

Análisis de la expresión de un elemento retrotransponible poliadenilado en cepas virulentas de *Entamoeba histolytica*

Sánchez Pérez Eva María (1), Franco Bárcenas Bernardo (2)

1 [Lic. Biología Experimental Universidad de Guanajuato. División de Ciencias Naturales] | Dirección de correo electrónico: [evamsp25@gmail.com]

2 [División de Ciencias Naturales y Exactas] | Dirección de correo electrónico: [bfranco@ugto.mx]

Resumen

Entamoeba histolytica es un protozoo parásito que afecta a los humanos. Los mecanismos de virulencia quedan por ser determinados con precisión a nivel molecular. En el presente trabajo se evaluó el procesamiento del transcrito poliadenilado del retrotransposón Hapt2 en cepas de diferente grado de virulencia. Los resultados muestran un transcrito de menor tamaño al esperado en las cepas de baja virulencia (las cepas *G3*, *Rhaman* y *M10*) en comparación con la cepa *HM1: IMSS* que es de alta virulencia. Esto sugiere la presencia de un mecanismo diferencial en el procesamiento de transcritos en cepas de virulencia baja y que probablemente involucre un mecanismo de regulación global. Estos resultados permitirán evaluar el impacto del transcrito de un retrotransposón poliadenilado sobre los transcritos de otros genes.

Abstract

Entamoeba histolytica is a parasitic protozoan that infects humans. Virulence mechanisms remain to be elucidated in depth at a molecular level. In the present work, we analyzed transcript processing of the poliadenilated retrotransposon Hapt2 in strains rendering a differential virulence phenotype. Our results suggest that in strains showing reduced virulence, the Hapt2 transcript is processed into a smaller molecule (strains *G3*, *Rhaman* and *M10*) in comparison with virulent *HM1: IMSS* strain. This suggest the presence of a possible global regulatory mechanism. Our results may allow exploring the impact of this poliadenilated retrotransposon over the transcripts of other genes

Palabras Clave

1; *E.histolyca* 2;retrotransposon 3;transcrito poliadenilado 4; procesamiento de transcritos 5

INTRODUCCIÓN

Entamoeba histolytica es un protozoario anaerobio que invade el intestino grueso de humanos, generalmente por la ingesta de agua y alimentos contaminados con heces fecales que portan quistes de este microorganismo. Su ciclo de vida inicia cuando un humano ingiere un quiste, que es la forma de propagarse fuera del hospedero. Una vez que el quiste llega al intestino grueso, eclosiona liberando al trofozoito que es la forma en la que *E. histolytica* inicia la colonización (Pritt y Clark, 2008; Stanley, 2003).

En México es una causa de gastroenteritis y otras manifestaciones clínicas importantes. La virulencia de *E. histolytica* depende tanto de factores del parásito como del hospedero. Principalmente la destrucción del tejido ocurre debido a la conjunción de la respuesta inflamatoria del hospedero aunado a factores secretados por el parásito. Dentro de los factores de virulencia más reconocidos están la lectina Gal/GalNAc (galactosa/N-acetil-D-galactosamina), cisteín proteasas y el complejo proteico del amebaporo. Estas proteínas participan en la adhesión del parásito a las células blanco, la destrucción de moléculas del sistema inmune y la destrucción de las células blanco, respectivamente (Padilla-Vaca y Anaya-Velázquez, 2010).

Con la secuenciación de los genomas de *E. histolytica* (Loftus et al., 2005), *E. dispar* (Willhoeft et al., 2000) y diversos aislados de *E. histolytica* (Weedall et al., 2012) que presentan diferentes fenotipos de virulencia, se ha logrado entender parte de la organización génica de estos organismos, así como sus diferencias.

Con los avances en la tecnología del DNA recombinante y la capacidad de modificar la expresión de genes en diferentes organismos, algunas herramientas se han logrado implementar en *E. histolytica* para describir la función de genes (Morf y Singh, 2012). Con la secuencia del genoma de este organismo se han logrado hacer microarreglos y experimentos de RNAseq para

determinar los patrones de expresión de varios genes.

Existen algunas herramientas para la modificación genética de estos organismos, las más relevantes son la capacidad de transfectar (de manera transitoria y estable) a este parásito, hacer silenciamiento por RNA de interferencia (iRNA) y RNA antisentido. El grado de éxito de estas estrategias varía mucho de una cepa a otra así como el tipo de método de silenciamiento o modificación que se quiera lograr. La interrupción de genes por recombinación homóloga no se ha logrado ya que *E. histolytica* se caracteriza por ser un organismo que tiene genes repetidos cuya homología entre sí es alta además de ser tetraploide y no todas las copias se encuentran en el mismo cromosoma (Morf y Singh, 2012).

La diversidad genómica se debe a múltiples factores, uno de ellos son los transposones y retrotransposones. Se han identificado cerca de 500 copias del retrotransposón eHapt2 en el genoma de *E. histolytica* y todas tienen la misma estructura y secuencia conservada (identidad del 97%). Es un elemento transcrito y poliadenilado que se ha identificado en los genomas secuenciados de cepas *E. histolytica* pero no de *E. dispar*. Solamente unos cuantos de estos elementos están en regiones donde hay un gen que potencialmente es transcripcionalmente activo y que la orientación del elemento eHapt2 respecto a la transcripción de estos genes es diferente a la observada en la subunidad A del amebaporo.

Por estudios preliminares, sabemos que el elemento eHapt2 afecta la transcripción de otros genes río abajo de éste en cepas de virulencia atenuada (Morf y Singh, 2012) ya sea natural o inducida como se por factores exógenos como se describe en la sección anterior. Por todo lo anterior, es importante estudiar los fragmentos de RNA que posiblemente sean diferentes entre las cepas de virulencia diferencial que se puedan generar a partir del transcrito del elemento eHapt2 así como su posible papel en la regulación de otros genes, impactado posiblemente en la virulencia de este organismo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Realizamos el cultivo de trofozoítos de las diferentes cepas de *E. histolyca* se realizó como se describe previamente (Diamond, 1983). Los trofozoítos fueron cosechados con 250µl buffer tris EDTA (25mM), 150µl buffer de lisis y se extrajo RNA (Sambrook J.Russell DW (ed 2001) Molecular Cloning Laboratory Manual Third Edition Cold Spring Harbor Laboratory, New York.)

De las cinco cepas de *E. histolyca* HM: IMSS, M10, G3, Rhaman, *E. dispar*, la integridad del DNA genómico y del RNA fue confirmada por electroforesis en gel de agarosa (Imagen 2).

Se sintetizo cDNA siguiendo las instrucciones del fabricante (Superscript II. Invitrogen). Las condiciones de reacción se muestran a continuación: 8µl RNA_T

1 µl oligo
2.8 µl agua
*Pasar al termociclador
65°C -> 5min
*Pausar y continuar
Adicionar:

DNTP'S 1 µl
Buffer de reacción 5X 4 µl
DTT 0.1M 2µl
RNase OUT 1 µl
Transcriptasa reversa 1 µl

42°C -> 50min
70°C -> 0.15 seg
Adicionar:

RNase 2 µl
*Pasar al termociclador

37°C -> 20min
4°C -> 15min

El análisis por Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR por sus siglas en inglés) se realizó en las siguientes condiciones:

Como volumen final 20 µl amplificación por PCR del fragmento de interés con los oligos eHapt2 Fw (franqueamiento que delimita del extremo 5' del transcrito) y CompoliA (flanqueamiento del transcrito uniéndose a la cola de poliA delimitando el extremo

3') y combinación de oligo directo y reverso de GAPDH por medio de PCR con cDNA, con la utilización de GoTaq (promega) como polimerasa.

TABLA 1: Descripción de oligos utilizados con su secuencia correspondiente.

| OLIGO | SECUENCIA |
|-----------------|---------------------------------------|
| CompoliA | GGATCCGAGTCTGAATTC |
| RT5PrimaHapt2Fw | GAAGGTGGCACGTCTGAAAC |
| PoliTadpatador | GGATCCGAGTCTGAATTC TTTTTTTTTTTTTTTTTT |
| GAPDH D | ATTA AAAATATGATACCGTCCACAGA |
| GAPDH R | TGAGTAGCAGTAGTAGCATGAATAGTT |

IMAGEN 1: Figura de los amplicones para mapear el transcrito



IMAGEN 2: RNA libre de DNA cepas HM: IMSS, M10, G3, Rhaman E. dispar

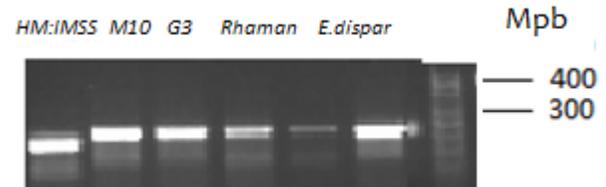
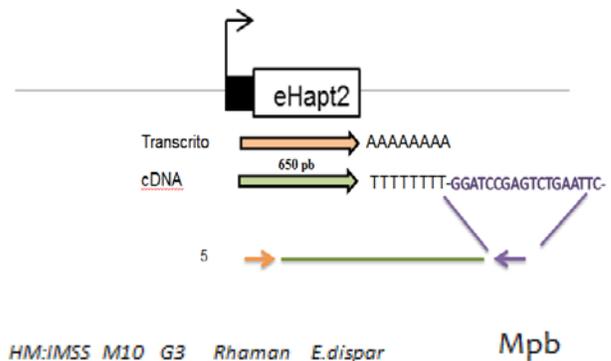


IMAGEN 3: PCR control con la utilización de los oligos directo (GAPDH) y reverso (GAPDH) HM: IMSS, M10, Rhaman E. dispar.

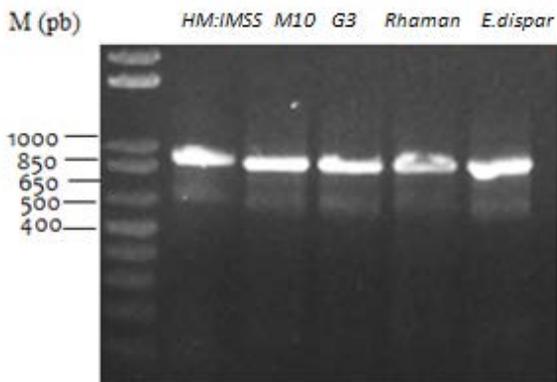


IMAGEN 4: PCR con la utilización de los oligos directo (GAPDH) y compoliA (PoliTadpatador) *HM: IMSS, M10, Rhaman, E.dispar*.

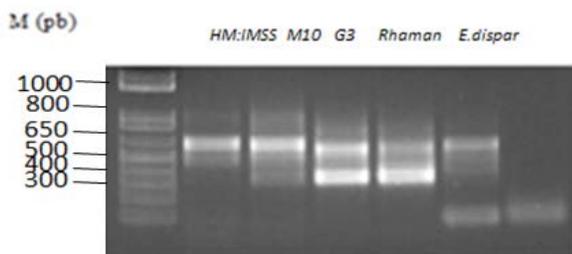


IMAGEN 5: PCR con la utilización de los oligos directo Hapt2 (RT5primaHapt2) y compoliA *HM: IMSS, M10, Rhaman, E.dispar*

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El elemento Hapt2 se sabe que está poliadenilado (Willhoeft U, Buss H, Tannich E. Infect Immun. 2002 Dec; 70(12):6798-804.) y esa es una característica que podemos usar para conocer las características del transcrito: si se procesa y qué tan larga es la cola de poliA.

Para conocer las características, se aisló RNA total para evaluar la transcripción del elemento Hapt2, evaluado mediante RT-PCR, empleando un oligonucleótido compuesto de dos secciones una complementaria a la cola de poliA y otra secuencia constante.

Para evaluar que el RNA estuviera libre de DNA se hizo la amplificación por PCR usando RNA total como molde. Una vez que nos aseguramos que el RNA careciera de DNA, (imagen 2) se sintetizó cDNA como se indica en materiales y métodos. Se

analizó por RT-PCR el transcrito del elemento Hapt2 en las cepas de diferente virulencia.

Posteriormente se evaluó que la síntesis de cDNA haya sido correcta, por lo que se amplificó primero GAPDH con sus oligos (GAPDH D y GAPDH R). Al igual se evaluó que el oligo poliT funcionara, por lo que se hizo el control con el adaptador del oligo PoliTadpatador (imagen 4)

La cepa *HM: IMSS* es la cepa virulenta en la cual se espera una banda de 650 nucleótidos adicional a la cola de poliA en cambio la cepas no virulentas *G3, Rhaman M10 Y E.dispar*, se esperaba que presenten además del transcrito esperado se tiene un fragmento más pequeño de 300 – 350 nucleótidos aproximadamente nucleótidos aproximadamente, la cepa *M10* presenta la banda de 650 nucleótidos al igual que el 300 - 350 nucleótidos aunque esta en más baja proporción.

Retomando que la *M10* es una cepa derivada de la *HM1: IMSS* que fue transformada con un plásmido vacío y que le cambió el fenotipo a no virulenta.

Para confirmar la identidad de los fragmentos diferenciales del transcrito del Hapt2 se clonaron en el vector pGEM T (Promega) para su posterior secuenciación.

CONCLUSIONES

La cepa de virulencia (*HM: IMSS*) diferencial muestran un perfil del transcrito del eHapt2 diferente, las cepas no virulentas (*M10, G3 Rhaman, E.dispar*) tienen un transcrito procesado de menor tamaño no muy abundante, en cambio a la cepa virulenta (*HM: IMSS*) no muestra este transcrito del mismo tamaño, por lo cual se puede llevar a un cambio significativo en el fondo genético, el cual pudo haber pasado en el ciclo de su vida, o alguna adaptación ante una presión natural. La cepa *HM: IMSS* es un derivado de esta cepa la cual perdió su capacidad de virulencia por lo que no presenta el procesado tan notable, esto puede deberse a que aún presenta o contiene la maquinaria necesaria para ser virulenta pero no expresada.

El siguiente paso es analizar la secuencia de los transcritos más pequeños mediante secuenciación y analizar la estructura genómica de las cepas de virulencia diferencial por huella génica.

AGRADECIMIENTOS

Felipe Padilla, Ángeles Serrano, Jazmín Delgado y al proyecto de CONACyT (CB-2012-01 182671)

REFERENCIAS

1. - Ali IK, Clark CG, Petri WA Jr. Molecular epidemiology of amebiasis (2008) *Infect. Genet. Evol.* 8, 698–707.
2. - Padilla-Vaca F, Anaya-Velázquez F. Insights into *Entamoeba histolytica* virulence modulation (2010) *Infect Disord Drug Targets.* 10(4):242-50.
3. - Mirelman, D. Ameba–bacterial relationship in amebiasis (1988) In: Ravdin, J.I. (Ed.), *Amebiasis: Human Infection by Entamoeba histolytica*. John Wiley and Sons, Inc., New York, NY, pp. 351-369.
4. - Anaya-Velázquez F, Padilla-Vaca F, Virulence of *Entamoeba histolytica*: a challenge for human health research (2011) *Future Microbiol.* 6(3):255-8.
5. - Morf L, Singh U. *Entamoeba histolytica*: a snapshot of current research and methods for genetic analysis (2012) *Curr Opin Microbiol.* 15(4):469-75.
6. -Expression Profiling Invitrogen Benchtopics (2003) 2:1-6 Product usage: A brief discussion of using MicroArray, Real-time PCR and I-SAGE in Expression profiling studies.
7. -Diamond LS. Lumen dwelling protozoa: *Entamoeba*, *Trichomonads* and *Giardia* (1983) p. 76–110. In J. B. Jensen (ed.), *In vitro cultivation of protozoan parasites*. CRC Press, Boca Raton, Fla.
8. - Sambrook J, Russell DW (ed 2001) *Molecular Cloning Laboratory Manual Third Edition* Cold Spring Harbor Laboratory, New York
9. - The abundant polyadenylated transcript 2 DNA sequence of the pathogenic protozoan parasite *Entamoeba histolytica* represents a nonautonomous non-long-terminal-repeat retrotransposon-like element which is absent in the closely related nonpathogenic species *Entamoeba dispar*.