, para el caso de *N. gruberi* este dominio no cumplió el criterio de evaluación por lo cual no fue tomado en cuenta. Para las subunidades Rpt3 y Rpt5 en ambas amibas el dominio fue detectado con un criterio de 50-90% (Tabla 8).

Tabla 8. Dominio “Coiled Coil” encontrado en las subunidades ATPasas de la partícula regulatoria 19S de *N. fowleri* y *N. gruberi*

Subunidad	<i>N. fowleri</i>		<i>N. gruberi</i>	
	Intervalo	Threshold %	Intervalo	Threshold %
Rpt2	92 - 108	50	-	-
Rpt3	53 - 92	90	21 – 58	90
Rpt5	64-105	50	28 - 69	50

De acuerdo con los resultados obtenidos, tanto las subunidades no ATPasas como las ATPasas del proteosoma 19S en *N. fowleri* y *N. gruberi* presentan los dominios característicos que han sido descritos para las secuencias en los organismos modelos. Estos dominios son indispensables para su correcto funcionamiento, sugiriendo que es probable que las secuencias putativas en ambas amibas sean funcionales.

### **Búsqueda de modificaciones postraduccionales presentes en las secuencias de las subunidades de la partícula regulatoria en *Naegleria* spp**

Las modificaciones postraduccionales son esenciales para el funcionamiento de las proteínas. En el caso del proteosoma se sabe que las subunidades presentan varias de estas modificaciones para su buen funcionamiento. Por lo tanto, se analizaron en las secuencias recuperadas de las especies de *Naegleria*, las modificaciones que han sido reportadas en los organismos modelos. Así, se encontró que en las subunidades no ATPasas analizadas, la ubiquitinación tiene la función de regular la interacción con los sustratos poliubiquitinados; esta modificación se detectó en las tres subunidades e incluso mostró algunos sitios conservados entre ambas amibas en Rpn10 y Rpn11. Los receptores Rpn10 y Rpn13 en ambas especies de *Naegleria* mostraron diversos sitios para la fosforilación la cual regula la estabilidad, el ensamblaje y la actividad enzimática. La modificación de sumoilación encargada de dar estabilidad a la proteína y del transporte de éstas, fue encontrada en la posición 210 en la secuencia de Rpn11, siendo el mismo sitio en ambas amibas. Por otra

parte, Rpn13 mostró diversos sitios de acetilación tanto para *N. fowleri* como para *N. gruberi*, siendo esta modificación la encargada de la inactivación de las proteínas (tabla 9).

Tabla 9. Modificaciones postraduccionales encontradas en las subunidades no ATPasas de la partícula reguladora 19S de *N. fowleri* y *N. gruberi*

Subunidad	Modificación	Número (posición)	
		<i>N. fowleri</i>	<i>N. gruberi</i>
Rpn10	Ubiquitinación	2, 249	2, 248
	Fosforilación	46, 255, 258, 263, 271, 272, 275, 278, 281, 283, 288	46, 161, 204, 253, 276, 283
Rpn11	Ubiquitinación	44, 282	41, 44, 282
	Sumoilación	210	210
Rpn13	Ubiquitinación	323, 324, 327, 341	23, 78, 303, 325
	Acetilación	38, 221, 327, 328, 332, 341	315, 316, 320, 325, 326
	Fosforilación	31, 149, 162, 174, 182, 184, 187, 192, 199, 266	138, 141, 153, 163, 172, 180, 188, 230, 240, 251

Para el caso de las ATPasas, las modificaciones que fueron detectadas en las tres subunidades analizadas fueron: ubiquitinación, encontrándose en un solo sitio para Rpt2 y Rpt3, mientras que Rpt5 presentó diversos sitios para esta modificación. Igualmente, se detectaron posibles residuos para acetilación principalmente en Rpt2; así como sitios de fosforilación, en donde Rpt3 mostró un solo sitio en comparación a Rpt2 y Rpt5 en donde fueron detectados varios residuos. Además, en Rpt3 también se encontró un sitio de sumoilación, siendo una modificación conservada ya que ambas amibas presentaron los mismos residuos. Mientras que para Rpt2, se detectó la presencia de un sitio de miristoilación, actividad que es indispensable para la interacción proteína-membrana, así como la localización celular de las proteínas. Esta modificación también se encuentra en un sitio

conservado en las especies de *Naegleria*, ocupando el residuo 2 en ambas secuencias (tabla 10).

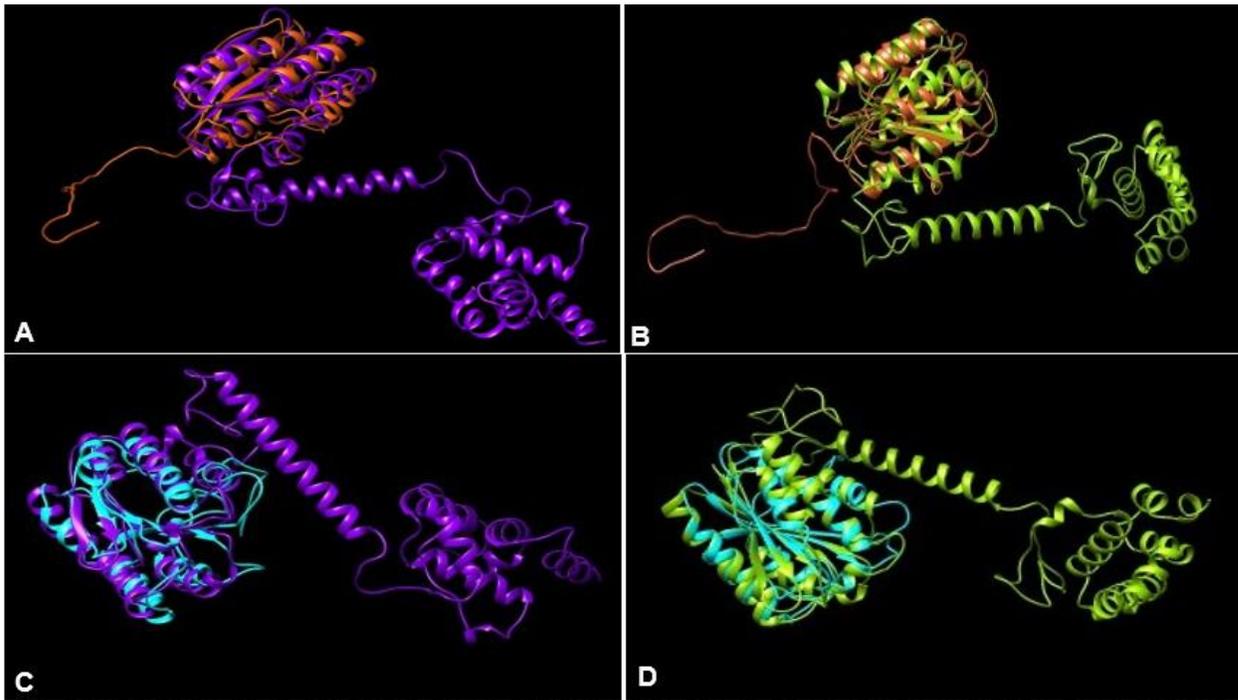
Tabla 10. Modificaciones postraduccionales encontradas en las subunidades ATPasas de la partícula regulatoria 19S de *N. fowleri* y *N. gruberi*

Subunidad	Modificación	Número (posición)	
		<i>N. fowleri</i>	<i>N. gruberi</i>
Rpt2	Ubiquitinación	387	249
	Acetilación	23, 24, 27, 28, 29,30, 31, 33, 34, 35, 47, 51	19, 20,23, 26, 27, 28, 29, 30, 32, 34, 46, 49, 50
	Miristoilación	2	2
	Fosforilación	6, 40, 42, 102, 311	6, 101, 310
Rpt3	Ubiquitinación	229	195
	Acetilación	8, 9, 10	21, 387, 397
	Fosforilación	119	143
	Sumoilación	40, 47	40, 47
Rpt5	Ubiquitinación	1, 150, 258, 270, 458	6, 114, 222, 234, 421
	Acetilación	1, 80, 103, 108, 145	6, 7, 10, 12
	Fosforilación	91, 92, 134, 135	56, 98, 99

Con base en los resultados mostrados, se puede sugerir que las subunidades de la partícula regulatoria en *N. fowleri* y *N. gruberi* presentan sitios susceptibles para las modificaciones postraduccionales previamente descritas en los organismos modelo *H. sapiens* y *S. cerevisiae*. Asimismo, algunos de estos sitios se encuentran conservados entre ambas amibas, recalcando la importancia de las MPT en el funcionamiento del proteosoma 19S.

### Modelamiento tridimensional de las subunidades no ATPasas y ATPasas putativas del proteosoma 19s en amibas del género *Naegleria*

El modelamiento y alineamiento tridimensional se realizó para obtener una aproximación tridimensional, así como la homología a nivel estructural que presentan las secuencias de las subunidades del proteosoma 19S para *N. fowleri* y *N. gruberi* comparadas con la de los organismos modelos. Para el caso de las subunidades no ATPasas, en Rpn10 se obtuvieron identidades del 17% y similitudes del 40% entre *H. sapiens* y ambas especies de *Naegleria*. Para *S. cerevisiae* se obtuvo la identidad de 26% y la similitud del 41% con *N. fowleri*, mientras que para *N. gruberi* se obtuvieron porcentajes de 24 y 38% respectivamente (Fig. 13). La enzima desubiquitinizante Rpn11 mostró porcentajes semejantes entre las especies de amiba y los organismos modelos, siendo sus valores de identidad del 33 - 34% y similitud del 61 - 66% (Fig. 14). Además, el receptor Rpn13 en *H. sapiens* mostró identidad del 18% y similitud del 39% para el caso de *N. fowleri*, mientras que con *N. gruberi* se obtuvieron valores de identidad del 11% y similitud del 34%; por otro lado *S. cerevisiae* obtuvo valores similares para ambas amibas, siendo su identidad del 17-18% y su similitud del 24-25% (Fig. 15).



A. *N. fowleri* (púrpura) comparada con *N. gruberi* (verde). B. *N. fowleri* (púrpura) comparada con *S. cerevisiae* (verde). C. *S. cerevisiae* (azul) comparada con *N. fowleri*. D. *S. cerevisiae* comparada con *N. gruberi*

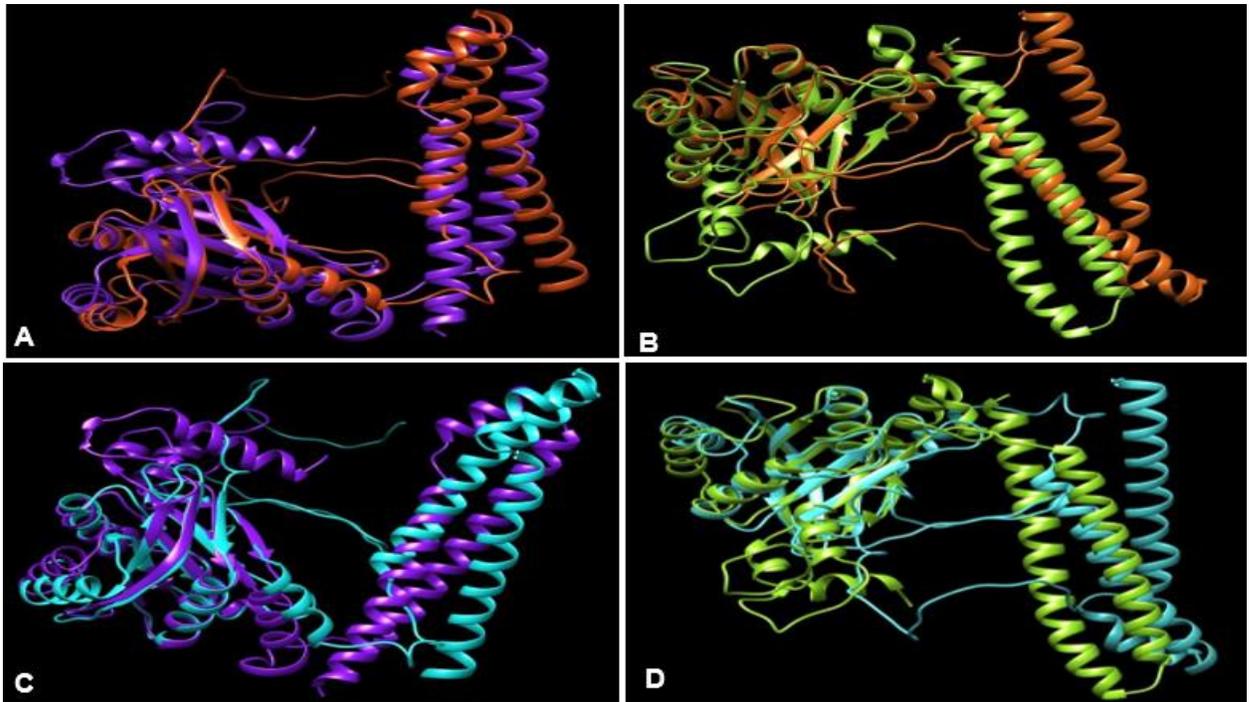


Fig. 14. Alineamiento estructura de la subunidad Rpn11

A. Comparación de la estructura en *H. sapiens* (rojo) con la de *N. fowleri* (morado). B. *H. sapiens* comparada con *N. gruberi* (verde). C. *S. cerevisiae* (azul) comparada con *N. fowleri*. D. *S. cerevisiae* comparada con *N. gruberi*

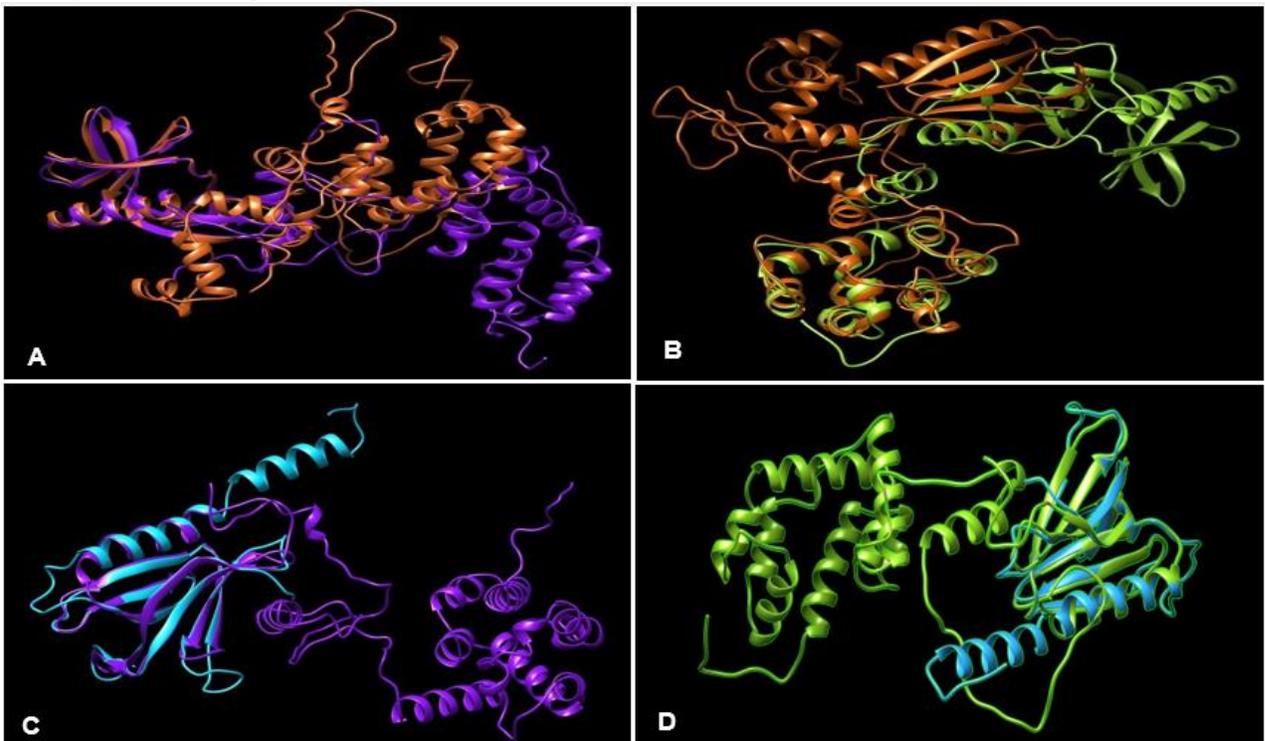


Fig. 15. Alineamiento estructura de la subunidad Rpn13

A. Comparación de la estructura en *H. sapiens* (rojo) con la de *N. fowleri* (morado). B. *H. sapiens* comparada con *N. gruberi* (verde). C. *S. cerevisiae* (azul) comparada con *N. fowleri*. D. *S. cerevisiae* comparada con *N. gruberi*

Las subunidades ATPasas mostraron porcentajes de identidad y de similitud estructural más altos entre las secuencias de amibas y los organismos modelos en comparación con sus contrapartes no ATPasas. Los porcentajes de Rpt2 en *H. sapiens* con ambas amibas son de 38% para identidad y 60-64% en similitud; mientras que para *S. cerevisiae* fueron de 28-33% en identidad y de 54-56% para similitud (Fig. 16). Para Rpt3 comparada con *H. sapiens* y ambas especies de *Naegleria* se obtuvieron valores del 46% para identidad y 68-73% en similitud; además entre *S. cerevisiae* y *N. fowleri* se obtuvo el valor de 36% en identidad y 65% en similitud. Por otro lado, *N. gruberi* mostró un valor de 29% de identidad y de 61% en similitud (Fig. 17). La subunidad Rpt5 presentó valores del 39-41% de identidad y 67-72% de similitud entre *H. sapiens* y las dos amibas, mientras que con *S. cerevisiae* se obtuvieron valores de 36-37% de identidad y 58-67% de similitud respectivamente (Fig. 18).

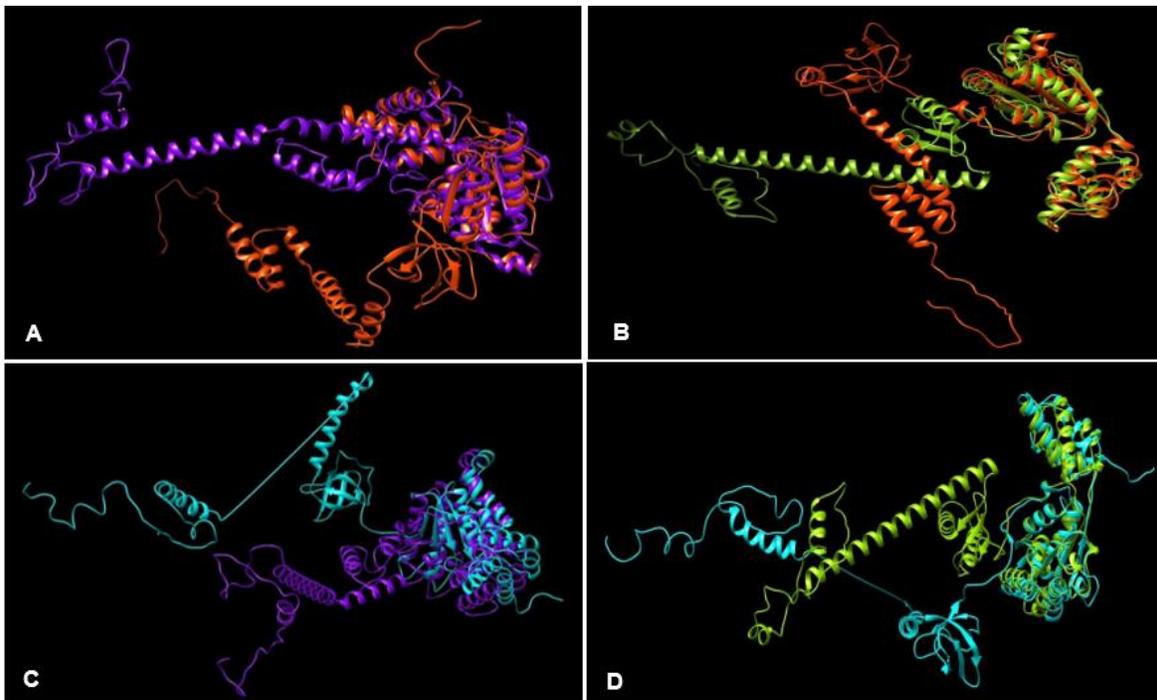


Fig. 16. Alineamiento estructura de la subunidad Rpt2

A. Comparación de la estructura en *H. sapiens* (rojo) con la de *N. fowleri* (morado). B. *H. sapiens* comparada con *N. gruberi* (verde). C. *S. cerevisiae* (azul) comparada con *N. fowleri*. D. *S. cerevisiae* comparada con *N. gruberi*

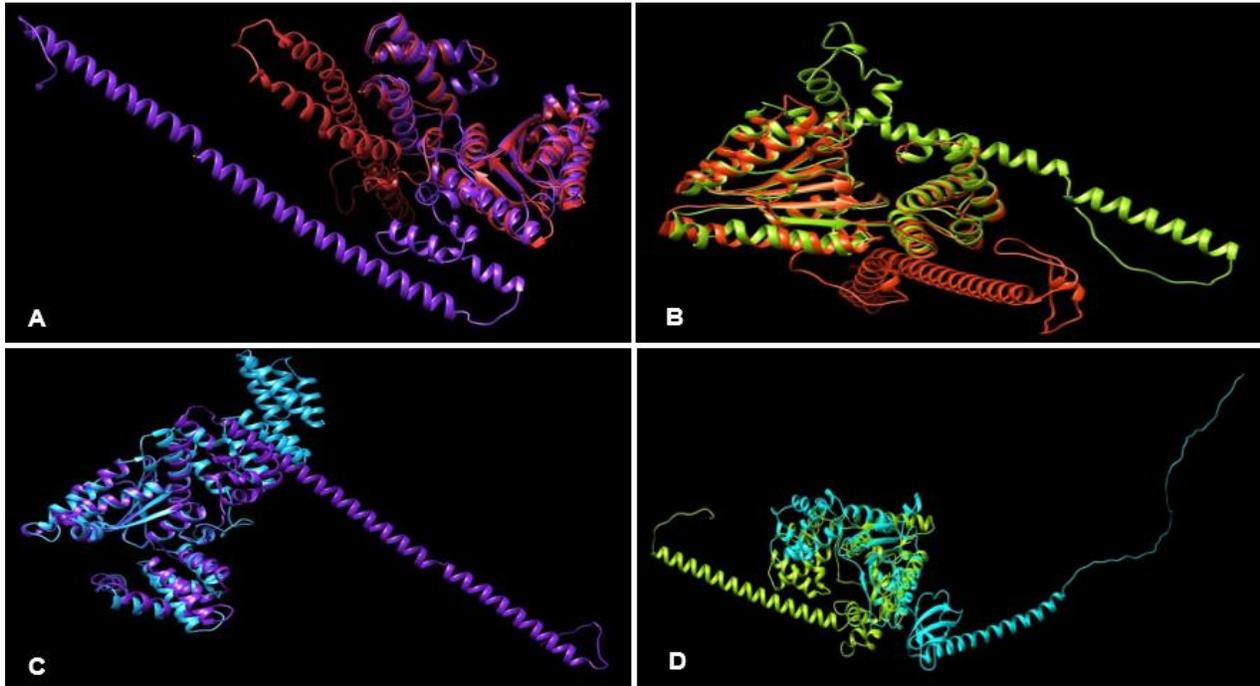


Fig. 17. Alineamiento estructura de la subunidad Rpt3

A. Comparación de la estructura en *H. sapiens* (rojo) con la de *N. fowleri* (morado). B. *H. sapiens* comparada con *N. gruberi* (verde). C. *S. cerevisiae* (azul) comparada con *N. fowleri*. D. *S. cerevisiae* comparada con *N. gruberi*

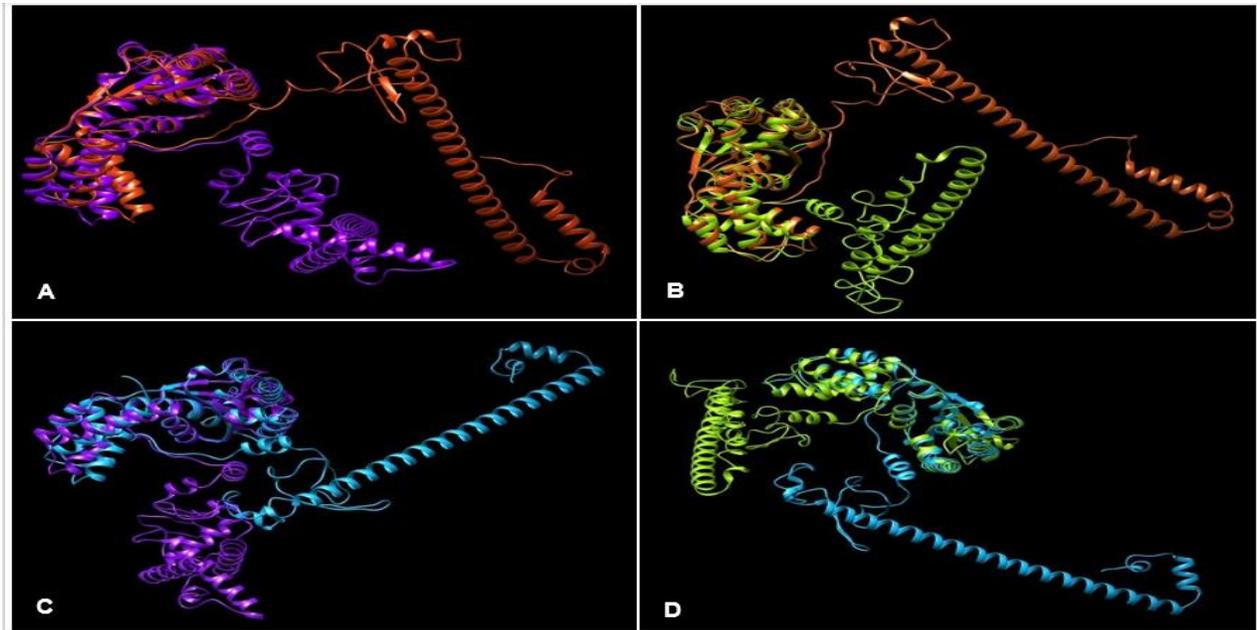


Fig. 18. Alineamiento estructura de la subunidad Rpt5

A. Comparación de la estructura en *H. sapiens* (rojo) con la de *N. fowleri* (morado). B. *H. sapiens* comparada con *N. gruberi* (verde). C. *S. cerevisiae* (azul) comparada con *N. fowleri*. D. *S. cerevisiae* comparada con *N. gruberi*

### **Análisis *in silico* de la proteína ubiquitina putativa de las amibas del género *Naegleria***

La ubiquitina es una proteína pequeña (con un tamaño de 76 aminoácidos y un peso molecular de 8.5 kDa), la cual se encuentra altamente conservada entre los organismos eucariotas. Esta proteína es indispensable para el marcaje de las proteínas sustrato de degradación proteosomal mediante un proceso denominado ubiquitinación. Así, se identificó a través de análisis *in silico*, su presencia a partir de las secuencias putativas recuperadas de las especies *N. fowleri* y *N. gruberi*, así también se determinaron su estructura y motivos esenciales.

En ambas especies de *Naegleria*, siguiendo la metodología descrita previamente, se encontró la secuencia correspondiente a la proteína ubiquitina. El cálculo de porcentajes de similitud e identidad en ambas especies amibianas comparadas con los organismos modelos, fue realizado a partir de análisis de Blast-P. De acuerdo con los resultados obtenidos, tanto *N. fowleri* como *N. gruberi*, muestran una identidad del 96% y una similitud de 98% con la secuencia de *H. sapiens*; mientras que para el caso de *S. cerevisiae*, esta identidad fue del 97% con una similitud del 100% (Tabla 11).

Tabla 11. Porcentajes de identidad y similitud entre la proteína ubiquitina de *N. fowleri* y *N. gruberi* en relación con los organismos modelos

<b>Ubiquitina</b>						
<b>Organismos</b>	<b>% identidad</b>				<b>% similitud</b>	<b>Valor de e</b>
	Clustal W	MAFFT	T-Coffee	NCBI	NCBI	
<b><i>H. sapiens</i> – <i>N. fowleri</i></b>	96.05	96.05	96.05	96	98	3e-54
<b><i>H. sapiens</i> – <i>N. gruberi</i></b>	96.05	96.05	96.05	96	98	3e-54
<b><i>S. cerevisiae</i> – <i>N. fowleri</i></b>	97.37	97.37	97.37	97	100	8e-55

<i>S. cerevisiae</i> – <i>N. gruberi</i>	97.37	97.37	97.37	97	100	8e-55
---	-------	-------	-------	----	-----	-------

El alineamiento por conservación mostró que esta proteína se encuentra altamente conservada entre los organismos analizados, difiriendo solamente por 3 aminoácidos entre *H. sapiens* y ambas amibas, mientras que con *S. cerevisiae* difieren únicamente en 2 residuos (Fig. 19).

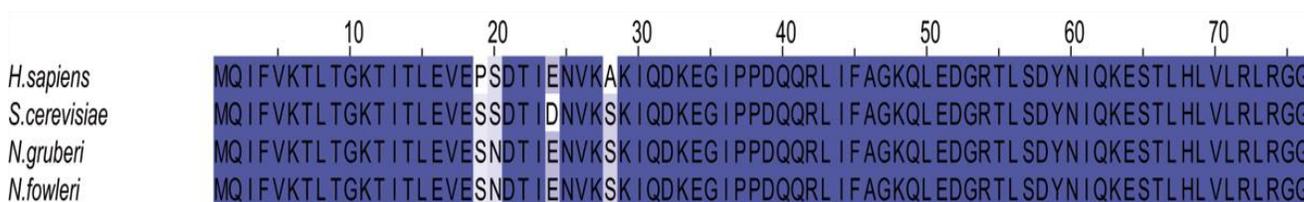


Fig. 19. Alineamiento por conservación de la proteína ubiquitina

Además, en la búsqueda de dominios que presentan las secuencias putativas de ubiquitina se encontró que esta proteína contiene el dominio Ubl (dominio tipo ubiquitina), mostrando valores de *e* cercanos a 0 y de Bit score superiores al 100% en todas las bases de datos consultadas (tabla 12).

Tabla 12. Dominios encontrados en la proteína ubiquitina de *N. fowleri* y *N. gruberi* en relación con los organismos modelos

<b>Ubiquitina</b>				
	<b>NCBI Conserved Domain</b>	<b>InterProt</b>	<b>Pfam</b>	<b>Prosite</b>
	<b>Ubiquitin-like (Ubl) domain</b>	<b>Ubiquitin-like_dom</b>	<b>Ubiquitin</b>	<b>Ubiquitin_2</b>
<b><i>H. sapiens</i></b>	Intervalo: 1-76 Valor de <i>e</i> : 7.34e-56	Intervalo: 1-76	Intervalo: 3-74 Bit score: 118.6 Valor de <i>e</i> : 6.9e-35	Intervalo: 1-76 Score: 31.018

<b><i>S. cerevisiae</i></b>	<b>Ubiquitin-like (Ubl) domain</b> Intervalo: 1-76 Valor de e: 1.73e-54	<b>Ubiquitin- like_dom</b> Intervalo: 1-76	<b>Ubiquitin</b> Intervalo: 3-74 Bit score: 115.9 Valor de e: 4.9e-34	<b>Ubiquitin_2</b> Intervalo: 1-76 Score: 30.539
<b><i>N. fowleri</i></b>	<b>Ubiquitin-like (Ubl) domain</b> Intervalo: 1-76 Valor de e: 1.06e-53	<b>Ubiquitin- like_dom</b> Intervalo: 1-76	<b>Ubiquitin</b> Intervalo: 3-74 Bit score: 115.8 Valor de e: 5.3e-34	<b>Ubiquitin_2</b> Intervalo: 1-76 Score: 30.452
<b><i>N. gruberi</i></b>	<b>Ubiquitin-like (Ubl) domain</b> Intervalo: 1-76 Valor de e: 8.73e-50	<b>Ubiquitin- like_dom</b> Intervalo: 1-76	<b>Ubiquitin</b> Intervalo: 3-74 Bit score: 115.1 Valor de e: 8.6e-34	<b>Ubiquitin_2</b> Intervalo: 1-76 Score: 30.452

La ubiquitina es una proteína altamente conservada, por lo tanto, se realizó la búsqueda de residuos de aminoácidos que se sabe son indispensables en su funcionamiento. De esta manera, se encontró el residuo de metionina (M) N-terminal el cual es el aceptor de la interacción con otros restos de ubiquitina; siete residuos de lisina (K) capaces de formar enlaces isopeptídicos y por lo tanto de cadenas de poli-ubiquitinación, siendo K-48 el residuo más importante para el marcaje de la proteína sustrato de degradación en el proteosoma 26S (Fig. 20. Triangulo azul), la triada de interacción hidrofóbica conformada por L-I-V- (leucina-isoleucina-valina), el motivo di-glicina (G-G) terminal en donde G-76 es esencial para la formación del enlace isopeptídico con la proteína sustrato (Fig. 20. Triangulo rojo), así como el motivo de firma de ubiquitina (Fig. 20. Rectángulo).

*H. sapiens*

M<sup>B</sup>QIFV<sup>K</sup>T<sup>L</sup>TG<sup>K</sup>TITLEVEPSDTIENV<sup>KAKIQDK</sup>EGIPPDQ<sup>R</sup>LIFAG<sup>K</sup>QLED<sup>▲</sup>GRTLSDYNIQ<sup>K</sup>ESTLHL<sup>V</sup>LRLR<sup>GG</sup><sup>▲</sup>

*S. cerevisiae*

M<sup>B</sup>QIFV<sup>K</sup>T<sup>L</sup>TG<sup>K</sup>TITLEVESSDTIDNV<sup>KSKIQDK</sup>EGIPPDQ<sup>R</sup>LIFAG<sup>K</sup>QLED<sup>▲</sup>GRTLSDYNIQ<sup>K</sup>ESTLHL<sup>V</sup>LRLR<sup>GG</sup><sup>▲</sup>

*N. gruberi*

M<sup>B</sup>QIFV<sup>K</sup>T<sup>L</sup>TG<sup>K</sup>TITLEVESNDTIENV<sup>KSKIQDK</sup>EGIPPDQ<sup>R</sup>LIFAG<sup>K</sup>QLED<sup>▲</sup>GRTLSDYNIQ<sup>K</sup>ESTLHL<sup>V</sup>LRLR<sup>GG</sup><sup>▲</sup>

*N. fowleri*

M<sup>B</sup>QIFV<sup>K</sup>T<sup>L</sup>TG<sup>K</sup>TITLEVESNDTIENV<sup>KSKIQDK</sup>EGIPPDQ<sup>R</sup>LIFAG<sup>K</sup>QLED<sup>▲</sup>GRTLSDYNIQ<sup>K</sup>ESTLHL<sup>V</sup>LRLR<sup>GG</sup><sup>▲</sup>

Fig. 20. Residuos de importancia que presentan las secuencias de la ubiquitina en *N. gruberi* y *N. fowleri* comparada con los organismos *H. sapiens* y *S. cerevisiae*,

Los residuos que son resaltados con un color y tamaño diferente son indispensables para el funcionamiento de la ubiquitina

Por otra parte, se realizó el modelamiento tridimensional de la ubiquitina de *Naegleria* spp. Al ser ésta una proteína altamente conservada en su secuencia primaria, se obtuvieron valores de identidad y similitud tanto en *N. fowleri* como *N. gruberi* del 92% de identidad y el 96% de similitud con *H. sapiens*. Mientras que con *S. cerevisiae* comparten un valor de 93% en identidad y 97% de similitud (Fig. 21).

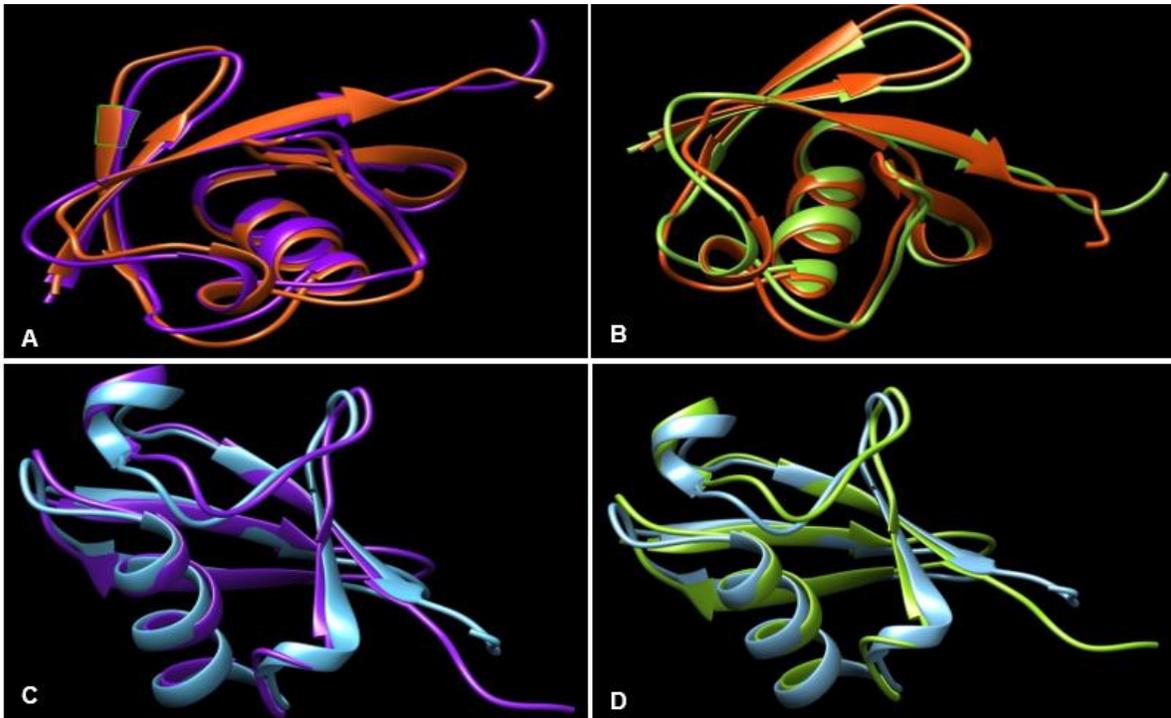


Fig. 21. Alineamiento tridimensional de la proteína ubiquitina

Comparación estructural que presenta la secuencia de la ubiquitina. A. *H. sapiens* (rojo) con *N. fowleri* (morado). B. *H. sapiens* con *N. gruberi* (verde). C. *S. cerevisiae* (azul) con *N. fowleri*. D. *S. cerevisiae* con *N. gruberi*

Al realizar la obtención de la estructura secundaria y la predicción del desorden, se determinó que la secuencias en *N. fowleri* y *N. gruberi* presentan una conformación tipo alfa hélice del 24%, del 36% de conformación tipo Beta plegada y solo un 9% de desorden (el cual indica que esa área de la secuencia no se está relacionando con alguna estructura que se parezca). Además, la confianza (SS confidence) que se muestra en todas las secuencias es elevada, indicando la probabilidad de tener esta estructura secundaria; mientras que el desorden (Disorder confidence) es bajo. (Fig. 22). Asimismo, cuando se realizó el alineamiento y comparación estructural contra otras proteínas en el programa I-tasser, se obtuvo el mismo templado para los cuatro organismos con alta confianza, así como un porcentaje de identidad de 99.9 y 100% respectivamente (Fig. 23).

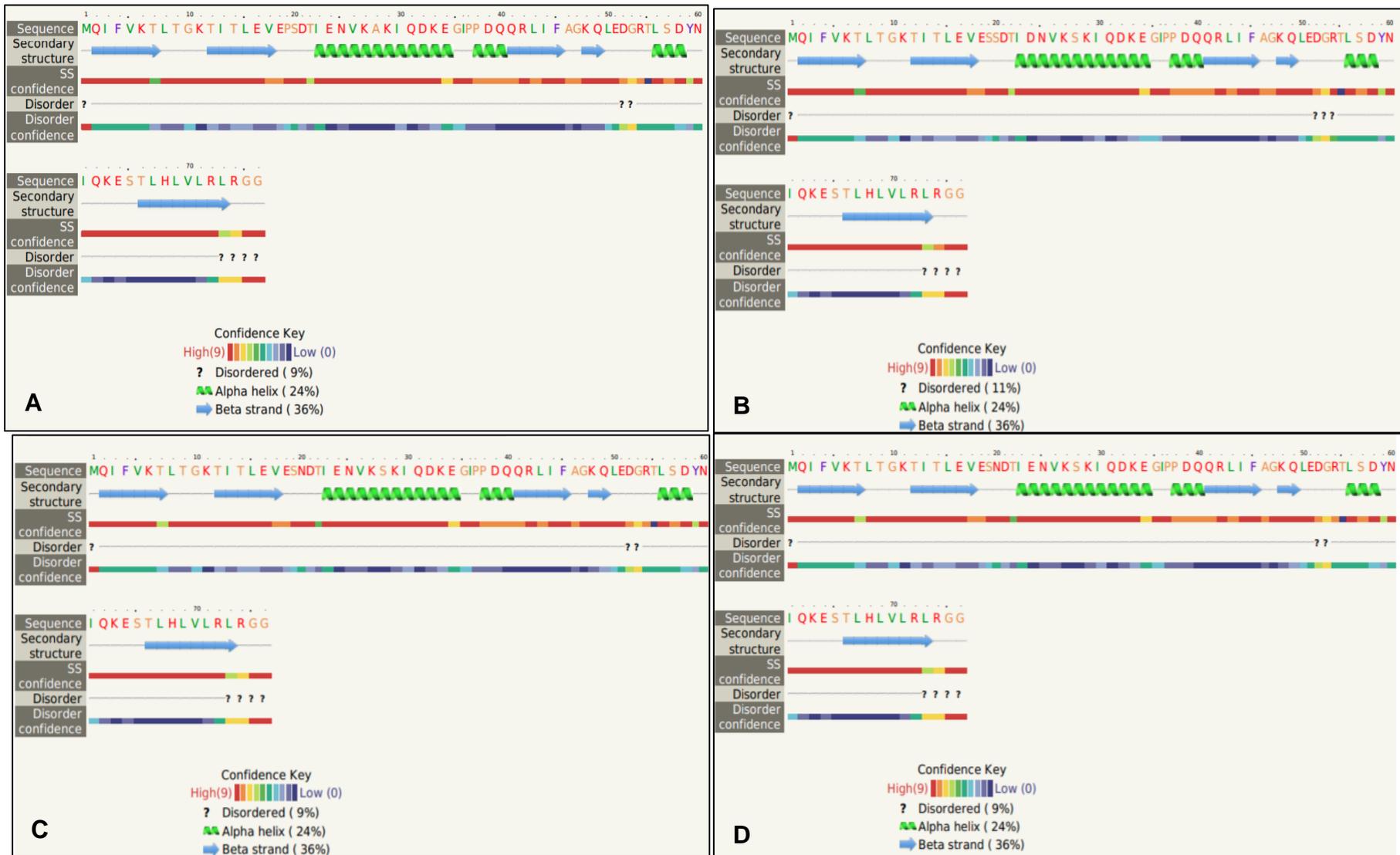


Fig. 22. Estructura secundaria y predicción del desorden de la proteína ubiquitina

*H. sapiens* (A), *S. cerevisiae* (B), *N. fowleri* (C) y *N. gruberi* (D)

La estructura alfa hélice se representa por medio de los espirales verdes, la beta plegada por las flechas en azul. La confianza (SS confidence) está indicada por la línea roja, mientras que el desorden (disorder confidence) por la línea azul-morada.

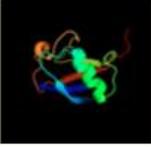
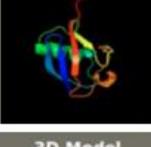
#	Template	Alignment Coverage	3D Model	Confidence	% i.d.	Template Information
A	1 c1yx5B_	Alignment		99.9	100	<b>PDB header:</b> hydrolase <b>Chain:</b> B: <b>PDB Molecule:</b> ubiquitin; <b>PDBTitle:</b> solution structure of s5a uim-1/ubiquitin complex
B	1 c1yx5B_	Alignment		99.9	96	<b>PDB header:</b> hydrolase <b>Chain:</b> B: <b>PDB Molecule:</b> ubiquitin; <b>PDBTitle:</b> solution structure of s5a uim-1/ubiquitin complex
C	1 c1yx5B_	Alignment		99.8	96	<b>PDB header:</b> hydrolase <b>Chain:</b> B: <b>PDB Molecule:</b> ubiquitin; <b>PDBTitle:</b> solution structure of s5a uim-1/ubiquitin complex
D	1 c1yx5B_	Alignment		99.8	96	<b>PDB header:</b> hydrolase <b>Chain:</b> B: <b>PDB Molecule:</b> ubiquitin; <b>PDBTitle:</b> solution structure of s5a uim-1/ubiquitin complex

Fig. 23. Templados para la estructura secundaria y predicción del desorden de la proteína ubiquitina

*H. sapiens* (A), *S. cerevisiae* (B), *N. fowleri* (C) y *N. gruberi* (D)

## DISCUSIÓN

El proteosoma 26S es el mayor complejo proteolítico multicatalítico de alto peso molecular en las células eucariotas, encargado de degradar selectivamente proteínas intracelulares (citosólicas y nucleares) que han sido marcadas por una cadena de poliubiquitina; además, esta maquinaria también controla diversos procesos celulares esenciales como son el ciclo celular, la replicación del ADN, la transcripción, la transducción de señales y las respuestas al estrés. El proteosoma 26S se encuentra conformado por dos subcomplejos: el proteosoma 20S considerado el núcleo catalítico y de procesamiento, y el proteosoma 19S o partícula regulatoria encargada del reconocimiento y regulación de la entrada de proteínas blanco (DeMartino, 2005; Bard *et al.*, 2018).

El proteosoma 20S o complejos homólogos a este se han identificado en organismos que van desde bacterias del filum Actinomycetes y arqueas hasta eucariotas. Las bacterias codifican una estructura proteolítica hecha de un homododecámero de la proteína ClpQ / HslV asociada con uno o dos hexámeros de la ATPasa ClpY / HslU. Este complejo ClpQ / HslV es considerado el ancestro filogenético del proteosoma 20S (Bochtler *et al.* 1999). Por otra parte, por medio de análisis filogenéticos y bioinformáticos (TBLASTN, BLASTP y PHI-BLAST) se ha mostrado la presencia de la partícula regulatoria 19S del proteosoma. Este análisis mostró que las secuencias de PAN de las arqueas son verdaderos ortólogos de las PSMC/RPT eucariotas al ser homólogos funcionales, además, también se observó la presencia del ortólogo de la subunidad no ATPasa PSMD14/Rpn11 presentando el dominio tipo MPN. Por lo tanto, las arqueas expresan un complejo similar a PA700 compuesto de una estructura simple de base y tapa (Fort *et al.*, 2015).

El proteosoma ha sido caracterizado en diversos géneros de protozoarios, incluso descrito como un posible blanco terapéutico en algunos de importancia médica, por ejemplo, *Giardia spp*, *Leishmania spp* y *Toxoplasma spp* (Emmerlich *et al.*, 1999; Robertson, 1999; Shaw *et al.*, 2000).

El estudio específico de la partícula regulatoria o proteosoma 19S también ha sido realizado en microorganismos protozoarios como es el caso de *T. brucei* y *T. cruzi* o en las amibas *E. histolytica* y *E. invadens* (De Diego *et al.*, 2001; Li *et al.*, 2002; Arya *et al.*, 2012; Bosch y Siderovski, 2013). Para el género *Naegleria* no existe evidencia sobre la presencia del proteosoma 19S, sin embargo, recientemente se describió y caracterizó el proteosoma 20S (Guzmán-Téllez *et al.*, 2020). Por lo tanto, el objetivo de este trabajo fue demostrar la presencia de las subunidades putativas del complejo regulatorio 19S del proteosoma de *N. fowleri* y *N. gruberi* por medio de metodología bioinformática.

Utilizando análisis *in silico* se determinó la presencia tanto en *N. fowleri* como en *N. gruberi*, de seis subunidades de la partícula regulatoria, siendo analizadas tres no ATPasas (Rpn10, Rpn13 y Rpn11) y tres ATPasas (Rpt2, Rpt3 y Rpt5). De acuerdo con los resultados de homología que presentaron estas subunidades, las ATPasas muestran mayor grado de conservación, con base a lo previamente descrito respecto a que la conservación de las subunidades de la partícula regulatoria en eucariotas es extraordinaria. Las subunidades Rpt son las más conservadas, mostrando una identidad del 66-76% entre *S. cerevisiae* y *H. sapiens*. Además, estas ATPasas muestran un valor de identidad entre sí del 40%. Por su parte, las no ATPasas muestran una menor pero significativa identidad de secuencia del 33-47%. De estas subunidades Rpn, únicamente Rpn11 muestra un porcentaje mayor de identidad siendo del 65% entre ambos organismos (Glickman *et al.*, 1999; Glickman and Ciehanover, 2002).

Dos de las subunidades no ATPasas analizadas son conocidos como receptores de poliubiquitina. En *S. cerevisiae* hay descritos cinco receptores de ubiquitina que participan en la degradación de proteínas por parte del proteosoma; dos de estos receptores (Rpn10 y Rpn13) son subunidades reguladoras del proteosoma 26S y tienen a sus ortólogos en eucariotas superiores (Dikic *et al.*, 2009).

Es importante mencionar que en cada subunidad se identificaron los dominios específicos para su funcionamiento adecuado. Para el caso de Rpn10, sus dos dominios UIM son necesarios para unirse a las cadenas de monoubiquitina y

ubiquitina, mientras que los primeros 190 aminoácidos definen a VWA con el cual se ancla estrechamente al proteosoma (Dikic *et al.*, 2009). Las secuencias del receptor Rpn13 analizadas presentaron el dominio PRU, encargado de unir a las cadenas de ubiquitina. De igual forma, *H. sapiens*, *N. gruberi* y *N. fowleri* presentaron el segmento correspondiente al dominio C- terminal que les permite unirse a la enzima desubiquitinizante Uch37. *S. cerevisiae* fue la excepción debido a que su proteína es más corta (156 aminoácidos) (Dikic *et al.*, 2009; Davis *et al.*, 2021). Estos datos confirmaron lo que se ha encontrado en la bibliografía en donde mencionan que Rpn13 en *H. sapiens* presenta dos dominios distintos, el dominio de unión a ubiquitina (PRU) que abarca de los residuos Tyr22-Asn130 y un dominio de unión a Uch37 que incluye los residuos Ser253-Asp407, mientras que la subunidad Rpn13 en *S. cerevisiae* se encuentra truncada y su región N-terminal es solo un 25% idéntica a la de su contraparte de los mamíferos, además carece en su totalidad del dominio de unión a Uch37 y en consecuencia tiene sustituciones de aminoácidos en su dominio PRU (Chen *et al.*, 2010). Los residuos 22-130 forman un pliegue del dominio PH (PRU), además, forma un núcleo hidrofóbico el cual contiene residuos hidrofóbicos conservados; es mediante estos residuos que Rpn13 de *S. cerevisiae* y la de los mamíferos se une a la subunidad Rpn2 (Arg-27, Met-31, Leu-33, Thr-36–Pro-40, Lys-42, Arg-64, Val-85, Gln-87, Cys-88, Ser-90, Arg-92, Val-93, Arg-104, Phe-106, Trp-108, Gln-110, and Pro-112) y a la ubiquitina (Leu-56, Leu-73, Ile-74, Phe-76, y Phe-98) (Schreiner *et al.*, 2008; VanderLinden *et al.*, 2017). En los resultados obtenidos del análisis del dominio PRU se puede observar que sus secuencias en las especies de *Naegleria*, conservan parte de estos aminoácidos necesarios para la interacción con otras proteínas.

De las subunidades de la tapa, solo Rpn11 tiene una función conocida. Esta es una enzima desubiquitinizante, la cual es fundamental en la actividad del proteosoma en levaduras y seres humanos, y que está estrictamente controlada pues solo opera sobre sustratos proteolíticos. Para llevar a cabo su función contiene un dominio MPN, el cual presenta el sitio catalítico (ion Zinc) de Rpn11 (Finley, 2009). Cabe destacar que ambas amibas del género *Naegleria* presentaron este dominio.

Por otra parte, las subunidades ATPasas putativas de *N. fowleri* y *N. gruberi* mostraron la presencia de todos los dominios indispensables para realizar sus funciones adecuadamente. En el proteosoma de levadura, tres de las seis colas de Rpt (Rpt2, Rpt3 y Rpt5) contienen motivos de HbYX reconocibles, y éstas se insertan en “*pockets*” específicos en la holoenzima. Además, las proteínas Rpt cooperan ampliamente entre sí, como generalmente es el caso en los complejos del anillo AAA. La actividad de la ATPasa involucra los dominios AAA grandes y pequeños de cada proteína Rpt. El movimiento de estos dominios sirve principalmente para impulsar la translocación del sustrato, que se cree refleja los contactos entre el sustrato y el dominio AAA en el canal de translocación. Asimismo, el anillo Rpt contiene otros dos tipos importantes de elementos, a saber, los dominios OB y las hélices en espiral (“*coiled coil*”) formadas por heterodimerización de proteínas Rpt vecinas. El puerto de entrada del sustrato está definido por los dominios Rpt OB, que forman un anillo distinto (el anillo N) (Finley *et al.*, 2016).

Por otro lado, las modificaciones postraduccionales son importantes para que las proteínas realicen adecuadamente sus funciones. Las secuencias recuperadas para las subunidades de *N. fowleri* y *N. gruberi* mostraron sitios específicos para diversas MPT que también han sido reportadas en los organismos modelos. Entre las modificaciones de interés reportadas que fueron descritas en este trabajo para las secuencias del género *Naegleria* se encuentra la ubiquitinación; la cual estuvo presente en las seis subunidades analizadas de la partícula regulatoria. En el proteosoma 26S de *S. cerevisiae* se han reportado doce subunidades que son ubiquitinizadas en un total de 19 sitios (Hirano *et al.*, 2016). Además, se ha observado en el receptor Rpn10 de la levadura que este puede estar monoubiquitinado y poliubiquitinado mostrando funciones diferentes; mientras que su monoubiquitinación reduce su capacidad para interactuar con sustratos, inhibiendo consecuentemente la actividad del proteosoma, la poliubiquitinación de este receptor resulta en la degradación de la subunidad (Isasa *et al.* 2010; Kors *et al.*, 2019). Por otro lado, se ha observado que cuando el receptor Rpn13 en células de mamíferos se encuentra poliubiquitinado, reduce la proteólisis mediada por la vía

ubiquitina-proteosoma, ya que inhibe la capacidad de unión de la subunidad con las proteínas sustrato (Besche *et al.* 2014; Kors *et al.*, 2019).

La fosforilación estuvo presente en cinco subunidades analizadas (Rpn10, Rpn13, Rpt2, Rpt3 y Rpt5) mostrando diversos sitios susceptibles. Esta modificación es reversible y se lleva a cabo cuando un grupo fosfato se une a residuos de proteínas de serina, treonina y / o tirosina. Es una de las PTM más frecuentes y mejor estudiadas del proteosoma, siendo ampliamente observada en sus dos complejos (19S y 20S) en diversas especies, desempeñando un papel en la regulación de la estabilidad, el ensamblaje y actividad enzimática (Kikuchi *et al.*, 2010; Hirano *et al.*, 2016; Tsimokha *et al.*, 2020). En el caso de la levadura, de las 35 subunidades del proteosoma 26S, 31 se encuentran fosforiladas, en donde el número de sitios fosforilados es de 115 (Hirano *et al.*, 2016). La fosforilación de Rpt3 conduce a un aumento de la translocación del sustrato en el proteosoma y la degradación posterior del mismo, lo que desempeña un papel importante en la proliferación celular. En contraste, la fosforilación de la subunidad Rpt5 reduce la actividad del proteosoma teniendo así un papel en la apoptosis (Kors *et al.*, 2019). Otra PTM analizada fue la acetilación, que consiste en la sustitución de un grupo acetilo (–CH<sub>3</sub>CO) por un átomo de hidrógeno activo, y es una modificación importante de proteínas en diversos procesos celulares. (Kors *et al.*, 2019). *N. fowleri* y *N. gruberi* presentaron diversos sitios de acetilación en cuatro subunidades (Rpn13, Rpt2, Rpt3 y Rpt5). En *S. cerevisiae* se ha observado que 30 de las 35 subunidades del proteosoma se encuentran Nε-acetiladas con total de 147 residuos de lisina acetilada, esta modificación está asociada con la estabilidad de las proteínas y la actividad enzimática. Sin embargo, queda por identificar su papel en el proteosoma 26S (Hirano *et al.*, 2016). Por otro lado, en células humanas y de ratón, la acetilación de varias subunidades del proteosoma se correlaciona con un aumento en su actividad (Tsimokha *et al.*, 2020).

Por su parte, la sumoilación fue encontrada únicamente en dos subunidades (Rpn11 y Rpt3) en la partícula reguladora de las amibas del género *Naegleria*. Esta modificación consiste en la unión covalente del pequeño modificador relacionado

con la ubiquitina (SUMO), una proteína similar a la ubiquitina. Se encuentra implicada en la traducción, la estabilidad de las proteínas y el transporte. En las subunidades del proteosoma 26S de la levadura se ha encontrado que cuatro se encuentran sumoiladas (Hirano *et al.*, 2016). Finalmente, la N-miristoilación es el enlace irreversible del ácido mirístico, un ácido graso saturado de 14 carbonos, a los residuos de glicina N-terminales de las proteínas. Esta modificación está implicada en la localización intracelular o interacción intermolecular de proteínas modificadas (Kimura *et al.*, 2012; Kors *et al.*, 2019). En *N. fowleri* y *N. gruberi* fue encontrada solamente en la subunidad Rpt2 sobre el aminoácido glicina en el sitio 2. De igual forma la N-miristoilación de Rpt2 en el residuo Gly2 también se ha identificado en humanos, ratones, arroz y levadura. El residuo de glicina se conserva ampliamente en muchos otros eucariotas, lo que indica la importancia general de esta modificación (Kimura *et al.*, 2012).

Las subunidades no ATPasas y ATPasas putativas de ambas amibas del género *Naegleria* también fueron analizadas estructuralmente, de manera tal que éstas mostraron valores de homología a este nivel con relación a los organismos modelos. El porcentaje obtenido a partir de las proteínas de *Naegleria* spp nos indica que los plegamientos en las estructuras tridimensionales que son indispensables para las subunidades realicen sus funciones adecuadas dentro del proteosoma se encuentran conservados. Las Rpts utilizan “*loops*” conservados que se proyectan desde sus dominios AAA hacia el poro central para así poder acoplar sustratos proteicos, aplicar fuerza de tracción mecánica para desplegarse y posteriormente trasladar el polipéptido al proteosoma 20S. Para el caso de la no ATPasa Rpn11, por medio de su dominio MPN forma interacciones con Rpn9 y Rpn5 para unir la tapa, posteriormente la tapa se une a la subunidad  $\alpha$ 1 del núcleo 20S y Rpn11 es liberado para unirse a Rpn2. Además, las subunidades del proteosoma 19S recurren a cambios conformacionales para mejorar sus funciones tales como: obtener mayor accesibilidad al sitio activo, translocación de los sustratos, o incluso para bloquear la función de proteosoma (Finley *et al.*, 2016; Bard *et al.*, 2018; Lander *et al.*, 2012).

Por otra parte, el análisis de la ubiquitina mostró que es una de las proteínas mayormente conservadas entre los eucariotas. Así, se obtuvieron porcentajes de identidad y similitud superiores al 90% tanto de la secuencia primaria como a nivel estructural en *N. fowleri* y *N. gruberi*; confirmando lo publicado en la bibliografía, donde mencionan que la secuencia de aminoácidos se encuentra absolutamente conservada y sus diferencias entre animales, plantas y hongos es de 2 o 3 residuos; homología que se mantiene en la estructura tridimensional de la ubiquitina siendo prácticamente idéntica en todos los organismos (Callis, 2014). Respecto a la búsqueda de dominios, se encontró que la ubiquitina presenta el dominio Ubl (dominio tipo ubiquitina), además de un pliegue globular compacto, característico de una familia más grande de dominios Ubl, que está formado por una hoja beta de 5 hebras, una hélice corta, y una hélice alfa de 3.5 vueltas (Randles y Walters, 2018). Esta proteína al estar altamente conservada presenta residuos específicos para su funcionamiento los cuales también fueron encontrados en las secuencias de las especies de *Naegleria*.

La ubiquitina contiene siete residuos de lisina que pueden ser usados como aceptores para la unión de otras moléculas de esta misma proteína, permitiendo así la formación de diferentes tipos de cadenas; sin embargo, la formación de cadenas más estudiada es la de cuatro o más residuos de ubiquitina unidos a K-48; ampliamente descrita como el marcaje a las proteínas para su degradación vía el proteosoma 26S (Woelk *et al.*, 2007). El aminoácido metionina (M) ubicado en la posición uno del extremo N-terminal también funge como aceptor para otra molécula de ubiquitina (Randles y Walters, 2018). Otra región de interés es la que se encuentra conformada por Ile44- Leu8- Val70 conocida como triada hidrofóbica, la cual interactúa con el proteosoma y otras proteínas de unión a ubiquitina (Callis, 2014). La forma madura de la proteína termina con una secuencia di-glicina (G-G), la cual es usualmente expuesta solo después del procesamiento proteolítico. Este segmento es importante ya que aquí ocurre la unión de la ubiquitina por medio de un enlace isopeptídico entre G-76 y residuos de lisina de la proteína sustrato (Neutzner y Neutzner, 2012).

## CONCLUSIÓN

El proteosoma 19S se encuentra conformado de manera típica en las amibas del género *Naegleria* (*N. fowleri* y *N. gruberi*) por subunidades putativas homólogas a las no ATPasas (Rpn) (30-50%) y ATPasas (Rpt) (60-80%) previamente descritas en otros organismos. Las secuencias de estas amibas cuentan con los motivos, dominios y modificaciones postraduccionales específicos de cada subunidad y que resultan indispensables para el funcionamiento del complejo. Asimismo, estas amibas presentan a la proteína ubiquitina, la cual se encuentra altamente conservada (98-99%) y mostrando las características propias que le permiten su actividad como marcadora de procesamiento proteosomal, sugiriendo así la presencia de un sistema completo de degradación ubiquitina-proteosoma en estas amibas de vida libre.

## PERSPECTIVAS

- Localizar subcelularmente al proteosoma 19S en trofozoítos de *N. fowleri* y *N. gruberi*.
- Confirmar experimentalmente la presencia de la proteína ubiquitina en amibas del género *Naegleria*.
- Establecer la interacción *in vitro* de la partícula reguladora 19S con el centro catalítico 20S, para conformar el proteosoma 26S de *Naegleria* spp.
- Establecer la participación del proteosoma 19S en los mecanismos de patogenicidad de los trofozoítos de *N. fowleri*.

## BIBLIOGRAFÍA

Aldape, K., Huizinga, H., Bouvier, J., McKerrow, J. (1994). *Naegleria fowleri*: characterization of a secreted histolytic cysteine protease. *Experimental parasitology*, 78: 230-241.

Amin, M. N. (2004). Proteinases in *Naegleria fowleri* (strain NF3), a pathogenic amoeba: a preliminary study. *Tropical Biomedicine*, 21: 57-60.

Arya, S., Sharma, G., Gupta, P., Tiwari, S. (2012). *In silico* analysis of ubiquitin/ubiquitin-like modifiers and their conjugating enzymes in *Entamoeba* species. *Parasitology research*, 111: 37-51.

Aufderheide, A., Unverdorben, P., Baumeister, W., Förster, F. (2015). Structural disorder and its role in proteasomal degradation. *FEBS letters*, 589: 2552-2560.

Baig, A. M., Khan, N. A. (2015). Tackling infection owing to brain-eating amoeba. *Acta tropica*, 142: 86-88.

Bard, J. A., Goodall, E. A., Greene, E. R., Jonsson, E., Dong, K. C., Martin, A. (2018). Structure and function of the 26S proteasome. *Annual review of biochemistry*, 87: 697-724.

Behets, J., Seghi, F., Declerck, P., Verelst, L., Duvivier, L., Van Damme, A., Ollevier, F. (2003). Detection of *Naegleria* spp. and *Naegleria fowleri*: a comparison of flagellation tests, ELISA and PCR. *Water Science and Technology*, 47: 117–122.

Besche, H. C., Peth, A., Goldberg, A. L. (2009). Getting to first base in proteasome assembly. *Cell*, 138: 25-28.

Besche, H.C., Sha, Z., Kukushkin, N.V., Peth, A., Hock, E.M., Kim, W., Gygi, S., Gutierrez, J.A., Liao, H., Dick, L., Goldberg, A.L. (2014). Autoubiquitination of the 26S proteasome on Rpn13 regulates breakdown of ubiquitin conjugates, *The EMBO Journal*, 33: 1159–1176.

Bibo-Verdugo, B., Jiang, Z., Caffrey, C. R., O'Donoghue, A. J. (2017). Targeting proteasomes in infectious organisms to combat disease. *The FEBS journal*, 284: 1503-1517.

Bochtler, M., Ditzel, L., Groll, M., Hartmann, C., Huber, R. (1999). The proteasome. *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure*, 28: 295-317.

Bohn, S., Förster, F. (2013). The 26S Proteasome. *Handbook of Proteolytic Enzymes*, 1: 3691-3700.

Bosch, D. E., Siderovski, D. P. (2013). Structural determinants of ubiquitin conjugation in *Entamoeba histolytica*. *Journal of Biological Chemistry*, 288: 2290-2302.

Budenholzer, L., Cheng, C. L., Li, Y., Hochstrasser, M. (2017). Proteasome structure and assembly. *Journal of molecular biology*, 429: 3500-3524.

Callis, J. (2014). The ubiquitination machinery of the ubiquitin system. *The Arabidopsis book/American Society of Plant Biologists*, 12: 1-35

Cárdenas-Zúñiga, R., Silva-Olivares, A., Villalba-Magdaleno, J. D. A., Sánchez-Monroy, V., Serrano-Luna, J. J., Shibayama, M. (2017). Amphotericin B induces apoptosis-like programmed cell death in *Naegleria fowleri* and *Naegleria gruberi*. *Microbiology*, 163: 940-949.

Carrasco-Yépez, M., Campos-Rodríguez, R., Godínez-Victoria, M., Rodríguez-Monroy, M. A., Jarillo-Luna, A., Bonilla-Lemus, P., Contis-Montes A., Rojas-Hernández, S. (2013). *Naegleria fowleri* glycoconjugates with residues of  $\alpha$ -D-mannose are involved in adherence of trophozoites to mouse nasal mucosa. *Parasitology research*, 112: 3615-3625.

Cervantes-Sandoval, I., Serrano-Luna, J.J., García-Latorre, E., Tsutsumi, V., Shibayama, M. (2008a). "Mucins in the host defence against *Naegleria fowleri* and mucinolytic activity as a possible means of evasion." *Microbiology*, 154: 3895-3904.

Cervantes-Sandoval, I., Serrano-Luna, J.J., García-Latorre, E., Tsutsumi, V., Shibayama, M. (2008b). "Characterization of brain inflammation during primary amoebic meningoencephalitis." *Parasitology International*, 57: 307-313.

Cervantes-Sandoval, I., Serrano-Luna, J.J., Meza-Cervantez, P., Arroyo, R., Tsutsumi, V., Shibayama, M. (2009). "*Naegleria fowleri* induces MUC5AC and pro-inflammatory cytokines in human epithelial cells via ROS production and EGFR activation." *Microbiology*, 155: 3739-3747.

Cervantes-Sandoval, I., Serrano-Luna, J. J., Pacheco-Yépez, J., Silva-Olivares, A., Tsutsumi, V., Shibayama, M. (2010). Differences between *Naegleria fowleri* and *Naegleria gruberi* in expression of mannose and fucose glycoconjugates. *Parasitology research*, 106: 695-701.

Chalmers, R. M. (2014). *Naegleria*. *Microbiology of Waterborne Diseases*, Chapter 20: 407-416.

Chávez-Munguía, B., Omaña-Molina, M., Castañón, G., Bonilla, P., González-Lázaro, M., Hernández-Martínez, D. Salazar-Villatoro, L., Esparza-García, A., Martínez-Palomo, A., Ortega-Pierres, G. (2009). Ultrastructural study of the encystation and excystation processes in *Naegleria* sp. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 56: 66-72.

Chávez-Munguía B, Segovia-Gamboa, N., Salazar-Villatoro, L., Omaña-Molina, M., Espinosa-Cantellano, M., Martínez-Palomo, A. (2011). *Naegleria fowleri*: enolase is expressed during cyst differentiation. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 58: 463–468.

Chávez-Munguía, B., Villatoro, L. S., Omaña-Molina, M., Rodríguez-Monroy, M. A., Segovia-Gamboa, N., Martínez-Palomo, A. (2014). "*Naegleria fowleri*: contact-dependent secretion of electrondense granules (EDG)." *Experimental Parasitology*, 142: 1-6.

Chen, X., Lee, B. H., Finley, D., Walters, K. J. (2010). Structure of proteasome ubiquitin receptor hRpn13 and its activation by the scaffolding protein hRpn2. *Molecular cell*, 38: 404-415.

Chu, D. M., Ferguson T. J., Marciano-Cabral, F. (2000). "Protein kinase activation and protein phosphorylation in *Naegleria fowleri* amoebae in response to normal human serum." *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 47: 40-47.

Ciechanover, A. (1994). The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway. *Cell*, 79: 13-21.

Collins, G. A., Goldberg, A. L. (2017). The logic of the 26S proteasome. *Cell*, 169: 792-806.

Coronado-Velázquez, D., Betanzos, A., Serrano-Luna, J. J., Shibayama, M. (2018). An In Vitro Model of the Blood–Brain Barrier: *Naegleria fowleri* affects the Tight Junction Proteins and Activates the Microvascular Endothelial Cells. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 65: 804-819.

da Fonseca, P. C., He, J., Morris, E. P. (2012). Molecular model of the human 26S proteasome. *Molecular cell*, 46: 54-66.

da Rocha-Azevedo, B., Tanowitz, H. B., Marciano-Cabral, F. (2009). "Diagnosis of infections caused by pathogenic free-living amoebae." *Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases*, 2009: 1-14

Davis, C., Spaller, B. L., Matouschek, A. (2021). Mechanisms of substrate recognition by the 26S proteasome. *Current Opinion in Structural Biology*, 67: 161-169.

Debnath, A., Tunac, J. B., Galindo-Gómez, S., Silva-Olivares, A., Shibayama, M., McKerrow, J. H. (2012). "Corifungin, a new drug lead against *Naegleria*, identified

from a high-throughput screen." *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 56: 5450-5457.

de Diego, J. L., Katz, J. M., Marshall, P., Gutiérrez, B., Manning, J. E., Nussenzweig, V., González, J. (2001). The Ubiquitin- Proteasome Pathway Plays an Essential Role in Proteolysis during *Trypanosoma cruzi* Remodeling. *Biochemistry*, 40: 1053-1062.

De Jonckheere J. F. (2002). A century of research on the amoeboflagellate genus *Naegleria*. *Acta Protozoologica*, 41: 309-342.

De Jonckheere, J. F. (2011). Origin and evolution of the worldwide distributed pathogenic amoeboflagellate *Naegleria fowleri*. *Infection, Genetics and Evolution*, 11: 1520-1528.

De Jonckheere, J. F. (2014). What do we know by now about the genus *Naegleria*? *Experimental parasitology*, 145: 2-9.

DeMartino, G. N. (2005). Purification of PA700, the 19S regulatory complex of the 26S proteasome. *Methods in enzymology*, 398: 295-306.

Dikic, I., Wakatsuki, S., Walters, K. J. (2009). Ubiquitin-binding domains—from structures to functions. *Nature reviews Molecular cell biology*, 10: 659-671.

Dunnebacke, T. H., Walen, K. H. (1999). "A protein from *Naegleria amoebae* causes apoptosis in chick embryo and CHO cells after they become confluent." *In Vitro Cellular & Developmental Biology*, 35: 252-261.

Emmerlich, V., Santarius, U., Bakker-Grunwald, T., Scholze, H. (1999). Isolation and subunit composition of the 20S proteasome of *Giardia lamblia*. *Molecular and biochemical parasitology*, 100: 131-134.

Ferrante, A. (1991). Free-living amoebae: pathogenicity and immunity. *Parasite immunology*, 13: 31-47.

- Ferrante, A., Bates, E. J. (1988). Elastase in the pathogenic free-living amoebae *Naegleria* and *Acanthamoeba* spp. *Infection and Immunity*, 56: 3320-3321.
- Ferrante, A., Thong, Y. H. (1979). Antibody induced capping and endocytosis of surface antigens in *Naegleria fowleri*. *International Journal for Parasitology*, 9: 599-601.
- Finley, D. (2009). Recognition and processing of ubiquitin-protein conjugates by the proteasome. *Annual review of biochemistry*, 78: 477-513.
- Finley, D., Chau, V. (1991). Ubiquitination. *Annual review of cell biology*, 7: 25-69.
- Finley, D., Chen, X., Walters, K. J. (2016). Gates, channels, and switches: elements of the proteasome machine. *Trends in biochemical sciences*, 41: 77-93.
- Fort, P., Kajava, A. V., Delsuc, F., Coux, O. (2015). Evolution of proteasome regulators in eukaryotes. *Genome biology and evolution*, 7: 1363-1379.
- Fouque, E., Trouilhe, M. C., Thomas, V., Hartemann, P., Rodier, M. H., Hechard, Y. (2012). "Cellular, biochemical, and molecular changes during encystment of free-living amoebae." *Eukaryot Cell* 11: 382-387
- Fritzinger, A. E., Marciano-Cabral, F. (2004). Modulation of a "CD59-like" Protein in *Naegleria fowleri* Amebae by Bacteria 1. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 51: 522-528.
- Fritzinger, A. E., Toney, D. M., MacLean, R. C., Marciano-Cabral, F. (2006). Identification of a *Naegleria fowleri* membrane protein reactive with anti-human CD59 antibody. *Infection and immunity*, 74: 1189-1195.
- Fritz-Laylin, L. K., Prochnik, S. E., Ginger, M. L., Dacks, J. B., Carpenter, M. L., Field, M. C., Kuo, A., Paredez, A., Chapman, J., Pham, J., Shu, S., Neupane, R., Cipriano, M., Mancuso, J., Tu, H., Salamov, A., Lindquist, E., Shapiro, H., Lucas, S., Grigoriev, I. V., Cande, W. Z., Fulton, C., Rokhsar, D. S., Dawson, S. C. (2010). The genome of *Naegleria gruberi* illuminates early eukaryotic versatility. *Cell*, 140: 631-642.

Fritz-Laylin, L. K., Ginger, M. L., Walsh, C., Dawson, S. C., Fulton, C. (2011). The *Naegleria* genome: a free-living microbial eukaryote lends unique insights into core eukaryotic cell biology. *Research in microbiology*, 162: 607-618.

Gharpure, R., Bliton, J., Goodman, A., Ali, I. K. M., Yoder, J., Cope, J. R. (2020). Epidemiology and Clinical Characteristics of Primary Amebic Meningoencephalitis Caused by *Naegleria fowleri*: A Global Review. *Clinical Infectious Diseases*, 520: 1-9

Gillette, T. G., Huang, W., Russell, S. J., Reed, S. H., Johnston, S. A., Friedberg, E. C. (2001). The 19S complex of the proteasome regulates nucleotide excision repair in yeast. *Genes & development*, 15: 1528-1539.

Glickman, M. H., Rubin, D. M., Fu, H., Larsen, C. N., Coux, O., Wefes, I., Pfeifer, G., Cjeka, Z., Vierstra, R., Baumeister, W., Fried, V., Finley, D. (1999). Functional analysis of the proteasome regulatory particle. *Molecular biology reports*, 26: 21-28.

Glickman, M. H., Ciechanover, A. (2002). The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway: destruction for the sake of construction. *Physiological reviews*, 82: 373–428

González-Robles, A., Cristóbal-Ramos, A. R., González-Lázaro, M., Omaña-Molina, M., Martínez-Palomo, A. (2009). *Naegleria fowleri*: light and electron microscopy study of mitosis. *Experimental parasitology*, 122: 212-217.

Grace, E., Asbill, S., Virga, K. (2015). *Naegleria fowleri*: pathogenesis, diagnosis, and treatment options. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 59: 6677-6681.

Grate, I. (2006). Primary amebic meningoencephalitis: a silent killer. *Canadian Journal of Emergency Medicine*, 8: 365-369.

Gräwert, A. M., Groll, M. (2013). Eukaryotic 20S Proteasome. *Handbook of Proteolytic Enzymes*, 3684–3691.

Groll, M., Bochtler, M., Brandstetter, H., Clausen, T., Huber, R. (2005). Molecular machines for protein degradation. *ChemBioChem*, 6: 222-256.

Guzmán-Télez, P., Martínez-Valencia, D., Silva-Olivares, A., del Ángel, R. M., Serrano-Luna, J. J., Shibayama, M. (2020). *Naegleria fowleri* and *Naegleria gruberi* 20S proteasome: identification and characterization. *European Journal of Cell Biology*, 99: 1-17.

Han, K. L., Lee, H. J., Shin, M. H., Shin, H. J., Im, K. I., Park, S. J. (2004). The involvement of an integrin-like protein and protein kinase C in amoebic adhesion to fibronectin and amoebic cytotoxicity. *Parasitology research*, 94: 53-60.

He, J., Kulkarni, K., da Fonseca, P. C., Krutauz, D., Glickman, M. H., Barford, D., Morris, E. P. (2012). The structure of the 26S proteasome subunit Rpn2 reveals its PC repeat domain as a closed toroid of two concentric  $\alpha$ -helical rings. *Structure*, 20: 513-521.

Heggie, T. W. (2010). "Swimming with death: *Naegleria fowleri* infections in recreational waters." *Travel Medicine and Infectious Disease*, 8: 201-206.

Herbst, R., Ott, C., Jacobs, T., Marti, T., Marciano-Cabral, F., Leippe, M. (2002). Pore-forming polypeptides of the pathogenic protozoon *Naegleria fowleri*. *Journal of Biological Chemistry*, 277: 22353-22360.

Hirano, H., Kimura, Y., Kimura, A. (2016). Biological significance of co- and post-translational modifications of the yeast 26S proteasome. *Journal of proteomics*, 134: 37-46.

Hysmith, R. M., Franson, R. C. (1982). Degradation of human myelin phospholipids by phospholipid-enriched culture media of pathogenic *Naegleria fowleri*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Lipids and Lipid Metabolism*, 712: 698-701.

Isasa, M., Katz, E.J., Kim, W., Yugo, V., Gonzalez, S., Kirkpatrick, D.S., Thomson, T.M., Finley, D., Gygi, S.P., Crosas, B. (2010). Monoubiquitination of RPN10 regulates substrate recruitment to the proteasome, *Molecular Cell: Cell Press*, 38: 733–745.

Jahangeer, M., Mahmood, Z., Munir, N., Waraich, U. E. A., Tahir, I. M., Akram, M., Shah, S. M. A., Zulfqar, A., Zainab, R. (2020). *Naegleria fowleri*: Sources of infection,

pathophysiology, diagnosis, and management; a review. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, 47: 199-212.

John, D. T., Cole, T. B., Marciano-Cabral, F. M. (1984). Sucker-like structures on the pathogenic amoeba *Naegleria fowleri*. *Applied and environmental microbiology*, 47: 12-14.

Kikuchi, J., Iwafune, Y., Akiyama, T., Okayama, A., Nakamura, H., Arakawa, N., Kimura, Y., Hirano, H. (2010). Co-and post-translational modifications of the 26S proteasome in yeast. *Proteomics*, 10: 2769-2779.

Kim, J. H., Jung, S. Y., Lee, Y. J., Song, K. J., Kwon, D., Kim, K., Park, S., Im, K., Shin, H. J. (2008a). Effect of therapeutic chemical agents in vitro and on experimental meningoencephalitis due to *Naegleria fowleri*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 52: 4010-4016.

Kim, J. H., Kim, D., Shin, H. J. (2008b). Contact-independent cell death of human microglial cells due to pathogenic *Naegleria fowleri* trophozoites. *The Korean journal of parasitology*, 46: 217

Kim, J. H., Song, A. R., Sohn, H. J., Lee, J., Yoo, J. K., Kwon, D., Shin, H. J. (2013). IL-1 $\beta$  and IL-6 activate inflammatory responses of astrocytes against *Naegleria fowleri* infection via the modulation of MAPK s and AP-1. *Parasite immunology*, 35: 120-128.

Kimura, A., Kato, Y., Hirano, H. (2012). N-myristoylation of the Rpt2 subunit regulates intracellular localization of the yeast 26S proteasome. *Biochemistry*, 51: 8856-8866.

Kors, S., Geijtenbeek, K., Reits, E., Schipper-Krom, S. (2019). Regulation of proteasome activity by (post-) transcriptional mechanisms. *Frontiers in molecular biosciences*, 6: 1-25

Król-Turmińska, K., Olender, A. (2017). Human infections caused by free-living amoebae. *Annals of agricultural and environmental medicine* , 24: 254-60.

Lander, G. C., Estrin, E., Matyskiela, M. E., Bashore, C., Nogales, E., Martin, A. (2012). Complete subunit architecture of the proteasome regulatory particle. *Nature*, 482: 186-191.

Lasker, K., Förster, F., Bohn, S., Walzthoeni, T., Villa, E., Unverdorben, P., Beck, F., Aebersold, R., Sali, A., Baumeister, W. (2012). Molecular architecture of the 26S proteasome holocomplex determined by an integrative approach. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109: 1380-1387.

Lee, Y. J., Park, C. E., Kim, J. H., Sohn, H. J., Lee, J., Jung, S. Y., Shin, H. J. (2011). *Naegleria fowleri* lysate induces strong cytopathic effects and pro-inflammatory cytokine release in rat microglial cells. *The Korean Journal of Parasitology*, 49: 285-290

Li, Z., Zou, C. B., Yao, Y., Hoyt, M. A., McDonough, S., Mackey, Z. B., Coffino, P., Wang, C. C. (2002). An easily dissociated 26 S proteasome catalyzes an essential ubiquitin-mediated protein degradation pathway in *Trypanosoma brucei*. *Journal of Biological Chemistry*, 277: 15486-15498.

Marciano-Cabral, F. (1988). Biology of *Naegleria* spp. *Microbiological Reviews*, 52: 114-133

Marciano-Cabral, F., John, D. T. (1983). Cytopathogenicity of *Naegleria fowleri* for rat neuroblastoma cell cultures: scanning electron microscopy study. *Infection and immunity*, 40: 1214-1217.

Martínez, A. J., Nelson, E. C., Jones, M. M., Duma, R. J., Rosenblum, W. I. (1971). Experimental *Naegleria* meningoencephalitis in mice. An electron microscope study. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*, 25: 465-475

Martínez-Castillo, M., Cárdenas-Guerra, R. E., Arroyo, R., Debnath, A., Rodríguez, M. A., Sabanero, M., Flores-Sánchez, F., Navarro-García, F., Serrano-Luna, J. J., Shibayama, M. (2017). Nf-GH, a glycosidase secreted by *Naegleria fowleri*, causes mucin degradation: an *in vitro* and *in vivo* study. *Future microbiology*, 12: 781-799.

Martínez-Castillo, M., Cárdenas-Zúñiga, R., Coronado-Velázquez, D., Debnath, A., Serrano-Luna, J. J., Shibayama, M. (2016). *Naegleria fowleri* after 50 years: is it a neglected pathogen? *Journal of medical microbiology*, 65: 1-12

Martínez-Fonts, K., Davis, C., Tomita, T., Elsasser, S., Nager, A. R., Shi, Y., Finley, D., Matouschek, A. (2020). The proteasome 19S cap and its ubiquitin receptors provide a versatile recognition platform for substrates. *Nature communications*, 11: 1-16.

Metzger, M. B., Pruneda, J. N., Klevit, R. E., Weissman, A. M. (2014). RING-type E3 ligases: master manipulators of E2 ubiquitin-conjugating enzymes and ubiquitination. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1843: 47-60.

Muñoz, C., San Francisco, J., Gutiérrez, B., González, J. (2015). Role of the ubiquitin-proteasome systems in the biology and virulence of protozoan parasites. *BioMed research international*, 2015: 5-13.

Nandi, D., Tahiliani, P., Kumar, A., Chandu, D. (2006). The ubiquitin-proteasome system. *Journal of biosciences*, 31: 137-155.

Neutzner, M., Neutzner, A. (2012). Enzymes of ubiquitination and deubiquitination. *Essays in biochemistry*, 52: 37-50.

Oddó, D. (2006). Infecciones por amebas de vida libre.: Comentarios históricos, taxonomía y nomenclatura, protozoología y cuadros anátomo-clínicos. *Revista chilena de infectología*, 23: 200-214.

Oh, Y. H., Jeong, S. R., Kim, J. H., Song, K. J., Kim, K., Park, S., Sohn, S., Shin, H. J. (2005). Cytopathic changes and pro-inflammatory cytokines induced by *Naegleria fowleri* trophozoites in rat microglial cells and protective effects of an anti-Nfa1 antibody. *Parasite immunology*, 27: 453-459.

Paugam, A., Bulteau, A. L., Dupouy-Camet, J., Creuzet, C., Friguet, B. (2003). Characterization and role of protozoan parasite proteasomes. *Trends in parasitology*, 19: 55-59.

- Pickart, C. M. (2001). Mechanisms underlying ubiquitination. *Annual review of biochemistry*, 70: 3-33
- Polla, B. S. (1991). Heat shock proteins in host-parasite interactions. *Immunology today*, 12: 38-41.
- Randles, L., Walters, K. J. (2012). Ubiquitin and its binding domains. *Frontiers in bioscience* (Landmark edition), 17: 2140-2157
- Robertson, C. D. (1999). The *Leishmania mexicana* proteasome. *Molecular and biochemical parasitology*, 103: 49-60.
- Schreiner, P., Chen, X., Husnjak, K., Randles, L., Zhang, N., Elsasser, S., Finñey, D., Dikic, I., Walters, K., Groll, M. (2008). Ubiquitin docking at the proteasome through a novel pleckstrin-homology domain interaction. *Nature*, 453: 548-552.
- Schuster, F. L. (1975). Ultrastructure of cysts of *Naegleria* spp: A comparative study. *The Journal of Protozoology*, 22: 352-359.
- Schuster, F. L., Rechthand, E. (1975). In vitro effects of amphotericin B on growth and ultrastructure of the amoeboflagellates *Naegleria gruberi* and *Naegleria fowleri*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 8: 591-605.
- Schuster, F. L., Visvesvara, G. S. (2004). Free-living amoebae as opportunistic and non-opportunistic pathogens of humans and animals. *International journal for parasitology*, 34: 1001-1027.
- Serrano-Luna, J. J., Cervantes-Sandoval, I., Tsutsumi, V., Shibayama, M. (2007). "A biochemical comparison of proteases from pathogenic *Naegleria fowleri* and non-pathogenic *Naegleria gruberi*." *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 54: 411-417.
- Shaw, M. K., He, C. Y., Roos, D. S., Tilney, L. G. (2000). Proteasome inhibitors block intracellular growth and replication of *Toxoplasma gondii*. *Parasitology*, 121: 35-47.
- Shibayama, M., Martínez-Castillo, M., Silva-Olivares, A., Galindo-Gómez, S., Navarro-García, F., Escobar-Herrera, J., Sabanero, M., Tsutsumi, V., Serrano-Luna,

J. J. (2013). Disruption of MDCK cell tight junctions by the free-living amoeba *Naegleria fowleri*. *Microbiology*, 159: 392-401.

Shibayama, M., Serrano-Luna, J. J., Rojas-Hernández, S., Campos-Rodríguez, R., Tsutsumi, V. (2003). Interaction of secretory immunoglobulin A antibodies with *Naegleria fowleri* trophozoites and collagen type I. *Canadian Journal of Microbiology*, 49: 164-170.

Siddiqui, R., Ali, I. K. M., Cope, J. R., Khan, N. A. (2016). Biology and pathogenesis of *Naegleria fowleri*. *Acta Tropica*, 164: 375-394.

Siddiqui, R., Khan, N. A. (2014). Primary amoebic meningoencephalitis caused by *Naegleria fowleri*: an old enemy presenting new challenges. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 8: 1-8.

Smalle, J., Vierstra, R. D. (2004). The ubiquitin 26S proteasome proteolytic pathway. *Annual Review of Plant Biology*, 55: 555-590.

Sohn, H. J., Kim, J. H., Shin, M. H., Song, K. J., Shin, H. J. (2010). The Nf-actin gene is an important factor for food-cup formation and cytotoxicity of pathogenic *Naegleria fowleri*. *Parasitology research*, 106: 917-924.

Song, K. J., Song, K. H., Kim, J. H., Sohn, H. J., Lee, Y. J., Park, C. E., Shin, H. J. (2008). Heat shock protein 70 of *Naegleria fowleri* is important factor for proliferation and in vitro cytotoxicity. *Parasitology research*, 103: 313-317.

Song, K. J., Song, K. H., Na, B. K., Kim, J. H., Kwon, D., Park, S., Pak, J. H., Im, K. I., Shin, H. J. (2007). Molecular cloning and characterization of a cytosolic heat shock protein 70 from *Naegleria fowleri*. *Parasitology research*, 100: 1083-1089.

Toney, D. M., Marciano-Cabral, F. (1992). "Alterations in protein expression and complement resistance of pathogenic *Naegleria amoebae*." *Infection and Immunity*, 60: 2784-2790.

Trabelsi, H., Dendana, F., Sellami, A., Sellami, H., Cheikhrouhou, F., Neji, S., Makni, F., Ayadi, A. (2012). Pathogenic free-living amoebae: epidemiology and clinical review. *Pathologie Biologie*, 60: 399-405.

Tsimokha, A. S., Artamonova, T. O., Diakonov, E. E., Khodorkovskii, M. A., Tomilin, A. N. (2020). Post-Translational Modifications of Extracellular Proteasome. *Molecules*, 25: 3504.

Udeshi, N. D., Mani, D. R., Eisenhaure, T., Mertins, P., Jaffe, J. D., Clauser, K. R., Hacoen, N., Carr, S. A. (2012). Methods for quantification of *in vivo* changes in protein ubiquitination following proteasome and deubiquitinase inhibition. *Molecular & Cellular Proteomics*, 11: 148-159.

VanderLinden, R. T., Hemmis, C. W., Yao, T., Robinson, H., Hill, C. P. (2017). Structure and energetics of pairwise interactions between proteasome subunits RPN2, RPN13, and ubiquitin clarify a substrate recruitment mechanism. *Journal of Biological Chemistry*, 292: 9493-9504.

Visvesvara, G. S., Moura, H., Schuster, F. L. (2007). Pathogenic and opportunistic free-living amoebae: *Acanthamoeba* spp., *Balamuthia mandrillaris*, *Naegleria fowleri*, and *Sappinia diploidea*. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, 50: 1-26.

Wang, X., Meul, T., Meiners, S. (2020). Exploring the proteasome system: A novel concept of proteasome inhibition and regulation. *Pharmacology & Therapeutics*, 1-18

Wilkinson, K. D. (2000). Ubiquitination and deubiquitination: targeting of proteins for degradation by the proteasome. In *Seminars in cell & developmental biology*, 11: 141-148.

Woelk, T., Sigismund, S., Penengo, L., Polo, S. (2007). The ubiquitination code: a signalling problem. *Cell division*, 2: 1-12.

Young, J. D., Lowrey, D. M. (1989). "Biochemical and functional characterization of a membrane-associated pore-forming protein from the pathogenic ameboflagellate *Naegleria fowleri*." *Journal of Biological Chemistry*, 264: 1077-1083.

Zelada Valdés, A. (2019). Proteasoma, subtipos y sus implicaciones en la tolerancia central. *Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas*, 38: 254-276.

## TABLAS SUPLEMENTARIAS

Tabla suplementaria 1. Dominios encontrados en las subunidades no ATPasas de la partícula reguladora 19S de *H. sapiens* y *S. cerevisiae*

	NCBI Conserved Domain	InterPro	Pfam	Prosite
<b>Rpn10</b>				
<i>H. sapiens</i>	Superfamilia vWAF_A Intervalo: 1-187 Valor de e: 6.35e-119	VWA_A Intervalo: 2-188  UIM_dom Intervalo: 211-301	VWA_2 Intervalo: 6-113 Bit score: 80.2 Valor de e: 1.6e-22  UIM (2) Intervalo: 211-227 / 282-297 Bit score: 12.6 – 21.6 Valor de e: 0.099 – 0.00013	VWFA Intervalo: 5-188 Score: 10.676  UIM (2) Intervalo: 211-230 / 282- 301 Score: 9.216 – 10.034
<i>S. cerevisiae</i>	Superfamilia vWFA Intervalo: 1-236 Valor de e: 4.7e-116	VWF_A Intervalo: 5-190  UIM_dom Intervalo: 223-242	VWA_2 Intervalo: 6-114 Bit score: 69.8 Valor de e: 2.7e-19	VWFA Intervalo: 5-190 Score: 9.443  UIM Intervalo: 223-242 Score: 10.917
<b>Rpn11</b>				
<i>H. sapiens</i>	Superfamilia MPN Intervalo: 21-286 Valor de e: 3.30e-157	JAMM/MPN+_dom Intervalo: 28-165  MPN Intervalo: 31-166  Rpn11/EIF3F_C Intervalo: 173-296	JAB Intervalo: 28-138 Bit score: 111.1 Valor de e: 3.0e-32  MitMem_reg Intervalo: 173-296 Bit score: 58.3 Valor de e: 9.2e-16	MPN Intervalo: 31-166 Score: 37.993
<i>S. cerevisiae</i>	Superfamilia MPN Intervalo: 22-282 Valor de e: 3.10e-135	JAMM/MPN+_dom Intervalo: 24-161  MPN Intervalo: 27-162 Rpn11/EIF3F_C Intervalo: 169-288	JAB Intervalo: 24-133 Bit score: 110.0 Valor de e: 6.5e-32  MitMem_reg Intervalo: 169-288 Bit score: 41.1 Valor de e: 2.0e-10	MPN Intervalo: 27-162 Score: 38.214
<b>Rpn13</b>				
<i>H. sapiens</i>	Superfamilia tipo PH Intervalo: 24-128 Valor de e: 7.43e-76  Superfamilia RPN13_C Intervalo: 274-381 Valor de e: 1.18e-43	Rpn13_C Intervalo: 268-381	Rpn13_C Intervalo: 268-381 Bit score: 118.3 Valor de e: 1.7e-34  Proteasom_Rpn13 Intervalo: 29-111 Bit score: 110.6 Valor de e: 3.9e-32	PRU Intervalo: 18-131 Score: 60.516 DEUBAD Intervalo: 277-391 Score: 24.227
<i>S. cerevisiae</i>	Superfamilia tipo PH Intervalo: 13-103 Valor de e: 2.64e-32	Rpn13/ADRM1_sf Intervalo: 6-101 (Homologo)	Proteasom_Rpn13 Intervalo: 13-103 Bit score: 75.8 Valor de e: 3.0e-21	PRU Intervalo: 2-132 Score: 36.729

Tabla suplementaria 2. Dominios encontrados en las subunidades ATPasas de la partícula regulatoria 19S de *H. sapiens* y *S. cerevisiae*

NCBI Conserved Domain				InterPro	Pfam	Prosite
<b>Rpt2</b>						
<i>H. sapiens</i>	<b>PTZ00361</b> Intervalo: 1-440 Valor de e: 0e-00	<b>ATPasa_AAA_core</b> Intervalo: 222-355 <b>Prot_ATP_ID_OB</b> Intervalo: 109-163 <b>AAA_lid_3</b> Intervalo: 377-421	<b>AAA</b> Intervalo: 222-355 Bit score: 146.0 Valor de e: 8.0e-43 <b>Prot_ATP_ID_OB</b> Intervalo: 109-163 Bit score: 38.2 Valor de e: 1.0e-09 <b>AAA_lid_3</b> Intervalo: 377-421 Bit score: 40.7 Valor de e: 1.5e-10	<b>AAA</b> Intervalo: 325-343		
<i>S. cerevisiae</i>	<b>PTZ00361</b> Intervalo: 1-437 Valor de e: 0e-00	<b>ATPasa_AAA_core</b> Intervalo: 219-351 <b>Prot_ATP_ID_OB</b> Intervalo: 106-160 <b>AAA+ATPasa</b> Intervalo: 215-354 <b>AAA_lid_3</b> Intervalo: 374-417	<b>AAA</b> Intervalo: 219-351 Bit score: 137.1 Valor de e: 4.6e-40 <b>Prot_ATP_ID_OB</b> Intervalo: 106-160 Bit score: 37.8 Valor de e: 1.4e-09 <b>AAA_lid_3</b> Intervalo: 374-417 Bit score: 39.4 Valor de e: 3.8e-10	<b>AAA</b> Intervalo: 322-340		
<b>Rpt3</b>						
<i>H. sapiens</i>	<b>PTZ00454</b> Intervalo: 34-418 Valor de e: 0e+00	<b>Prot_ATP_ID_OB</b> Intervalo: 89-144 <b>ATPasa_AAA_core</b> Intervalo: 202-335 <b>AAA_lid_3</b> Intervalo: 358-401	<b>AAA</b> Intervalo: 202-335 Bit score: 149.5 Valor de e: 6.6e-44 <b>Prot_ATP_ID_OB</b> Intervalo: 89-144 Bit score: 41.3 Valor de e: 1.1e-10 <b>AAA_lid_3</b> Intervalo: 357-401 Bit score: 34.5 Valor de e: 1.3e-08	<b>AAA</b> Intervalo: 305-323		
<i>S. cerevisiae</i>	<b>PTZ00454</b> Intervalo: 46-428 Valor de e: 0e+00	<b>Prot_ATP_ID_OB</b> Intervalo: 96-151 <b>ATPasa_AAA_core</b> Intervalo: 209-341 <b>AAA+ATPasa</b> Intervalo: 205-344	<b>AAA</b> Intervalo: 209-341 Bit score: 155.5 Valor de e: 9.8e-46 <b>Prot_ATP_ID_OB</b> Intervalo: 96-151 Bit score: 32.6 Valor de e: 5.8e-08	<b>AAA</b> Intervalo: 312-330		
<b>Rpt5</b>						

<i>H. sapiens</i>	<b>Superfamilia RPT1</b> Intervalo: 25-432 Valor de e: 0e+00	<b>Prot_ATP_ID_OB</b> Intervalo: 90-165 <b>ATPasa_AAA_core</b> Intervalo: 223-355 <b>AAA+_ATPasa</b> Intervalo: 219-358 <b>AAA_lid_3</b> Intervalo: 378-419	<b>Prot_ATP_ID_OB</b> Intervalo: 90-165 <b>Bit score: 69.8</b> <b>Valor de e: 1.4e-19</b> <b>AAA</b> Intervalo: 223-356 <b>Bit score: 141.9</b> <b>Valor de e: 1.5e-41</b> <b>AAA_lid_3</b> Intervalo: 378-422 <b>Bit score: 39.0</b> <b>Valor de e: 4.9e-10</b>	<b>AAA</b> Intervalo: 326-344
<i>S. cerevisiae</i>	<b>Superfamilia RPT1</b> Intervalo: 5-434 Valor de e: 0e+00	<b>Prot_ATP_ID_OB</b> Intervalo: 79-160 <b>ATPasa_AAA_core</b> Intervalo: 219-351 <b>AAA+_ATPasa</b> Intervalo: 214-353 <b>AAA_lid_3</b> Intervalo: 373-415	<b>Prot_ATP_ID_OB</b> Intervalo: 79-160 <b>Bit score: 68.4</b> <b>Valor de e: 3.8e-19</b> <b>AAA</b> Intervalo: 219-351 <b>Bit score: 142.2</b> <b>Valor de e: 1.2e-41</b> <b>AAA_lid_3</b> Intervalo: 373-417 <b>Bit score: 34.2</b> <b>Valor de e: 1.6e-08</b>	<b>AAA</b> Intervalo: 321-339