

El proceso de *N*-glicosilación de proteínas en *Entamoeba histolytica*

Rosana Sánchez López

RESUMEN. De manera general, el trofozoito de *Entamoeba histolytica* se describe como una célula con alta actividad secretora pero carente de estructuras-organelos tipo retículo endoplásmico rugoso (ERr) y aparato de Golgi (AG). No obstante, la evidencia bioquímica, molecular y de clonación *in silico* de genes, acumulada en los últimos años revela que la maquinaria molecular involucrada en la ruta secretoria en eucariotes está presente en los trofozoitos amibianos. El proceso de *N*-glicosilación de proteínas no es la excepción. En este trabajo se describen tanto las reacciones enzimáticas involucradas en la biosíntesis de los monosacáridos como en la obtención del lípido-oligosacárido precursor, su

transferencia *en bloc* al residuo asparagina (*N*) de proteínas nacientes y las reacciones de glucosilación y deglucosilación del *N*-glicano. Es de hacer notar que estas funciones son típicas del RER. Respecto a etapas posteriores del proceso de *N*-glicosilación las cuales involucran manosidasas y otras glicosiltransferasas específicas del AG, éstas parecen estar ausentes en *Entamoeba histolytica*. Sin duda un riguroso estudio de la estructura del glicano asociado a glicoproteínas secretadas o asociadas a la membrana plasmática del trofozoito proporcionará valiosa información sobre las etapas tardías del proceso de *N*-glicosilación de proteínas en este parásito.

INTRODUCCIÓN

Entamoeba histolytica es el parásito protozoario responsable de la amibiasis en humanos, enfermedad que afecta severamente a más de 48 millones de personas llegando a ser la causa de 70,000 muertes anuales, según reportes de la Organización Mundial para la Salud [WHO/PAHO/UNESCO, 1997]. *E. histolytica* tiene un ciclo de vida de dos estadios, sin presentar reservorio animal o vector de transmisión. Sabemos que el ciclo inicia cuando una persona ingiere quistes presentes en agua o alimentos contaminados. El desenquistamiento se induce en el tracto digestivo por una serie de estímulos, liberando trofozoitos invasivos que se adhieren y colonizan la mucosa del colon. Finalmente, y en condiciones poco definidas aún, el trofozoito se transforma en quiste, el cual es eliminado en las heces fecales, completando así el ciclo de vida.

El trofozoito de *Entamoeba* es una célula de 20-40 μ m, muy flexible, que se desplaza por formación de pseudópodos. Es capaz de ingerir una variedad de partículas, bacterias y eritrocitos, entre otros. Es una célula de fácil cultivo bajo condiciones microaerofílicas a 37°C en medio con suero. El trofozoito de *E. histolytica* es amitocondriado y puede ser mono-, bi- y, en ocasiones, multi-nucleado. El núcleo está inmerso en un citosol rico en vesículas y vacuolas, algunas asociadas a la actividad fagocítica del trofozoito. Una peculiaridad im-

portante del trofozoito, en sí una célula cuya patogenicidad depende de su actividad secretora, es la ausencia de organelos típicos de la ruta secretoria de eucariotes, como son el retículo endoplásmico rugoso (ERr) y aparato de Golgi. (Martínez-Palomo, A., 1982). De donde surge la pregunta ¿cuáles son las estructuras subcelulares que cumplen funciones típicas de RER y Golgi, tales como son la síntesis y transporte de glicoproteínas? La era de la biología molecular y de las estrategias genómicas ha proporcionado algunas herramientas muy útiles. Así la identificación de varias proteínas amibianas típicas de RER y su expresión asociada a las abundantes vacuolas y vesículas sugiere, fuertemente, que dichas estructuras membranosas pudieran cumplir funciones tipo RER (Gosh *et al.*, 1999; Sanchez-Lopez *et al.* 2000; Manning-Cela *et al.* 2003; Sanchez *et al.* 2004; Salgado *et al.* 2005).

LA *N*-GLICOSILACIÓN DE PROTEÍNAS EN *ENTAMOEBA HISTOLYTICA*

La *N*-glicosilación (donde *N* es asparagina), una de las modificaciones de proteínas mas comunes en células eucarióticas, es un proceso molecular muy conservado. *Grosso modo*, el proceso puede ser dividido en 4 rutas o etapas sucesivas: 1) síntesis de lípido-oligosacárido por ensamblaje sucesivo y ordenado de una cadena de azúcares ligada al dolicol, 2) transferencia, *en bloc*, del oligosacárido a un residuo de asparagina (*N*) de la proteína naciente, por acción de un complejo multienzimático denominado oligosacaryltransferasa (OSTasa), 3) procesamiento del *N*-oligosacárido catalizado por las enzimas α -glucosidasa I y II y Glc:glicoprotein-glucosyltransferasa o GlcPTasa y 4) modificaciones de la estructura *N*-glicano en compartimientos celulares *post*-RER.

* Departamento de Medicina Molecular y Bioprocesos, Instituto de Biotecnología, UNAM. Cuernavaca, Mor, México.

Inspirada en el trabajo pionero del grupo del Dr. E. López-Romero (U. de Guanajuato, México) que aborda la caracterización bioquímica de varias enzimas involucradas en las etapas iniciales de la N-glicosilación de proteínas en *E. histolytica* (Vargas-Rodríguez *et al*, 1998; Villagómez-Castro *et al*, 1998), en este trabajo me he enfocado a la identificación, *in silico*, de posibles genes amibianos involucrados en la síntesis del lípido-oligosacárido precursor, la transferencia del N-glicano a proteínas nacientes y su posterior modificación. El objetivo a cumplir es hacer una inferencia sobre la maquinaria molecular de N-glicosilación de proteínas en este parásito. La estrategia seguida está basada en la aplicación de herramientas bioinformáticas de dominio público con el propósito de identificar genes amibianos ortólogos. Es obligado mencionar que la búsqueda *in silico* de secuencias de genes específicos contenidas en bases de datos se limita a una fase predictiva inicial que requiere de un exhaustivo análisis bioquímicos-funcional. En este contexto, los resultados descritos en este trabajo se enlazan muy favorablemente con algunas actividades enzimáticas y/o genes descritos por otros grupos en paralelo al desarrollo del presente análisis. La Tabla 1 presenta la información en su conjunto. El análisis de los re-

sultados obtenidos se resume en la Figura 1 en un formato esquemático del proceso de N-glicosilación en levaduras, como célula modelo. Tres predicciones relevantes se desprenden de este análisis (Fig. 1): 1) la posible estructura del complejo lípido-oligosacárido precursor se describe como dolicol-P-P-GlcNAc₂Man₅. Esta predicción se sustenta en que, presumiblemente, el genoma de amiba no contiene secuencias que codifican para las manosiltransferasas (Alg3, Alg6 y Alg9) y glucosiltransferasas (Alg8, Alg10 y Alg12) involucradas en el ensamblaje de residuos de manosa adicionales y glucosa presentes en el glicano precursor típico en eucariotes, dolicol-P-P-GlcNAc₂Man₉Glc₃. Me es muy satisfactorio mencionar que la predicción de la estructura del precursor dolicol-P-P-GlcNAc₂Man₅ ha sido confirmada recientemente (Samuelson *et al*, 2005). 2) Se infiere que el dolichol-P-P-GlcNAc₂Man₅ se transloca al lumen del RER para ser transferido, *en bloc*, a la proteína naciente por acción de un complejo catalítico tipo OSTasa. 3) Se deduce un mecanismo control de calidad de síntesis y plegamiento de proteínas catalizado por un ciclo de deglucosilación-reglucosilación del N-glicano que involucra dos enzimas, la α -glucosidasa II y la UDP-Glc:glucoprotein-glucosiltransferasa.

Tabla 1. Identificación de genes de *E. histolytica* con posible participación en el proceso de síntesis de azúcares precursores y ensamblado del dolicol-oligosacárido.

Ortólogo	Número de identificación en TIGR	Valor E	Enzima	Número EC	Referencia
UAP1	138.m00095	6.7e-61 (Dm)	UDP-GlcNAc pirofosforilasa	2.7.7.23	[6]
PGM1	Y14444.1 ^a	1e-142 (Dd)	Fosfoglucomutasa	5.4.2.2	[5]
UGP1	106.m0013	1e-105 (Dd)	UDP-glucose pirofosforilasa	2.7.7.9	[6]
ALG4	26.m00333	3e-65 (Ath)	Fosfomanomutasa	5.4.2.8	[6]
DPM1	167.m00117	2e-46 (Lm)	Dolicol-P-manosa sintasa	2.4.1.83	[6]
ALG7	142.m00140	1e-55 (Cp) ^c	UDP-N-GlcNAc:dolicol-P GlcNAc -1-fosfotransferasa	2.7.8.15	[6]
ALG1	192.m00078	1e-65 (Sc) ^c	GDP-manosa:dolicol-PP-quitobiosa manosiltransferasa	2.4.1.142	[6]
ALG2	90.m00172	6e-64 (Sc) ^c	GDP-manosa:dolicol-PP-GlcNAc ₂ Man ₂ α 1,3manosiltransferasa	2.4.1.132	[6]
ALG11	3.m00560	1e-57 (Sc) ^c	GDP-manosa:glicolípido α 1,2manosiltransferasa	2.4.1.-	[6]
STT3	16.m00289	1e-129 (Sc) ^c	Oligosacariltransferasa subunidad Stt3	-	[2]
OST1	3.m00578	3e-13 (Hs) ^c	Oligosacariltransferasa subunidad Ost1	-	Este trabajo
OST2	85.m00155	1e-10 (Mm) ^c	Oligosacariltransferasa subunidad Ost2	-	Este trabajo
DDOST48	-	2e-42 (Ce) ^c	Dolicol-difosfoligosacárido-protein glicotransferasa	2.4.1.119	Este trabajo
α glucosidasa II	25.m00236	8.5e-172 (Hs) ^c	α -glucosidasa II subunidad catalítica	-	Este trabajo
GlcPTase	52.m00151	7e-80 (Dd) ^c	UDP-Glc:glucoprotein glucosiltransferasa	2.7.8.19	Este trabajo

^a Número de Acceso en GenBank™

^b (PSI-BLAST, 1 iteración)

^c Cp: *Cryptosporidium parvum*; Sc: *Saccharomyces cerevisiae*; Hs: *Homo sapiens*; Mm: *Mus musculus*; Ce: *Caenorhabditis elegans*; Dd: *Dictyostelium discoideum*; Dm: *Drosophila melanogaster*; Ath: *Arabidopsis thaliana*; Lm: *Leishmania mexicana*

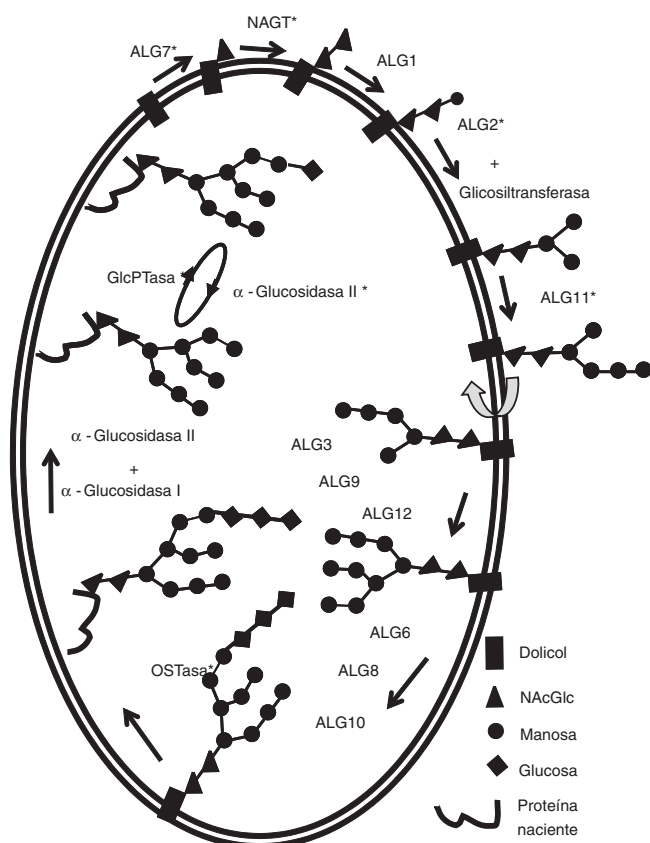


Figura 1. Posible mecanismo de N-glicosilación de proteínas en *E. histolytica* basado en el modelo de levadura. Las actividades enzimáticas y genes ortólogos identificados en *E. histolytica* se indican con un asterisco (*). La nomenclatura utilizada es como sigue: ALG7 (UDP-GlcNAc:dolicol-P-GlcNAc fosfotransferas), NAGT (UDP-GlcNAc:dolicol-PP-GlcNAc transferasa), ALG1 (GDP manosa:dolicol-PP-quitobiosa manosiltransferasa), ALG2 (GDP-manosa:dolicol-PP-GlcNAc₂Man₂α1,3-manosiltransferasa), glicosiltransferasa, ALG11 (GDP-manosa:glicolípido α1,2-D-manosiltransferasa), ALG3 (α1,3- manosiltransferasa), ALG12 (α1,6-manosiltransferasa), ALG9 (manosiltransferasa), ALG6 (α1,3-glucosiltransferasa), ALG8 (α1,3-glucosiltransferasa), ALG10 (α1,2-glucosiltransferasa), OSTasa (complejo oligosacaryltransferasa), α-glucosidasa I, α-glucosidasa II, GlcPTasa (UDP-Glc: glicoprotein glucosiltransferasa).

CONCLUSIONES

Si bien el análisis *in silico* aquí descrito nos lleva a predecir aspectos relevantes de la maquinaria de N-glicosilación en *Entamoeba histolytica*, también nos ofrece un enorme potencial como guía en estudios bioquímicos, funcionales y estructurales, entre otros, de la maquinaria molecular y celular de tan peculiar célula. La identificación de posibles genes no es más que una de las etapas iniciales de un largo camino por recorrer.

AGRADECIMIENTOS

La autora agradece al Dr. Enrique Merino Pérez por su apoyo en el manejo de los procesos bioinformáticos y estimulante asesoría que motivaron la realización de este trabajo.

REFERENCIAS

- 1.- Gosh, SK, Field, J., Frisardi, M., Rosenthal, B., Mai, Z., Rogers, R. & Samuelson, J. 1999, Chitinase secretion by encysting *Entamoeba invadens* and transfected *Entamoeba histolytica* trophozoites; localization of secretory vesicles, endoplasmic reticulum and Golgi apparatus, Infection and Immunity, 67, 3073.
2. Gutiérrez, A., Sanchez-Lopez, R., Ramos, M.A. and Alagón, A. 2000, Cloning of the *Entamoeba histolytica* STT3 gene, a subunit of the oligosaccharyltransferase complex, Archives Medical Research 31: S162-163.
3. Manning-Cela, R., Marquez, C., Franco, E., Talamás-Rohana, P. & Meza, I. 2003, BFA-sensitive and insensitive exocytic pathways in *Entamoeba histolytica* trophozoites: their relationship to pathogenesis. Cellular Microbiology 5, 921-932.
4. Martínez-Palomo, A., 1982, The biology of *Entamoeba histolytica*, John Wiley & Sons LTD.
5. Ortner, S., Binder, M., Scheiner, O., Wiedermann, G. & Duchene, M., 1997. Molecular and biochemical characterization of phosphoglucomutases from *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar*. Molecular and Biochemical Parasitology 90, 121-129.
6. Salgado M, Villagomez-Castro JC, Rocha-Rodriguez R, Sabanero-Lopez M, Ramos MA, Alagon A, Lopez-Romero, E. & Sanchez-Lopez R. 2005. *Entamoeba histolytica*: biochemical and molecular insights into the activities within microsomal fractions. Experimental Parasitology 110:363-73.
7. Samuelson J, Banerjee S, Magnelli P, Cui J, Kelleher DJ, Gilmore R & Robbins PW. 2005. The diversity of dolichol-linked precursors to Asn-linked glycans likely results from secondary loss of sets of glycosyltransferases. Proc Natl Acad Sci U S A. 102:1548-53.
8. Sánchez R., Saralegui A., Olivos-García A., Scapolla C., Damento G., Sanchez-Lopez R., Alagón A. & Stock RP. 2004. *Entamoeba histolytica*: Intracellular distribution of the Sec61α subunit of the secretory pathway and down-regulation by antisense peptide nucleic acids, Experimental Parasitology 109:241-251.
9. Sanchez-Lopez, R., Gutiérrez, A., Juárez, P., Olvera, A., Ramos, M.A., Sanchez, R., Saralegui, A., Stock, R.P., & Alagón, A. 2000. Molecular genetics of the secretory pathway in *E. histolytica*: an overview. Archives of Medical Research 31: S151-152.
10. Vargas-Rodriguez, L., Villagómez-Castro, J.C., Flores-Carreón, A., López-Romero, E., 1998, Identification and characterisation of early reactions of asparagine-linked oligosaccharide assembly in *Entamoeba histolytica*. International Journal for Parasitology 28: 1333-1340.
11. Villagómez-Castro, J.C., Calvo-Méndez, C., Vargas-Rodríguez, L., Flores-Carreón, A., López-Romero, E., 1998, *Entamoeba histolytica*: solubilization and biochemical characterization of dolichol phosphate mannose synthase, an essential enzyme in glycoprotein biosynthesis. Experimental Parasitology 88: 111-120.

Correspondencia:

Rosana Sánchez López

Departamento de Medicina Molecular y Bioprocesos, Instituto de Biotecnología UNAM, AP 510-3, Cuernavaca Mor. 62210, México, Fax (52-777) 317-2388, Tel (52-777) 329-1602, E-mail: rosana@ibt.unam.mx