

UACM

Universidad Autónoma
de la Ciudad de México

Nada humano me es ajeno

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE LA CIUDAD DE MÉXICO

COLEGIO DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA

POSGRADO EN CIENCIAS GENÓMICAS

**Análisis de una proteína TRF-Like
en *Entamoeba histolytica***

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE

MAESTRA EN CIENCIAS GENÓMICAS

P R E S E N T A :

VANESSA DÍAZ MEDINA

DIRECTORA

DRA. ELISA IRENE AZUARA LICEAGA

CODIRECTOR

DR. FRANCISCO JAVIER RENDÓN GARANDILLA

**POSGRADO
EN CIENCIAS
GENÓMICAS**

Ciudad de México, febrero de 2018.

SISTEMA BIBLIOTECARIO DE INFORMACIÓN Y DOCUMENTACIÓN



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE LA CIUDAD DE MÉXICO COORDINACIÓN ACADÉMICA

RESTRICCIONES DE USO PARA LAS TESIS DIGITALES

DERECHOS RESERVADOS[©]

La presente obra y cada uno de sus elementos está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor; por la Ley de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México, así como lo dispuesto por el Estatuto General Orgánico de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México; del mismo modo por lo establecido en el Acuerdo por el cual se aprueba la Norma mediante la que se Modifican, Adicionan y Derogan Diversas Disposiciones del Estatuto Orgánico de la Universidad de la Ciudad de México, aprobado por el Consejo de Gobierno el 29 de enero de 2002, con el objeto de definir las atribuciones de las diferentes unidades que forman la estructura de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México como organismo público autónomo y lo establecido en el Reglamento de Titulación de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México.

Por lo que el uso de su contenido, así como cada una de las partes que lo integran y que están bajo la tutela de la Ley Federal de Derecho de Autor, obliga a quien haga uso de la presente obra a considerar que solo lo realizará si es para fines educativos, académicos, de investigación o informativos y se compromete a citar esta fuente, así como a su autor ó autores. Por lo tanto, queda prohibida su reproducción total o parcial y cualquier uso diferente a los ya mencionados, los cuales serán reclamados por el titular de los derechos y sancionados conforme a la legislación aplicable.

INTEGRACIÓN DEL JURADO:

Presidente: **Dra. Lilia Lopez Cánovas, UACM**

Secretario: **Dra. Elisa Irene Azuara Liceaga, UACM**

1er. Vocal: **Dr. Francisco J. Rendón Garandilla, UAG**

2^{do}. Vocal: **Dr. Jesús Valdés Flores, CINVESTAV**

Plantel de Adscripción:

PLANTEL DEL VALLE, UACM.

DIRECTORA DE TESIS

Dra. Elisa Irene Azuara Liceaga
Universidad Autónoma de la Ciudad de México

CODIRECTOR DE TESIS

Dr. Francisco J. Rendón Garandilla
Universidad Autónoma de Guerrero

COMITÉ TUTORAL

TUTORES

Dra. Elisa Irene Azuara Liceaga
Posgrado en Ciencias Genómicas
Universidad Autónoma de la Ciudad de México

Dr. Francisco J. Rendón Garandilla
Posgrado en Ciencias Genómicas
Universidad Autónoma de la Ciudad de México

ASESORES Y LECTORES DE TESIS

Dra. Lilia Lopez Cánovas
Posgrado en Ciencias Genómicas
Universidad Autónoma de la Ciudad de México

Dr. Jesús Valdés Flores
Departamento de Bioquímica
Centro de Investigación y de Estudios avanzados del IPN

Dr. Mario César Lopez Camarillo
Posgrado en Ciencias Genómicas
Universidad Autónoma de la Ciudad de México

AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio 2 del Posgrado en Ciencias Genómicas de la UACM, así mismo contó con el valioso apoyo del Dr. Jesús Valdés Flores del Departamento de Bioquímica del CINVESTAV-IPN.

- Agradezco a la UACM por la beca Obtención de Grado Modalidad Maestría otorgada para realizar mis estudios de Maestría.
- También agradezco COMECYT (FOLIO: 14BCM0138-II) por la beca otorgada para realizar mis estudios de Maestría.
- El presente trabajo se realizó gracias al apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) a través del proyecto número CB-2014-222956 de la convocatoria de Ciencia Básica.

A la **Dra. Elisa Azuara** por aceptarme y permitirme laborar en su laboratorio, por siempre estar abierta a nuevas ideas y no tener miedo a implementar nuevas técnicas, por su compromiso para la culminación de este proyecto, por su apoyo en mi formación académica y su gran paciencia.

Al **Dr. Francisco Rendón** por sus asesorías, por sus grandes aportaciones para la culminación de este proyecto, por su disposición en todo momento, por su paciencia desde el primer día en que llegue al laboratorio y por todas las atenciones prestadas.

A la **Dra. Lilia López Cánovas** por su apoyo académico, por su gran experiencia y por sus atinados comentarios en la realización de la presente investigación.

Al **Dr. Jesús Valdez y a la Dra. Rosa Cárdenas** por todo su apoyo, su tiempo y sus comentarios que han enriquecido este trabajo.

A la **Dra. Patricia Cuellar y al M. en C. Eduardo Carrillo** por su apoyo en los experimentos de microscopía confocal.

A los **M. en C. David Hernández, Helios Cárdenas, Víctor Álvarez, Dra. Jaqueline Castañeda** por su apoyo en los experimentos y por todas esas horas de trabajo que fueron muy divertidas con su compañía.

A **Dan Zavala, Araceli Bautista, Gilberto Mandujano, Carlos alvarez, Cristian Sanchez, Domingo, Raúl García, Olga Hernandez, Frederick, Jonathan, Alma, Laura, José Juan, Mara, Fabiola, Euclides, Bryan, Rosy** por su apoyo y su compañía, pues gracias a ellos las horas de trabajo se hicieron menor largas.

A **Fortino Huerta López, Manuel Nolasco Quiroga, Susana Mendez Gómez, Lorena Palacio, Ingrid, Ricardo Godínez, J. Carlos Santiago, Mary Hernandez** por su amistad y gran apoyo.

Dedicatoria

A mi madre Maricruz Díaz por mostrarme a su manera lo bonito que es la vida y su estudio, por enseñarme con su ejemplo a ser fuerte, a correr riesgos porque el que no arriesga no gana, por dejarme ser siempre libre y aprender de cada aventura, por enseñarme a ver la realidad tal cual es y que una mujer sagaz es capaz de lograr cualquier cosa que se proponga.

Índice	Página
Lista de tablas	11
Lista de abreviaturas	12
Lista de figuras	16
Resumen	18
1. Introducción	20
1.1. Telómeros	20
1.2. Maquinarias de protección telomérica	24
1.3. Modificaciones Postraduccionales de TRF1 y TRF2	31
1.4. Proteínas TRF en protozoarios	33
2. Antecedentes particulares del proyecto	34
2.1. Ciclo de Vida	35
2.2. Epidemiología	36
2.3. Estructura del Genoma	38
2.4. Cromosomas de <i>E. histolytica</i>	39
2.5. Familia de proteínas con dominio de unión a DNA MYB en <i>E. histolytica</i>	43
3. Justificación	47
4. Hipótesis	48
5. Objetivos	48
5.1. Objetivo general	48
5.2. Objetivos particulares	48
6. Estrategia experimental	49
7. Materiales y métodos	50
7.1. Cultivo de trofozoítos de <i>E. histolytica</i>	50
7.2. Aislamiento de DNA genómico de <i>E. histolytica</i>	50

7.3. Diseño de oligonucleótidos para la clonación del gen <i>ehtrf-like III</i>	51
7.4. Amplificación del gen <i>ehtrf-like III</i>	51
7.5. Clonación del gen <i>ehtrf-like III</i> en el vector de clonación pJET 1.2/blunt	52
7.6. Transformación de las células <i>E. coli</i> DH5 α	53
7.7. Análisis de las clonas con el gen <i>EhTRF-like III</i> en el plásmido pJET 1.2/blunt mediante digestión con las enzimas de restricción <i>SmaI</i> y <i>XhoI</i>	53
7.8. Cuantificación y secuenciación del plásmido pJET 1.2/blunt- <i>ehtrf-like III</i>	54
7.9. Secuenciación del plásmido pJET 1.2/blunt- <i>ehtrf-like III</i>	55
7.10. Subclonación del gen <i>ehtrf-like III</i> en el vector pKT-3M	55
7.11. Análisis del plásmido pKT-3M que contiene al gen <i>ehtrf-like III</i> mediante digestión con las enzimas de restricción <i>SmaI</i> y <i>XhoI</i>	57
7.12. Purificación del plásmido pKT-3M y el pKT-3Mehtrf-like IIIlox para la transfección.	57
7.13. Transfección de los trofozoítos y formación de los grupos pKT-3M, pTRF-likeIIIlox	58
7.14. Extracción y cuantificación del RNA total de los trofozoítos transfectados	50
7.15. Reacción de retrotranscripción	60
7.16. Evaluación de la expresión génica del <i>ehtrf-like III</i> mediante qRT-PCR de los trofozoítos transfectados	62
7.17. Diseño de un péptido policlonal diferencial de la proteína EhTRF-like III	53
7.18. Producción de anticuerpos policlonales contra la proteína EhTRF-like III	62
7.19. Titulación de anticuerpos	63
7.20. Obtención de extractos totales	63
7.21. Fraccionamiento subcelular: obtención de extractos nucleares y citoplásmicos	64
7.22. Cuantificación de las proteínas	65

12.24. Ensayos de Inmunodetección para determinar la sobreexpresión y localización de la proteína EhTRF-like III	65
7.24. Stripping de membranas Western blot	66
7.25. Ensayos de inmunofluorescencia para la detección de la proteína EhTRF-like III	66
7.26. Ensayos de Unión a DNA con extractos nucleares de los trofozoítos que sobre expresan a la proteína EhTRF-like III	67
7.27. Curva de crecimiento	68
7.28. Análisis de la estructura de la proteína EhTRF-like III y sus modificaciones postraduccionales.	69
8. Resultados	70
8.1. Clonación del gen <i>ehtrf-like III</i> en el vector pJET 1.2/blunt	70
8.2. Determinación de la sobreexpresión del gen <i>ehtrf-like III</i> por RT-PCR y qRT-PCR	74
8.3. Análisis de la estructura de las proteínas EhTRF-like	76
8.4. Obtención y titulación de anticuerpos policlonales contra la proteína EhTRF-like III	79
8.5. Inmunodetección de la proteína EhTRF-like III en trofozoítos de <i>E. histolytica</i>	82
8.6. Localización de la proteína EhTRF-like III por microscopía confocal	83
8.7. Determinación de la capacidad de unión de la proteína EhTRF-like III a secuencias de ADN por ensayos EMSA	85
8.8. Ensayo de competencias	87
8.9. Ensayos de superretardamiento	88
8.10. Curva de crecimiento	89

9 . Discusión	90
10. Conclusiones	97
11. Bibliografía	98
12. Anexos	105

Índice de tablas	Página
Tabla 1. Secuencias teloméricas de diversos organismos	21
Tabla 2. Veinte principales causas de enfermedad	37
Tabla 3. Distribución porcentual de casos nuevos de enfermedad por fuente de notificación	37
Tabla 4. Comparación y características del genoma de <i>E. histolytica</i>	38
Tabla 5. Organización telomérica de <i>G. lamblia</i>	43
Tabla 6. Porcentaje de identidad entre las proteínas EhTRF-like de <i>E. histolytica</i> y las proteínas TRF de <i>Homo sapiens</i>	45
Tabla 7. Mezcla de reacción de amplificación	52
Tabla 8. Mezcla de reacción de ligación “Blunting”	53
Tabla 9. Mezcla de reacción de ligación	56
Tabla 10. Oligonucleótidos usados para el análisis de la expresión del gen <i>ehtrf-like III</i>	60
Tabla 11. Mezcla de reacción de PCR	61
Tabla 12. Curva de BSA	65
Tabla 13. Sondas diseñadas para el análisis de la capacidad de unión de la proteína EhTRF-like III	67
Tabla 14. Comparación de modificaciones postraduccionales entre las proteínas TRF2 de <i>H. sapiens</i> y EhTRF-like III de <i>Entamoeba histolytica</i>	79

ABREVIATURAS

A	Adenina
aa	Aminoácidos
ALT	Elongación alternativa de los telómeros
ATM	Ataxia Telangiectasia Mutada
APBs	cuerpos asociados a la vía alternativa de mantenimiento de telómeros del inglés ALT-associated bodies
ATR	Proteína relacionada Ataxia Telangiectasia Mutada y Rad3 del inglés, Ataxia Telangiectasea and Rad3 related
BSA	Albumina Bovina Sérica
°C	Grados Celsius
C	Citocina
c-MYB	Contraparte celular del gen del virus de la mieloblastosis aviar
Da	Daltones
DAPI	4',6-diamino-2-fenilindol
DBD-MYB	Dominio de unión a DNA tipo MYB
DDR	Respuesta al Daño en el DNA
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNAc	DNA plasmídico

DNAg	DNA genómico
DNAp	DNA complementario
dNTPs	Deoxinucleótidos trifosfatados
EDTA	Ácido etilendiamino tetra acético
EGTA	Ácido etilendiaminoglicol tetra acético
EhTRF	TRFs homólogas en <i>E. histolytica</i>
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
g	Gravedades
GAR	Región rica en Glicina y Arginina
G	Guanina
h	Hora
H	Histona
HTH	Conformación "hélice-vuelta-hélice"
ITL	T-Loop intersticial
KDa	Kilodaltones
Kb	Kilobases
KLH	Hemocianina de lapa californiana
mL	Mililitros
mg	Miligramos
μ M	Micromolar
mM	Milimolar
μ g	Microgramos
μ L	Microlitros

min	Minutos
MTS	señal masiva multitelomerica
nm	Nanómetros
ng	Nanogramos
NHEJ	Recombinación no homologa del inglés, Non Homologous End Joining
NLS	Señal de localización nuclear
NPC	Complejo del poro nuclear
OB	Dominio de reconocimiento de Oligosacáridos/Oligonucleótidos/Oligopéptidos
pb	pares de bases
PBS	Solución salina amortiguadora con fosfatos
PCR	Reacción en cadena de la Polimerasa
pH	Potencial de Hidrógeno
pI	Punto isoeléctrico
PM	Peso molecular
PMSF	Fluoruro de Fenilmetilsulfonilo
POT1	Proteína de protección a telómeros, del inglés, Protection of Telomeres Protein-1
PTM	Modificación post-traducciona, del inglés Post-Translational Modification
qRT-PCR	RT acoplada a I2a PCR cuantitativa
RAP1	Proteína represora/activadora del inglés, Represor/activador protein 1

RCT	C-terminal de RAP1
RNA	Ácido ribonucleico
RNAm	RNA mensajero
rpm	Revoluciones por minuto
RT	Retrotranscripción
RT (-)	Control negativo para RT
SDS-PAGE	Geles desnaturalizantes de poliacrilamida
s	Segundos
T	Timina
TCA	Ácido Trichloroacético
TEM	Microscopia electrónica de transmisión
TERT	Telomerasa
Tm	Temperatura de fusión para del primer
TIN2	Proteína de interacción a TRF1 del inglés, TRF1 interacting nuclear protein 2
TPP1 POT1-	Proteína organizadora de POT1/TIN2, del inglés, TIN2 Organizing Protein
TRF1/2	Factor de unión a repetidos teloméricos 1 y 2, del inglés, Telomeric repeat binding factor 1
TRFH	Dominio de homodimerización de TRF
V	Volts
%ID	Porcentaje de identidad
WB	Western blot

ÍNDICE DE FIGURAS

Página

Figura 1. Estructura del cromosoma	20
Figura 2. Posición de los telómeros en el núcleo celular	22
Figura 3. La ubicación de los telómeros cambia durante el ciclo celular	23
Figura 4. Diferentes maquinarias celulares para protección telomérica	24
Figura 5. Representación del dominio OB-fold	25
Figura 6. Estructura del complejo Shelterin	27
Figura 7. Representación esquemática de la estructura de los dominios de TRF-1 y TRF-2	31
Figura 8. Modificaciones postraduccionales de TRF-1 y TRF-2	32
Figura 9. LaTRF es homologa a las proteínas TRFs de vertebrados y <i>T. brucei</i>	33
Figura 10. Ciclo de vida de <i>E. histolytica</i>	35
Figura 11. Cromosomas de <i>E. histolytica</i>	40
Figura 12. Análisis de isocoros de las regiones terminales de los cromosomas	41
Figura 13. Organización de los arreglos de tRNAs en <i>E. histolytica</i>	42
Figura 14. Familia de proteínas con dominio Myb-like en <i>Entamoeba histolytica</i>	44
Figura 15. Alineamiento de las proteínas TRFs de mamíferos con las proteínas EhTRF-like de <i>E. histolytica</i>	45
Figura 16. Interacción de las proteínas EhTRF-like con la secuencia canónica	46
Figura 17. Expresión de los genes <i>ehtrf-like</i> en <i>E. histolytica</i>	47
Figura 18. Estructura del vector pJET 1.2/blunt	52
Figura 19. Estructura del vector pKT-3M	55
Figura 20. Esquema de inmunización para obtener el anticuerpo anti TRFlite III	63
Figura 21. Amplificación del gen <i>ehtrf-like III</i>	70
Figura 22. Análisis de las clonas obtenidas durante la clonación del gen <i>ehtrf-like III</i> en el vector pJET1.2/blunt	71
Figura 23. Alineamiento de la secuencia obtenida por secuenciación y la secuencia del gen <i>ehtrf-like III</i> contenida en la base de datos Amoeba BD	73
Figura 24. Subclonación del gen <i>ehtrf-likeIII</i> en el vector pKT-3M	74

Figura 25. Sobreexpresión del gen <i>ehtrf-like III</i> en trofozoítos de <i>E. histolytica</i>	75
Figura 26. Análisis de la sobreexpresión del gen <i>ehtrf-like III</i> en trofozoítos de <i>E. histolytica</i> analizada por <i>qRT-PCR</i>	76
Figura 27. Análisis de la estructura de las proteínas EhTRF-like	77
Figura 28. Análisis de las modificaciones postraduccionales de la proteína EhTRF-like III	78
Figura 29. Diseño de un péptido diferencial de la proteína EhTRF-like III	80
Figura 30. Titulación del anticuerpo policlonal anti EhTRF-like III	81
Figura 31. Localización celular de la proteína EhTRF-like III	82
Figura 32. Expresión y localización de la proteína EhTRF-like III en trofozoítos transfectados de <i>E. histolytica</i>	83
Figura 33. Inmunofluorescencia de la proteína EhTRF-like III usando el anticuerpo α EhTRF-like III	84
Figura 34. Inmunofluorescencia de la proteína EhTRF-like III usando el anticuerpo α -Myc	85
Figura 35. Ensayo EMSA de la proteína EhTRF-like III con la secuencia de <i>H. sapiens</i> (HuTRF) y la secuencia derivada de los arreglos de tRNA de <i>E. histolytica</i> (HuTRF)	86
Figura 36. Ensayo de competencia de la sonda EhTRF con las sondas HuTRF, EhTRF, No Tel y la no relacionada	87
Figura 37. Ensayo de supershift usando los anticuerpos α EhTRF-like III y α -Myc	89
Figura 38. Curvas de crecimiento de trofozoítos de <i>E. histolytica</i> que sobreexpresan a la proteína EhTRF-like III (pTRF-likeIIIox) o transfectados con el vector vacío (pKT-3M)	79
Figura 39. Modelo de la localización de la proteína EhTRF-like III	96

Resumen

Los factores de unión a repetidos teloméricos (TRFs) se unen a secuencias teloméricas en el DNA de doble cadena. Estas proteínas juegan un importante papel en la regulación de la longitud de los telómeros, protegen los extremos de los cromosomas, previenen la fusión de los cromosomas, funcionan como sensores de daño al DNA y regulan la senescencia o envejecimiento. El genoma de *H. sapiens* tiene dos genes que codifican para proteínas TRF: TRF-1 y TRF-2. Estas proteínas son parálogas y se unen a secuencias de DNA de doble cadena en la secuencia TTAGGGG en las regiones teloméricas. *E. histolytica* contiene tres genes que codifican para proteínas similares a las proteínas TRF, las cuales se denominaron EhTRF-like I, II, III. El dominio de unión a DNA tipo MYB de estas proteínas tienen un porcentaje de similitud del 25 al 35% con el de humano, además en la tercer alfa hélice se encuentra conservado el motivo VLDKDKWRT, donde los residuos de lisina y arginina están involucrados en el reconocimiento del DNA telomérico. En este trabajo clonamos, seleccionamos y sobreexpresamos a la proteína EhTRF-like III en trofozoítos de *E. histolytica*. La proteína EhTRF-like III se localizó en el núcleo de *E. histolytica* mediante análisis de WB del fraccionamiento subcelular de los trofozoítos y por inmunofluorescencia indirecta. Los ensayos de EMSA revelaron que esta proteína forma complejos específicos DNA-proteína con secuencias de DNA tipo telomérica. Finalmente, analizamos el efecto de la sobreexpresión de la proteína EhTRF-like III sobre el crecimiento de los trofozoítos. Observamos una extensión de la fase estacionaria en las clonas que sobreexpresan a la proteína EhTRF-like III. A usar de que las secuencias teloméricas de *E. histolytica* no han sido descritas, la presencia de la proteína EhTRF-like III sugiere que este parásito podría exhibir mecanismos similares de protección de sus extremos cromosomales que en vertebrados.

Abstract

Telomeric Repeat Binding Factors (TRFs) bind to double stranded DNA sequences in telomeres. These proteins play a critical role in telomere length regulation; chromosomes end protection, prevent chromosomes fusion, sensors DNA damage and regulate senescence or aging. *H. sapiens* genome contains two encoding genes for TRF proteins: TRF1 and TRF2. These proteins are paralogues and they bind to the double stranded DNA sequenced (TTAGGG) in telomeres. *E. histolytica* contains three genes encoding for EhTRF-like protein (EhTRF-like I, II, III) with significant sequence similarity to eukaryotic TRFs in their C-terminal DBD Myb-like (25 to 35%). Multiple alignment of the Myb DBD amino acid sequence from TRF-1, TRF-2 and EhTRF-like protein showed that the VLDKDKWRT motive is conserved in the third alpha helix where the lysine and arginine residues are involved in the DNA recognition. In this work, in order to initiate the functional characterization of EhTRF-like proteins, we selected and over-expressed the EhTRF-like III protein in *E. histolytica* trophozoites, observed its nuclear localization by western blot using subcellular fractions and indirect immunofluorescence EhTRF-like III protein. Using EMSA assays we probe that this protein forms specific DNA-protein complexes. Finally, we analyzed the effect of over- expression on trophozoites growth. We observed a lengthening of the stationary phase in the over-expressing clones. Even when in *E. histolytica* telomeric sequences have not been described, the presence of the EhTRF-like protein suggests that this parasite could exhibits similar mechanisms that in vertebrates to protect their chromosomal endings.

1. Introducción

1.1. Telómeros

El concepto de telómero (del griego *telos*: final y *meros*: parte) fue enunciado por Herman Joseph Muller. Este autor postuló la existencia de una estructura especial en los extremos de los cromosomas al observar que la radiación afectaba casi la totalidad de los cromosomas de *Drosophila melanogaster* provocando cambios tales como mutaciones o deleciones, pero los extremos conservaban siempre su integridad. Gracias a este descubrimiento fue merecedor al premio nobel de medicina y fisiología. Sin embargo, no fue hasta que posteriormente investigadores como Bárbara McClintock, Elizabeth H. Blackburn, Titia de Lange, entre otros, mostraron que los telómeros son estructuras especializadas de protección de los cromosomas lineales y que se encuentran conservados entre especies (Lúcio H. *et al.* 1999). Los telómeros son de fundamental importancia pues además de ser un registro de la replicación celular también evitan que los cromosomas se fusionen entre sí, facilitan la interacción con la envoltura nuclear y son necesarios para la duplicación completa, entre otras funciones (Masayuki *et al.* 2011).

Los telómeros se encuentran en los extremos de los cromosomas lineales y están compuestos de secuencias de DNA ricas en guanina, las cuales están repetidas en tándem y con un extremo saliente (*overhang*) en forma de cadena sencilla en dirección 3' (Hohensinner *et al.* 2011; da Silva *et al.* 2010; Lúcio H. *et al.* 1999) como se observa en la figura 1A.

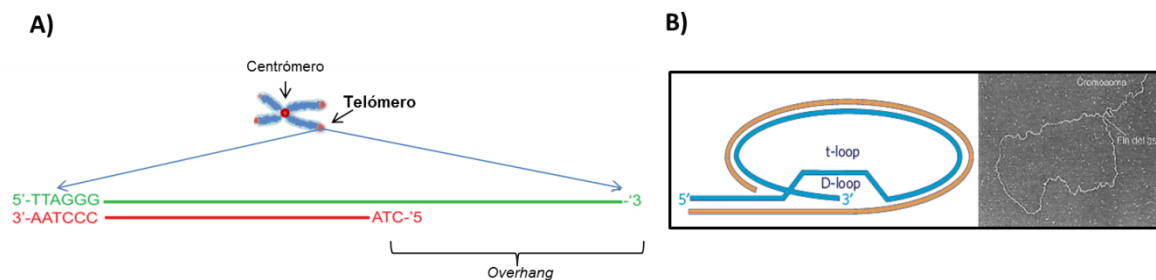


Figura 1. Estructura del cromosoma. (A) Los cromosomas están conformados por una estructura centromérica y en el extremo terminal se encuentran los telómeros que están conformados por secuencias repetitivas. El extremo 3' se encuentra en forma de cadena sencilla al cual se le ha dado el nombre de *overhang* (Modificado de Calado *et al.* 2008). (B) A la izquierda se muestra la conformación que el telómero adopta (t-loop y D-loop) y a

la derecha la visualización con microscopía electrónica del t-loop de células HeLa (Griffith *et al.* 1999).

El telómero puede adoptar una estructura de orden superior en donde el *overhang* invade la porción del telómero de doble cadena, formando un loop protector al que se le llamó t-loop y al sitio de invasión o desplazamiento se le dio el nombre de D-loop (Griffith *et al.* 1999) (Fig. 1B).

La secuencia de los repetidos teloméricos es variable entre los diferentes organismos. Los telómeros de *Homo sapiens* y los del protozooario *Tetrahymena thermophila* tienen una secuencia telomérica que consta de 6 nucleótidos: 5'-TTAGGG-3' y 5'-TTGGGG-3' respectivamente. En cambio, el hongo *Kluyveromyces lactis* presenta una secuencia telomérica de 25 nucleótidos 5'-ACGGATTTGATTAGGTATGTGGTGT-3' mientras que en otros casos, el mismo organismo puede presentar secuencias teloméricas diferentes, como *Schizosaccharomyces japonicus* el cual presenta tres secuencias teloméricas, 5'-GTCTTA-3, 5'-GGGTTTA-3' y 5'-GTCTTAGGGTTTA-3' (Tabla 1) (Giraud-Panis *et al.* 2013; R. Sepsiova *et al.* 2016, Hiraoka *et al.* 1998)

Además de las diferencias en secuencia, también existen diferencias en la longitud de los telómeros. Los telómeros de *H. sapiens* presentan una longitud que oscilan entre 4-15 kb con un overhang de 50-300 nucleótidos, mientras que en *Tetrahymena thermophila* tienen una longitud de 250 a 900 nt con un overhang de 16 nucleótidos (Tabla 1) (A. Cesare *et al.* 2012).

Tabla 1. Secuencias teloméricas de diversos organismos

ORGANISMO	SECUENCIA TELOMERICA
<u>Vertebrados</u> <i>H. sapiens</i>	TTAGGG
<u>Antropodos</u> <i>B. mori</i>	TTAGG
<u>Nematodos</u> <i>C. elegans</i>	TTAGGG
<u>Plantas</u> <i>A. thaliana</i> <i>A. Cepa</i> <i>B. solanaceae</i>	TTTTAGGG CTCGGTTATGGG TTTTTTAGGG
<u>Algas verdes</u> <i>C. reinhardtii</i>	TTTTAGGG
<u>Protistas</u> <i>O. nova</i> <i>P. falciparum</i> <i>G. lamblia</i> <i>T. cruzi</i> <i>T. thermophila</i> <i>E. crassus</i>	TTTTGGGG TT[T/C]AGGG TACCC TTAGGG TTGGGG TTTTGGGG

Fungi	
<i>N. crassa</i>	TTAGGG
<i>Sch. japonicus</i>	GTCTTA, GGGTTTA, TCTTAGGGTTTA
<i>S. cerevisiae</i>	TG ₂₋₃ (TG) ₁₋₆
<i>S. Pombe</i>	T ₁₋₃ ACA ₀₋₂ C ₀₋₁ G ₁₋₈ , G ₀₋₆ GGTTACAC ₀₋₁
<i>C. glabrata</i>	CTGTGGGGTCTGGGGTG
<i>C. parapsilosis</i>	TTGATTATACTGAGGTCCGGATG
<i>K. lactis</i>	ACGGATTTGATTAGGTATGTGGTGT

Modificado de Giraud-Panis *et al.* 2013; R. Sepsiova *et al.* 2016, Hiraoka *et al.* 1998

La posición que ocupan los telómeros dentro del núcleo puede variar dependiendo de la fase del ciclo celular, por ejemplo durante la interfase los telómeros se encuentran agrupados en *foci* alrededor de la membrana nuclear como se muestra en la figura 2A, mientras que durante el resto del ciclo celular estos se encuentran localizados en el interior del núcleo. La unión de los telómeros a la membrana nuclear se encuentra conservada en diferentes especies, incluyendo *H. sapiens* (Figura 2B), ya que esta organización protege a los repetidos teloméricos de la recombinación (Schober *et al.*, 2009). Esta posición también es crucial para la “Mitosis abierta” que sucede cuando existe un desensamblan los componentes de la membrana nuclear durante la fase de mitosis. La unión de los telómeros a la membrana nuclear esta mediada por diferentes proteínas. Por ejemplo se ha descrito que la proteína RAP1 interacciona con la proteína Sun1, la cual es una proteína de membrana nuclear (Crabbe L. *et al.* 2012).

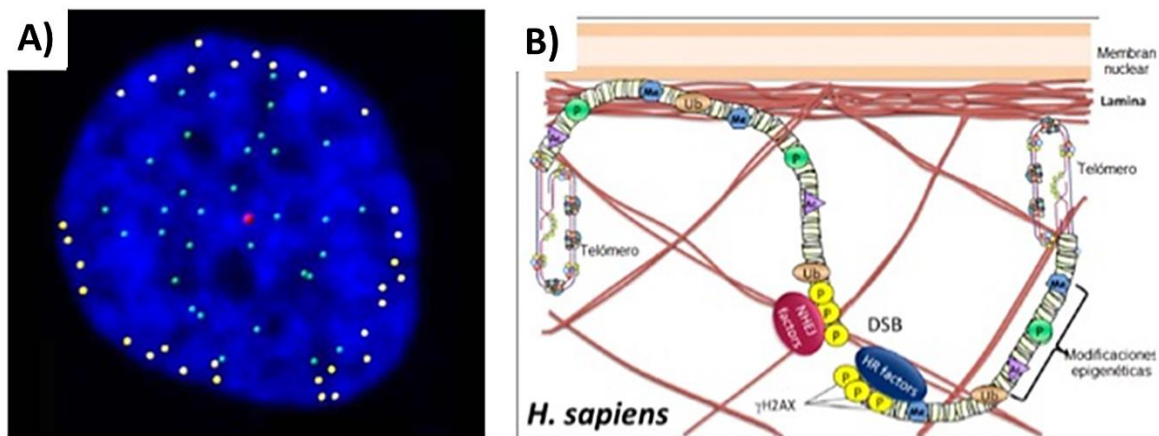


Figura 2. Posición de los telómeros en el núcleo celular. La ubicación de los telómeros en la membrana nuclear durante la interfase se encuentra conservada entre diferentes especies como en *H. sapiens*. (A) Ensayo de Inmunofluorescencia del núcleo en donde en las marcas amarillas y verdes muestran los extremos de los cromosomas. (B) La ubicación de los telómeros en la membrana nuclear durante la interfase se encuentra conservada entre diferentes especies como *H. sapiens*. (Tomado y modificado de Kanoh 2013; Taddei *et al.* 2012; Gonzalo *et al.* 2016; Carson E. 2013).

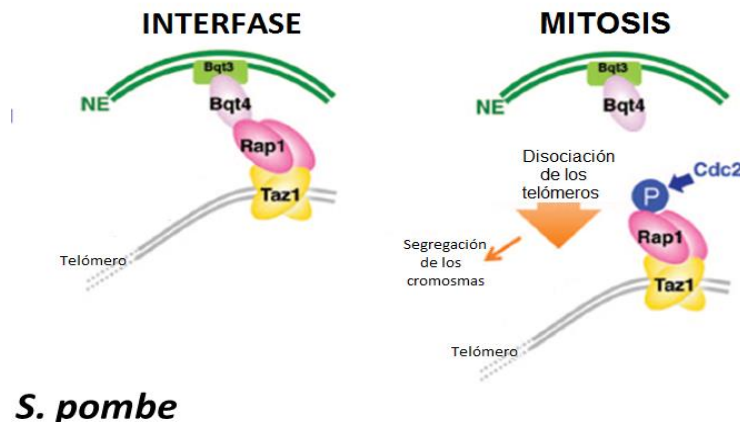


Figura 3. La ubicación de los telómeros cambia durante el ciclo celular. Durante la interfase de *S. pombe* los telómeros se encuentran localizados en la membrana nuclear formando *foci* teloméricos. En la mitosis diferentes cinasas fosforilan a las proteínas Rap1, Taz1, Bqt que los mantienen unidos a la membrana permitiendo su disociación y segregación (Tomado y modificado de Kanoh 2013; Taddei *et al.* 2012; Gonzalo *et al.* 2016).

Durante la interfase de *S. pombe* los telómeros se encuentran localizados en la membrana nuclear formando *foci* teloméricos, regularmente en el extremo opuesto del nucléolo. Una vez entrada la fase de mitosis diferentes cinasas fosforilan a las proteínas (Rap1, Taz1, Bqt) que los mantienen unidos a la membrana permitiendo su disociación y segregación. Inmediatamente al empezar la fase de mitosis las proteínas Bqt 1 y 2 interactúan con Rap1 y reclutan a Sad1-Kms. Kms interactúa con la dineína citoplásmica, formando un puente telómero-Bqt-Sad1-Kms-dineína, lo que permite el movimiento de los telómeros con el huso acromático o SPB (del inglés *spindle pole body*). Posteriormente empieza la disgregación de *foci* y los telómeros empiezan a disociarse de la membrana nuclear, los centrómeros se separan del SPB para relocalizarse en el centro del núcleo. Mientras que en la mitosis abierta proteínas como las CDK1 fosforilan a la Laminina nuclear y algunos componentes del NPC (Nuclear pore complex) induciendo su desensamblaje. Además, cinasas VRK (*vaccinia related kinase*) fosforilan a las proteínas de unión a cromatina lo que reduce la afinidad de los cromosomas por la envoltura nuclear. En ambos casos, una vez terminada la mitosis los telómeros retornan a la membrana nuclear y nuevamente forman *foci*. Estos procesos evitan que los cromosomas se fusionen entre sí, facilitan la interacción con la envoltura nuclear y permiten la duplicación cromosomal completa (Masayuki *et al.* 2011; Carson E. 2013).

1.2. Maquinarias de protección telomérica

El extremo terminal del telómero está protegido por proteínas especializadas denominadas factores teloméricos, las cuales forman un complejo o maquinarias denominadas *Telosomas* cuya función es proteger al DNA de la degradación y la fusión intercromosómica. Existen tres tipos de proteínas que se unen al DNA: las proteínas que se unen al DNA de una sola cadena, las que se unen al DNA de doble cadena y proteínas que interactúan con factores teloméricos o también llamadas proteínas accesorias las cuales se han conservado desde organismos unicelulares hasta organismos más complejos. Interessantemente a pesar de tan importante función, existe una gran diversidad de maquinarias conformadas por diferentes proteínas las cuales se muestran en la figura 4.

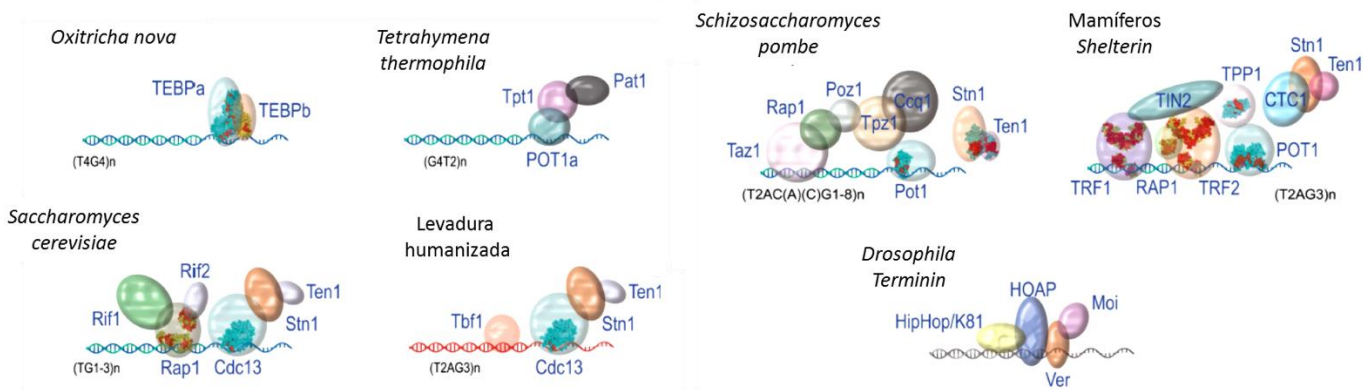


Figura 4. Diferentes maquinarias celulares para protección telomérica. Existe una gran diversidad de complejos proteicos. Sin embargo, todos cumplen con la misma función de protección a los telómeros (Modificado de Giraud-Panis *et al.* 2013)

Se han propuesto varias teorías para explicar la existencia de las diferentes maquinarias o complejos para proteger los extremos de los cromosomas. Por ejemplo, una de ellas propone la existencia de un ancestro eucariota común el cual presentaba distintos complejos, cada uno con funciones diferentes y que durante el curso de la evolución, algunos organismos los perdieron o ganaron subunidades de estos complejos, mientras que otros organismos perdieron casi por completo, requiriendo así que las proteínas que permanecieron tomaran nuevas funciones como un mecanismo compensatorio (Giraud-Panis *et al.* 2013).

Los organismos ciliados como *Styloychia* y *Oxytricha nova* sus tienen cromosomas macro nucleares, con la secuencia telomérica 5'-G₄T₄G₄T₄G₄T₄-3'. Los repetidos de esta secuencia se encuentran en forma de cadena sencilla u *overhang*. Estos ciliados tiene dos proteínas: TEBP α y TEBP β de 56 kDa y 41 kDa respectivamente, las cuales interaccionan con las hebras de DNA de cadena sencilla pudiendo formar dos complejos alternativos (Figura 4). TEBP α y TEBP β forman heterodímeros y homodímeros al unirse específicamente a través de su dominio de unión a DNA tipo OB fold en el DNA terminal de cadena sencilla (tres subunidades de TEBP α y dos de TEBP β). Estos complejos cumplen diferentes funciones, por ejemplo, el heterodímero TEBP α -TEBP β inhibe la acción de la telomerasa, mientras que los homodímeros no lo hacen. Además este complejo es DNA dependiente ya que la interacción con el DNA telomérico estimula la asociación de TEBP α y TEBP β . Un aspecto importante del dominio OB-fold es que se caracteriza por tener una serie de aminoácidos los cuales son poco conservados entre las diferentes especies. Sin embargo la estructura tridimensional se mantiene, lo que le permite la adaptación a una gran diversidad de sustratos como oligonucleótidos, oligosacáridos, péptidos y DNA (Fang *et al.* 1993, Gilson *et al.* 2007) (Figura 5).

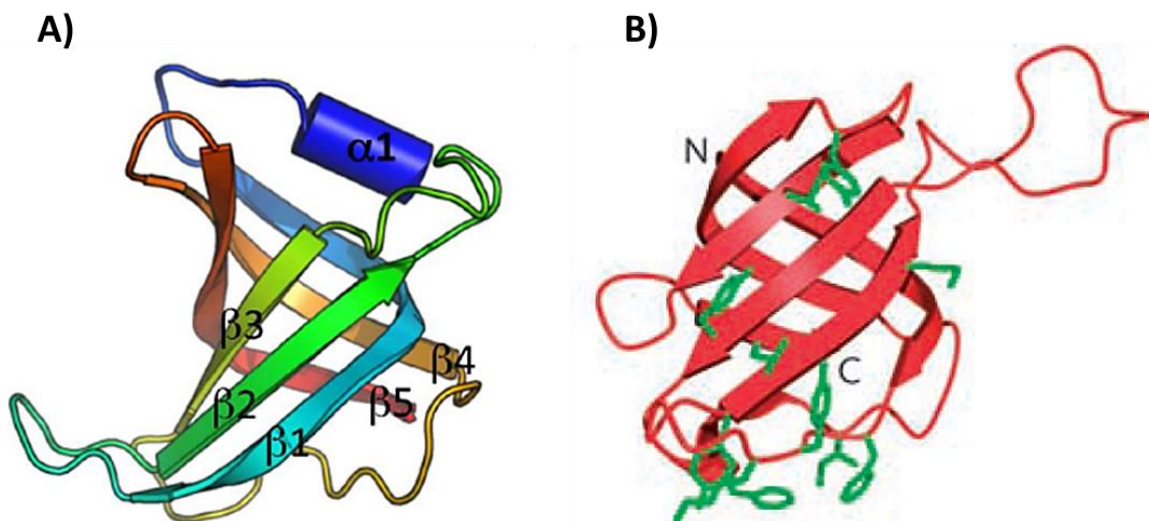


Figura 5. Representación del dominio OB-fold. (A) OB-fold canónico donde se muestra las estructuras β -plegadas del 1 al 5 y α -hélice 1 que forman un β -barril, la conexión entre las β -plegadas varía (secuencia, longitud y conformación) lo que también contribuye a la especificidad de este dominio. (B) OB-fold de *Oxytricha nova* interaccionando con el DNA de cadena sencilla (Tomado de Giraud-Panis *et al.* 2013; Rhodes *et al.* 2002).

Otro caso interesante es el de *Drosophila* ya que los extremos terminales de sus cromosomas no presentan repetidos ricos en GC, carecen de la enzima telomerasa por lo tanto su elongación es independiente ésta y terminan en forma

de cadena sencilla u overhang. *Drosophila* presenta un complejo de protección especializado llamado *Terminin* el cual está constituido por las proteínas HOAP (del inglés HPI/ORC Associated Protein) y HipHop que se unen al DNA de doble cadena; Moi (Modigliani) y Ver (Verrocchio) se asocian al *overhang* de DNA de una sola cadena (Figura 4). La proteína Ver presenta un dominio OB-fold como las proteínas TEBP α -TEBP β y se cree que este le permite su unión con el DNA. Moi y Ver inhiben la fusión telomérica, HOAP ayuda en la estabilización de Hip Hop además presenta un dominio HMG-like el cual se ha sugerido que está involucrado en la unión al DNA de doble cadena. Con excepción de Ver ninguna de las proteínas del *Terminin* se encuentra conservada en otros organismos, por lo se ha propuesto que en el curso de la evolución *Drosophila* perdió su telomerasa, así como algunas proteínas de protección a telómeros y proteínas de unión al DNA dependientes de secuencia, pero el complejo *Terminin* evolucionó rápidamente pues presenta una alta tasa de sustitución no sinónimas (Giraud-Panis *et al.* 2013, Raffa *et al.* 2013).

En el caso de *Saccharomyces cerevisiae* existen dos complejos y cada uno funciona de manera independiente: por un lado el complejo CST (Cdc13-Stn1-Tel1) de unión a DNA telomérico de cadena sencilla, mediante el dominio OB-fold de la proteína Cdc13, la cual estimula la replicación de los telómeros y permite el reclutamiento de la telomerasa formando heterotrímeros con Stn1 y Ten1. Por otra parte Rap se une al DNA de doble cadena en forma de monómero e interactúa con el complejo Sir que permite la formación de heterocromatina subtelomérica o con el complejo Rif que controla negativamente la elongación de los telómeros (Gilson *et al.* 2007) (Figura 4). Una de las proteínas de la maquinaria de protección telomérica de *S. cerevisiae* es Rap1 la cual se une al DNA a través de su dominio Myb-like el cual le permite su unión al DNA de doble cadena. El core de su dominio Myb-like contiene tres α -hélices, donde la segunda y tercera hélice forman el motivo Hélice-vuelta-Hélice. La tercera α -hélice hace contacto con el surco mayor del DNA. Además, los tres motivos tienen un extremo terminal que hace contacto con el surco menor del DNA. El motivo de unión al DNA se le denomina *homeodominio* (Rhodes *et al.* 2002).

En mamíferos las proteínas teloméricas se organizan en un complejo de orden superior conocido como complejo *Shelterin*; su nombre deriva del análogo de otros complejos proteicos tales como cohesina o condensina. Este complejo tiene una exquisita especificidad para asociarse en repetidos teloméricos, así como un papel crucial en la formación de la estructura telomérica y bloquea a las proteínas que pueden dañar a los telómeros. En los telómeros también podemos encontrar proteínas accesorias que no forman parte del complejo Shelterin, por lo cual se han establecido algunos criterios para distinguir los componentes del Shelterin

TPPI

(Por sus siglas en inglés, *POT1-TIN2 Organizing Protein*) compuesta de 544 aminoácidos y un peso molecular de 61348.05 g/mol. Forma un puente entre TIN2 y POT1, mantiene la longitud del telómero mediante la interacción con la telomerasa, además interactúa con proteínas de la vía ATM lo cual puede ocasionar el arresto celular a través de p53. TPP1 también incrementa la afinidad de unión de POT1 con el DNA telomérico

POT1

(Por sus siglas en inglés, *Protection of Telomeres Protein-1*) es una proteína con una longitud de 634 aminoácidos y un peso molecular de 71442.05 g/mol, la cual interactúa específicamente con el DNA telomérico de una sola cadena presente en el T-loop, cuando el telómero se encuentra en configuración abierta. Regula la resección de la cadena C y la longitud telomérica, previene la activación inapropiada de ATM para asegurar que los extremos de los cromosomas no se reconozcan como DNA dañado. La delección de POT1 resulta en circularización cromosómica, pérdida rápida de secuencias teloméricas, fusión de los extremos de los cromosomas, así como su incorrecta segregación. El mal funcionamiento de esta proteína se encuentra asociada a desordenes como Mieloma Múltiple y Gammopatía monoclonal de significancia indeterminada (Trupti *et al.* 2015).

TRF1

La proteína TRF1 (Por sus siglas en inglés, *Telomeric Repeat Binding Factor 1*) tiene 439 residuos de aminoácidos y un peso molecular de 50116.46 g/mol, presenta un dominio de unión a DNA tipo Myb/SANT el cual se une específicamente al DNA de doble cadena de repetidos teloméricos formando homodímeros en un ángulo de aproximadamente 120°. TRF1 forma homodímeros los cuales se forman antes de la interacción con el DNA telomérico (figura 7). TRF1 tiene un papel importante en el ensamble del complejo Shelterin, ya que cualquier alteración en la secuencia de nucleótidos o aminoácidos de TRF1 provoca una distorsión en su estructura lo que afecta directamente su asociación con otras proteínas que forman parte del complejo Shelterin. Además la disrupción en la dimerización de TRF1 disminuye su afinidad por los repetidos teloméricos, provocando que los extremos cromosomales se encuentren expuestos y vulnerables a mecanismos de reparación del DNA. También TRF1 participa en la

protección del telómero ya que regula negativamente la longitud telomérica por represión de la actividad de la telomerasa, además interacciona con los telómeros durante la interfase y mitosis. TRF1 se encuentra íntimamente asociada a la vía de ATM (Ataxia Telangiectasia Mutada) ya que la activación de esta vía en respuesta al DNA dañado resulta en la fosforilación de TRF1 y de esta manera en una inhibición de su actividad (Trupti *et al.* 2015).

La abolición de TRF1 bloquea su interacción con p53 y CHK2 lo que provoca fallas en la regulación de la formación de la horquilla de replicación y en los puntos de regulación del ciclo celular o check points, incremento en las mutaciones y consecuentemente divisiones celulares aberrantes e inestabilidad genómica. Interactúa con Tankirasa 1 y 2 las cuales regulan positivamente la longitud telomérica, debido a la liberación de TRF1 de los extremos por ADP-ribosilación, lo que permite que la telomerasa entre en acción. Una sobreexpresión de tankirasa inhibe la función de TRF1 lo que provoca la exposición de los extremos teloméricos, activación de la actividad de la telomerasa y alteración en la longitud telomérica donde este último es un importante factor en la progresión hacia cáncer. RLIM es otra proteína que interactúa con TRF1 inhibiendo su actividad mediante su degradación mediada por ubiquitinación lo que permite el eventual mantenimiento de la longitud telomérica (Trupti *et al.* 2015).

TRF1 también está asociada con las proteínas Ku, componentes mayores de NHEJ (Non Homologous End Joining), cualquier disrupción en TRF1 provoca la activación de las proteínas Ku, las cuales reconocen fracturas en el DNA de doble cadena en los telómeros y esto puede propiciar errores en los mecanismos de reparación, por lo que la NHEJ puede provocar fusión de los cromosomas, deleciones terminales y señales masivas multi-teloméricas (MTS) (Trupti *et al.* 2015).

TRF2

La proteína TRF2 (Por sus siglas en inglés *Telomeric Repeat Binding Factor 2*) forma parte del complejo shelterin. TRF2 posee 542 residuos de aminoácidos y un peso molecular de 59593.50 g/mol, se une al ADN telomérico de doble cadena en forma de homodímeros a través de sus dominios Myb/SANT e interactúa con TIN y RAP1 los cuales son componentes también del complejo shelterin (figura 7). Participa en la formación de los orígenes de replicación en los telómeros ya que recluta al ORC (Origin Recognition Complex), helicasas como WRN, BLM y su enriquecimiento alrededor de la horquilla funciona como un sensor de estrés topológico ya que promueve la apertura del T-loop (Wood *et al.* 2014).

TRF2 también tiene la capacidad de remodelar el substrato telomérico en loops, esta conformación se encuentra conservada ya que dan protección a los telómeros y regulan a la telomerasa. El loop es estabilizado por cross-linking a través de invasión de la cadena sin requerir ATP; a esta estructura se le da el nombre de T-loop, sin embargo para lograr una correcta eficiencia TRF2 requiere la ayuda de otros factores como proteínas de reparación (Wood *et al.* 2014).

Los T-loops también pueden formarse de una secuencia telomérica intersticial, a lo cual se le ha dado el nombre de T-loop intersticial (ITL). Esta estructura se encuentra asociada con TRF2, la cual permite su interacción con laminina A/C y se ha propuesto que puede funcionar como otro mecanismo de estabilidad de los telómeros (Wood *et al.* 2014).

TRF2 también participa en la regulación de la cadena G de una sola hebra (Importante para la formación del T-loop, ya que la cadena G invade el DNA de doble hebra) al interactuar con diferentes enzimas como el complejo MRN (MRE11-RAD50-NBS1), las nucleasas ERCC1/XPF1, la RecQ helicasa WRN y la resección de la cadena 5' a través de la exonucleasa Apolo (Gilson *et al.* 2007).

Se ha reportado en diferentes estudios que la abundancia de TRF2 es inversamente proporcional a la densidad de nucleosomas teloméricos debido a que esta proteína incrementa la distancia internucleosomal y este evento ocurre en las fases S/G2/M (Galati *et al.* 2012).

La pérdida de TRF2 activa la vía ATM, lo que provoca la sobreexpresión de p53 y p21 e induce un arresto en el ciclo celular, apoptosis, la activación de ATM también activa la vía de reparación NHEJ, lo que provoca la fusión de los telómeros (de Lange T. 2015).

TRF2 posee la propiedad intrínseca de estimular los eventos iniciales de recombinación homóloga promoviendo la invasión de las cadenas y las Holliday junction. Además el dominio N-terminal básico de TRF2 previene el acortamiento de los telómeros mediante la inhibición de resolvasas como la proteína SLX4, así como GEN1 y MUS81, esto para asegurar la correcta reparación de las horquillas que tienen lugar durante la replicación de los telómeros (Saint-Léger *et al.* 2014).

Las proteínas TRF1 y TRF2 presentan una arquitectura en común (Figura 7). Las dos proteínas tienen un homeodominio también llamado dominio de unión al DNA tipo Myb/SANT con un alto grado de identidad (56%) y muestran afinidad por repetidos teloméricos de doble cadena. Tanto TRF1 como TRF2 comparten una

secuencia aminoacídica similar en el dominio de dimerización TRFH (identidad 27%) y se unen al DNA telomérico como homodímero. La interferencia estereoquímica del dominio TRFH evita la formación de heterodímeros ya que ambas proteínas presentan un dominio de señalización nuclear en el extremo carboxilo terminal. Sin embargo, el dominio N-terminal de TRF1 y TRF2 difieren significativamente uno del otro. TRF1 posee un dominio ácido mientras que TRF2 presenta un dominio básico rico en residuos de glicina y arginina por lo cual también es llamado dominio GAR. El punto isoeléctrico de estas dos proteínas es diferente siendo para TRF1 de 6.06 y de 9.11 para TRF2 (John R *et al.* 2012; Broccoli *et al.* 1997) como se muestra en la figura 7.

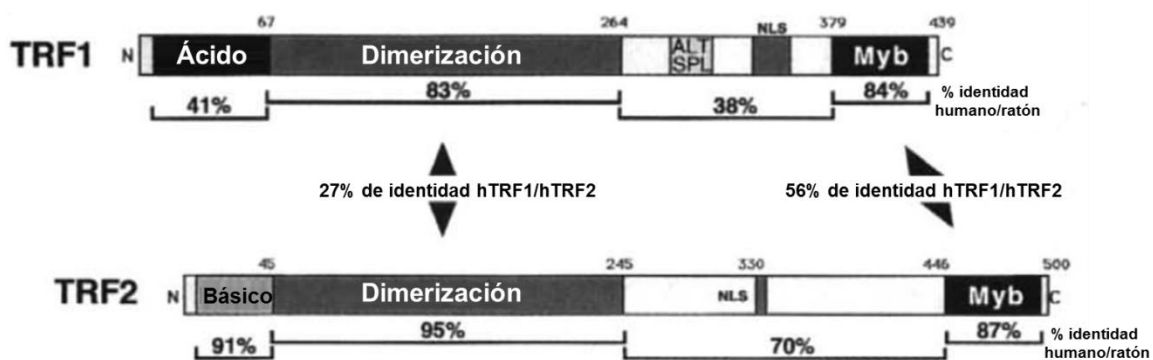


Figura 7. Representación esquemática de la estructura de los dominios de TRF1 y TRF2. Las proteínas TRF presentan un alto grado de identidad en sus dominios, sin embargo cada una presenta diferente punto isoeléctrico en su extremo amino (Tomado de Broccoli *et al.* 1997).

1.3. Modificaciones Postraducionales de TRF1 y TRF2

Las funciones de TRF1 y TRF2 son controladas por medio de modificaciones postraducionales (PTMs) las cuales regulan la homeostasis de la estructura telomérica. Entre estas se encuentran la fosforilación, ubiquitinación, SUMOilación, parsilación y metilación las cuales se encuentran conservadas entre mamíferos incluyendo rata, chimpancé, vaca, ratón, humano y otras especies como el reptil *Xenopus* (Broccoli *et al.* 1997) (Figura 8).

Se ha observado que la fosforilación regula la estabilidad y localización de TRF1 de *H. sapiens* y está implicada en respuesta al daño en la vía de reparación al DNA de doble cadena. Además, se encuentra implicada en la regulación de la unión de TRF2 con el DNA telomérico. Por otra parte TRF1 experimenta

poliubiquitinación lo cual hace a TRF1 blanco de degradación por el proteosoma. También se ha mostrado que la SUMOilación de TRF1 y TRF2 es importante para el mantenimiento de los telómeros ya que participa en la recombinación homóloga, también llamada ALT (Alternative Lengthening of Telomeres) en células carentes de telomerasa, lo cual da lugar a los cuerpos APBs (ALT-associated bodies).

Mientras que la metilación de TRF2 por la PRMT1 (Protein Arginine Methyltransferasa1) tiene un efecto en la regulación de la proliferación celular, la Poli-ADP-ribosilación de TRF1 causa su liberación de los telómeros. Este fenómeno vuelve a TRF1 susceptible de degradación por el proteosoma. Por último se ha propuesto que este mecanismo permitiría el acceso a la telomerasa en los telómeros, mientras que la Poli-ADP-ribosilación en TRF2 mantiene la integridad telomérica, así como reduce la unión de esta proteína con el DNA telomérico (John R *et al.* 2012).

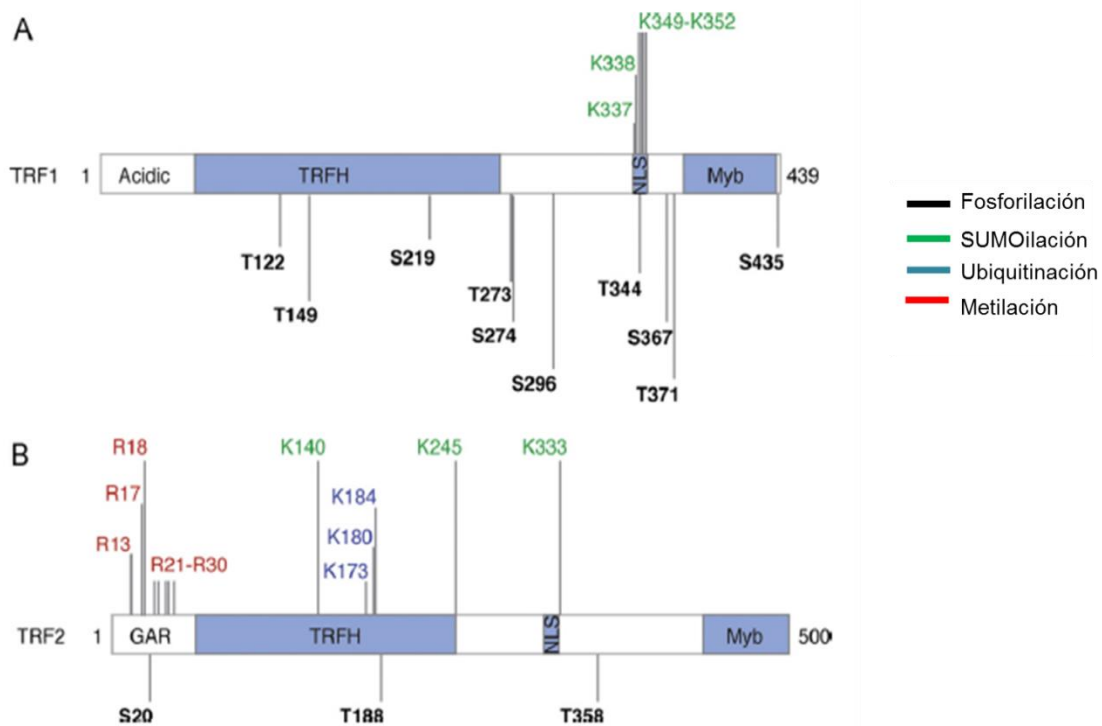


Figura 8. Modificaciones postraduccionales de TRF1 (A) y TRF2 (B). Los sitios de fosforilación son indicados en negro, los sitios de ubiquitinación en azul, los sitios de SUMOilación en verde y los sitios de metilación en rojo (Tomado de John R *et al.* 2012).

1.4. Proteínas TRF en protozoarios

En protozoarios como *Leishmania amazonensis* se han identificado dos proteínas de protección de telómeros: LaTBP1 y LaTRF. La proteína LaTBP1 tiene un dominio de unión al DNA Myb-like que le permite unirse al DNA telomérico rico en la secuencia GT. LaTBP1 se encuentra relacionada con la proteína telomérica Rap1 y con el factor de transcripción TFIIB. Estas proteína tiene un peso de aproximadamente 82.5 kDa, su dominio Myb-like se encuentra cercano al extremo c-terminal, lo que le permite unirse al DNA telomérico y reconocer específicamente la secuencia TTAGGG. También comparte una secuencia similar con el dominio de dimerización de las proteínas TRF1 y TRF2 de mamíferos (Figura 9) y se ha propuesto que la proteína LaTRF comparte una alta identidad y similitud con las proteínas TRFs putativas de *L. major*, *L. infantum* y *L. braziliensis* (da Silva *et al.* 2010).

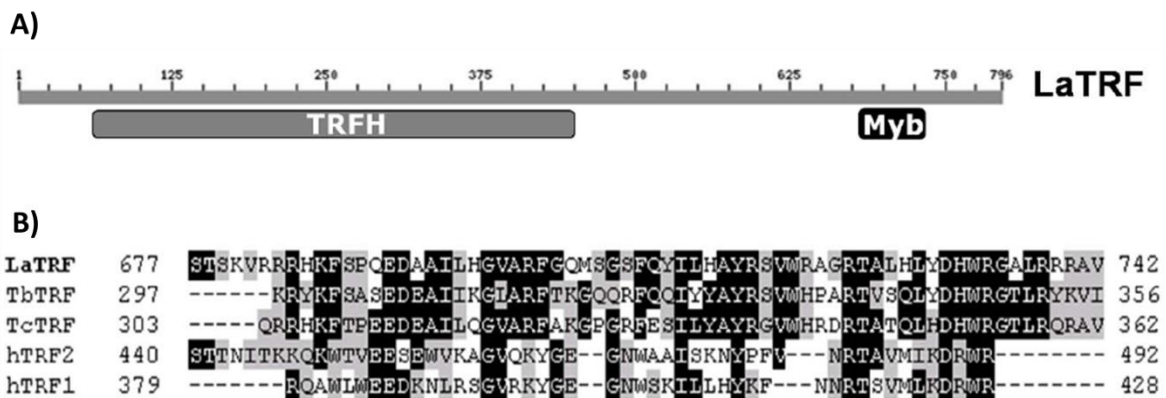


Figura 9. LaTRF es homóloga a las proteínas TRFs de vertebrados y *T. brucei*. A) Representación de los dominios de la proteína LaTRF. B) Alineamiento múltiple del dominio Myb-like de las proteínas TRFs de humano (hTRF1 y hTRF2), *L. amazonensis* (LaTRF), *T. brucei* (TbTRF) y *T. cruzi* (TcTRF) (Tomado de da Silva *et al.* 2010).

2. Antecedentes particulares del proyecto

Entamoeba histolytica es un protozoo anaerobio que parasita el intestino grueso provocando severas enfermedades gastrointestinales y bajo otras circunstancias también puede invadir la mucosa intestinal, entrar al torrente sanguíneo e inducir la formación de abscesos, tales como los abscesos hepáticos y en otros órganos.

Desde hace varios años se analizan los mecanismos que utiliza este parásito para invadir y causar daño tisular en el huésped. Por ejemplo se sabe que el daño tisular se desarrolla cuando los trofozoítos adheridos al epitelio intestinal penetran la mucosa, que en las primeras etapas de la relación huésped-parásito hace las veces de barrera que impide la adherencia, disminuye la motilidad de los trofozoítos y la invasión tisular. Sin embargo el parásito usa unas moléculas llamadas lectinas las cuales se unen a los carbohidratos de la célula epitelial intestinal que le permiten la adherencia a la célula blanco. La lectina más ampliamente estudiada es la específica para determinantes de la galactosa y N-acetil galactosamina (Gal/GalNac).

La secreción de proteínas formadoras de poro (ameboporos) en *E. histolytica* contribuyen a la muerte celular porque producen perforaciones en la membrana de la célula epitelial. La activación de la caspasa 3, una molécula efectora distal de la apoptosis, ocurre muy rápidamente después del contacto con el trofozoito de *E. histolytica*. Además este parásito secreta proteasas de cisteínas que digieren las proteínas de la matriz extracelular. Estas proteasas no solo son producidas por los productos amibianos, sino también por los productos liberados por la muerte de las células inflamatorias, como los leucocitos polimorfonucleares.

Los trofozoítos de *E. histolytica* también presentan otras estrategias de evasión, por ejemplo, la lectina amibiana tiene similitud con el CD59 humano, que es un antígeno que se encuentra en los leucocitos que participan en la inhibición del ensamble del complejo de ataque del sistema del complemento. Las proteasas de cisteína degradan las anafilotoxinas C3a, C5a y son capaces de degradar a la IgA y IgG humanas, lo que impide la opsonización de los trofozoítos.

E. histolytica ha desarrollado una gran variedad de mecanismos de evasión y de invasión, sin embargo el hecho de que no todos los individuos que se infectan padezcan la enfermedad sugiere que factores aun no bien identificados, tanto del huésped como del parásito están involucrados por lo que es importante continuar el estudio de este protozoo (Ximenez *et al.* 2007).

2.1. Ciclo de Vida

Durante el ciclo de vida de *E. histolytica* puede adoptar dos formas diferentes: trofozoítos y quiste. La forma infectiva es el quiste que son estructuras redondas de aproximadamente 10-16 μm de diámetro y es la forma resistente del parásito, mientras que el trofozoíto es la forma móvil del parásito y posee 20-40 μm de diámetro.

El desenquistamiento ocurre en el intestino delgado, donde los trofozoítos son liberados. A continuación migran hacia el intestino grueso, colonizando el epitelio intestinal y provocando severas enfermedades gastrointestinales. Sin embargo algunos pacientes no presentan sintomatología. Cuando las condiciones son adversas se producen quistes, los cuales son excretados en las heces fecales y pueden contaminar las fuentes de agua y alimentos. También los trofozoítos puede invadir la mucosa intestinal, entrar al torrente sanguíneo e inducir la formación de abscesos, tales como abscesos hepáticos, pulmonares y cerebrales. El quiste maduro presenta cuatro núcleos visibles y solo uno inmaduro, son esféricos con gránulos de cromatina y un cariosoma central. Cada quiste produce ocho trofozoítos y presentan una pared de quitina la cual los hace resistentes a la desecación permitiéndoles sobrevivir varios días o semanas en el ambiente externo. El ciclo de vida y las formas de parásito se muestran en la figura 10 (Ximenez *et al.* 2011).

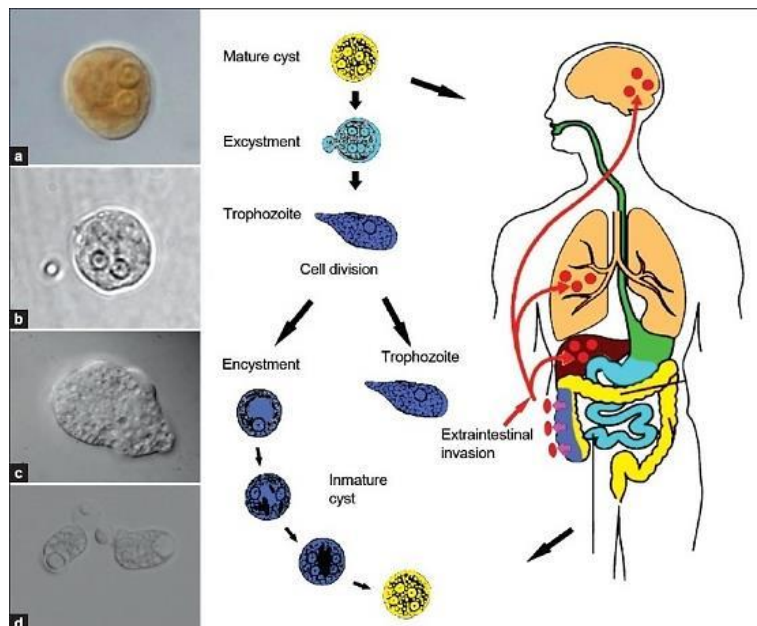


Figura 10. Ciclo de vida de *E. histolytica*. La infección ocurre cuando el quiste se ingiere en agua o alimentos contaminados, posteriormente ocurre un desenquistamiento donde éste pasa a trofozoíto que coloniza el intestino grueso, los quistes son excretados por las heces fecales. a) Quiste maduro teñido con Lugol. b) Quiste maduro sin tinción. c) Trofozoítos. d) trofozoítos con eritrocitos fagocitados (Tomado de Ximenez *et al.* 2011).

2.2. Epidemiología

Entamoeba histolytica tiene una distribución mundial. Sin embargo las infecciones por este parásito son más frecuentes en países tropicales y subtropicales en vías de desarrollo, debido a la influencia de factores sociodemográficos y escasos servicios sanitarios. La cepa más abundante es el de *E. histolytica* cepa HM1: IMSS y se encuentra principalmente en Bangladesh, Japón, China, EE.UU y México.

En México las infecciones intestinales parasitarias se deben a múltiples infecciones de más de un patógeno junto con parásitos comensales lo cual es un indicador de fecalismo (Ximenez *et al.* 2007; Zermeño *et al.* 2013). En el 2015 la amibiasis intestinal se encontró dentro de las 20 principales causas de enfermedad nacional por grupo de edad (Tabla 2), mientras que el absceso hepático amibiano y la amibiasis intestinal ocuparon el primer y quinto lugar respectivamente en casos nuevos de enfermedad por fuente de notificación (FUENTE: SUIVE-DGE. Secretaría de Salud 2015) (Tabla 3). Sin embargo, a pesar de tales reportes en México no se han implementado medidas para evitar la infección y propagación de *E. histolytica*, lo que hace aún más importante su estudio para comprender y proponer medidas para combatir a este parásito.

Tabla 2. Veinte principales causas de enfermedad por grupos de edad en la población general de los Estados Unidos Mexicanos 2015.

Padecimiento	Grupos de edad										
	< 1	1 - 4	5 - 9	10 - 14	15 - 19	20 - 24	25 - 44	45 - 49	50 - 59	60 - 64	65 y +
Infecciones respiratorias agudas	2 020 753	4 932 859	3 188 115	1 946 761	1 267 419	1 310 276	4 059 438	1 176 277	1 712 790	774 640	1 355 231
Infecciones intestinales por otros organismos y las mal definidas	288 519	878 302	512 214	358 884	267 455	360 722	1 080 057	265 543	378 569	163 478	342 925
Infección de vías urinarias	22 333	141 198	185 919	153 907	302 682	436 648	1 274 065	338 765	509 980	230 918	498 250
Úlceras, gastritis y duodenitis	608	3 089	10 409	74 617	113 261	148 317	458 904	158 191	202 623	96 449	161 242
Gingivitis y enfermedades periodontales	2 242	14 191	49 601	67 616	99 092	133 855	362 439	100 401	143 950	69 190	103 734
Conjuntivitis	56 587	100 874	73 143	51 830	41 524	58 008	200 210	54 334	83 625	37 741	76 816
Otitis media aguda	18 114	91 237	98 540	64 696	46 932	45 852	120 147	38 516	44 235	19 023	26 324
Vulvovaginitis aguda	117	1 581	3 726	9 013	44 637	83 147	225 715	47 435	39 278	11 611	10 941
Obesidad	4 285	7 604	16 326	24 420	20 854	31 627	182 909	55 572	73 255	25 258	29 529
Hipertensión arterial	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	1 340	6 387	91 601	58 615	110 858	56 564	113 624
Síndrome febril	11 161	39 835	34 531	32 243	26 128	37 635	126 807	24 105	34 800	12 013	24 078
Diabetes mellitus no insulino dependiente (Tipo II)	N.A.	N.A.	N.A.	280	800	3 560	79 640	55 263	104 533	48 887	75 375
Intoxicación por picadura de alacrán	1 748	20 133	24 738	28 508	30 174	29 257	75 487	15 153	21 237	8 466	17 141
Asma y estado asmático	8 133	51 817	51 313	29 610	13 659	12 161	41 729	13 998	20 067	8 825	14 945
Amebiasis intestinal	9 782	47 030	38 333	27 229	17 510	16 522	45 178	13 256	17 705	8 046	14 522
Candidiasis urogenital	N.A.	N.A.	N.A.	2 620	18 573	38 607	99 742	21 382	15 309	5 269	4 844
Insuficiencia venosa periférica	15	24	49	174	804	4 329	52 144	25 266	46 106	21 411	41 424
Otras helmintiasis	1 991	32 716	34 598	21 606	10 146	9 793	35 566	8 541	14 243	6 719	13 187
Varicela	10 521	58 894	55 118	18 596	8 207	8 913	16 197	1 061	793	260	564
Neumonías y bronconeumonías	22 464	28 467	7 822	4 210	2 849	3 735	16 692	5 958	12 432	8 383	43 304

Tomado de SUIVE/DGE/Secretaría de Salud/Estados Unidos Mexicanos 2015

Tabla 3. Distribución porcentual de casos nuevos de enfermedad por fuente de notificación en la población general de los Estados Unidos Mexicanos 2015.

Padecimiento	Fuente de notificación									
	Salud	IMSS-Ord	ISSSTE	IMSS-Prosp.	DIF	PEMEX	SEDENA	SEMAR	Otras	
Absceso hepático amebiano	56.31	23.04	7.51	4.95	0.00	0.68	0.00	0.17	7.34	
Accidentes de transporte en vehículos con motor	30.66	3.41	4.02	1.88	0.07	0.35	0.17	0.07	59.37	
Adicciones	46.09	46.17	1.93	0.89	0.11	0.54	0.09	0.01	4.17	
Afección nosocomial	50.55	23.26	9.64	1.24	0.00	0.11	0.00	0.01	15.20	
Amebiasis intestinal	42.83	24.71	9.21	13.86	1.73	0.27	0.48	0.26	6.65	
Anencefalia	75.20	11.79	0.00	4.88	0.00	0.00	0.00	0.00	8.13	
Anorexia y bulimia	33.51	45.25	6.00	2.46	1.12	2.50	1.17	0.09	7.90	
Ascariasis	69.65	1.82	11.31	11.39	1.60	0.16	0.38	0.01	3.68	
Asma y estado asmático	42.56	28.17	12.47	1.90	1.15	0.79	0.75	0.20	12.00	
Boceo endémico	54.64	8.26	22.02	3.67	1.33	0.20	0.00	0.00	9.89	
Brucelosis	60.95	26.83	4.05	4.97	0.17	0.27	0.27	0.20	2.28	
Candidiasis urogenital	50.79	9.22	5.77	27.43	1.05	0.25	0.26	0.06	5.18	

Tomado de SUIVE/DGE/Secretaría de Salud/Estados Unidos Mexicanos 2015

2.3. Estructura del Genoma

El genoma de *E. histolytica* fue uno de los primeros en ser secuenciado. Los resultados fueron publicados en el 2005 (Loftus *et al.* 2005) para posteriormente reanotarse en el 2010. Los resultados de la reanotación revelaron un menor tamaño del genoma con respecto al ensamblaje publicado en el 2005. Sin embargo en ambos estudios no se logró una cobertura completa debido que éste parásito presenta una gran cantidad de regiones repetidas y además presenta aneuploidía (Lorenzi *et al.* 2010).

El genoma de *E. histolytica* tiene un tamaño de 20Mb el cual está distribuido en 1,496 scaffolds en donde se predijeron 8,201 genes codificantes de proteínas (Tabla 4). Mediante este análisis se identificaron 3,788 proteínas con funciones putativas (46% del proteoma) de las cuales se encontraron 897 familias de proteínas con más de cinco miembros, de ellas 58 familias no presentan homología con alguna de las proteínas ya conocidas por lo cual estas proteínas deben ser específicas de *E. Histolytica*. Los elementos de transposición corresponden al 20% del total del genoma, los cuales presentan una tendencia a insertarse cerca de otros transposones formando grandes agrupamientos de elementos transponibles (Loftus *et al.* 2005).

Además su genoma presenta duplicaciones de más de 16kb flanqueado por repetidos invertidos y gran abundancia de repetidos en tándem de arreglos que contienen RNAt. Sin embargo los resultados mostraron evidencia de secuencias subtelméricas pero no de secuencias teloméricas clásicas, ni la presencia de la enzima telomerasa (Loftus *et al.* 2005; Clark *et al.* 2007; Lorenzi *et al.* 2010).

Tabla 4. Comparación y Características del genoma de *E. histolytica* generado mediante diferentes ensamblajes de las secuencias de DNA.

Genoma	Primer ensamblaje 2005	Nuevo ensamblaje 2010
Tamaño (pb)	23361983	20799072
Contenido GC (%)	24.1	24.2
Número de genes	9985	8201
Longitud promedio genes (pb)	1170.9	1260.9
Número de genes/10 Kbp	4.3	3.9
Genes grandes (pb)	15 210	15 210
Genes pequeños (pb)	96	147
Porcentaje codificante (%)	50	49.7
Porcentaje de genes con intrones (%)	24.9	24.4
Exones		
Numero	13 176	10 754
Promedio de numero por gen	1.3	1.3

Contenido GC (%)	21.7	19.3
Longitud promedio (pb)	886.1	962
Longitud total (pb)	11 675 669	10 340 284
Intrones		
Número	3191	2553
Contenido GC (%)	21.7	19.3
Longitud Promedio (pb)	100	74.1
Longitud total	319 223	189 260
Regiones Intergenicas		
Contenido GC %	20	20.5
Longitud promedio	823.5	708.7

Tomado de Lorenzi *et al.* 2010

2.4. Cromosomas de *E. histolytica*

Debido a la condensación incompleta del genoma de *E. histolytica* no se ha logrado determinar el número exacto de cromosomas que posee. Sin embargo diferentes estudios han mostrado la presencia de cromosomas lineales con variaciones en su tamaño. Por medio de electroforesis de campos pulsados diversos grupos de investigación han tratado de definir su número, existiendo diferentes reportes donde proponen que existen de 6 a 16 cromosomas (Valdés *et al.* 1990; Tannich *et al.* 1999; Riverón *et al.* 2000) como se muestra en la figura 11. Willhoeft y colaboradores en el 2000 observaron a través de microscopía de fluorescencia de 30 a 50 cromosomas metafásicos en *E. histolytica* los cuales eran más delgados que los cromosomas de eucariotas superiores pero mantenían una estructura centromérica (Willhoeft *et al.* 2000) (figura 11D). Este hallazgo concuerda con los estudios donde se logró identificar agrupamientos intranucleares bien definidos usando anticuerpos anticentroméricos en *E. histolytica* (López-Robles *et al.* 2000). También a través de microscopía electrónica de barrido se ha podido observar la presencia de cromosomas lineales (Chávez-Munguía *et al.* 2006) (figura 11).

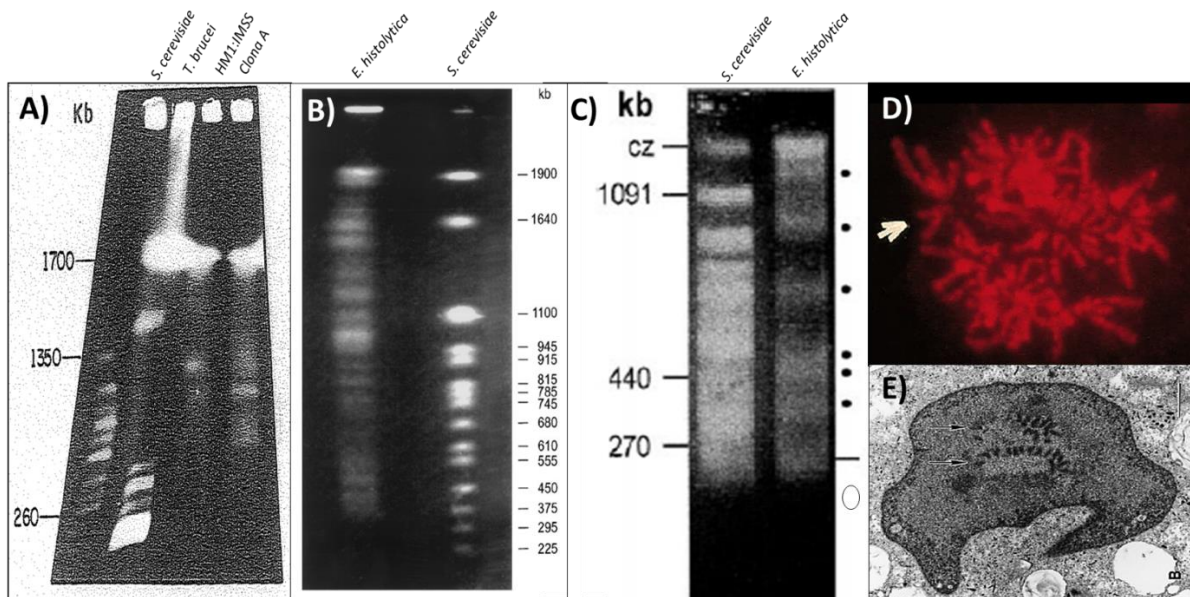


Figura 11. Cromosomas de *E. histolytica*. (A) Electroforesis de campos pulsados donde se muestran los cromosomas de *E. histolytica* propuestos por Valdés y col. 1990 (B) Tannich *et al.* 1999 (C); Riveron *et al.* 2000. (D) Microscopía de fluorescencia donde se observan cromosomas metafísicos propuestos por Willhoeft *et al.* 2000 y (E) Microscopía electrónica que muestra el arreglo cromosómico de *E. histolytica* propuesto por Chávez-Munguía *et al.* 2006.

La presencia de regiones o secuencias teloméricas ha sido una interrogante en este parásito. A este respecto Willhoeft U. y colaboradores en 1999 demostraron que existen diferencias en el extremo terminal de los cromosomas homólogos de *E. histolytica* y que esta diferencia en longitud en otros sistemas se ha explicado como el resultado de la variación en el número de repetidos en tándem teloméricos y subtelo-méricos (Tannich *et al.* 1999). Por lo tanto existe la posibilidad de que los repetidos de *E. histolytica* correspondan a secuencias teloméricas.

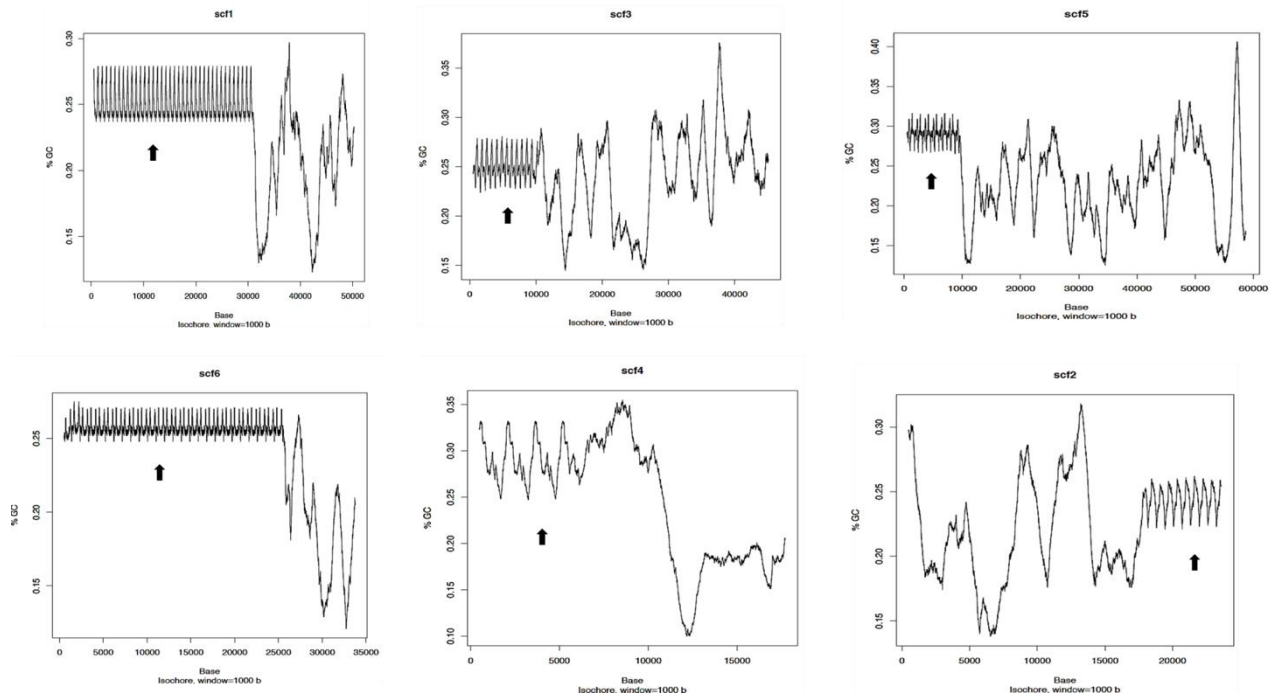


Figura 12. Análisis de isocoros de 6 diferentes scaffolds de los cromosomas *E. histolytica*. Los scaffolds presentan secuencias repetitivas y estos son ricos en GC las cuales son indicadas con una flecha.

Un análisis de isocoros de 6 diferentes scaffolds del genoma de *E. histolytica* mostró regiones repetidas, las cuales variaban dependiendo del scaffold analizado (Figura 12). En ellos se encuentran regiones repetidas tipo STR y además arreglos de genes que codifican para *tRNAs*. Debido a la presencia de estos repetidos se propone que los mismos podrían encontrarse en los extremos terminales de los cromosomas y podrían tener la función de telómeros (Clark *et al.* 2006; Tawari *et al.* 2008). Específicamente se ha encontrado que entre cada repetido de los genes de *tRNA* se encuentran 12 secuencias cortas diferentes y estas secuencias se repiten invariablemente (Figura 13), lo cual también ha hecho pensar que estos bloques de secuencias repetidas podrían funcionar como repetidos de secuencias teloméricas.

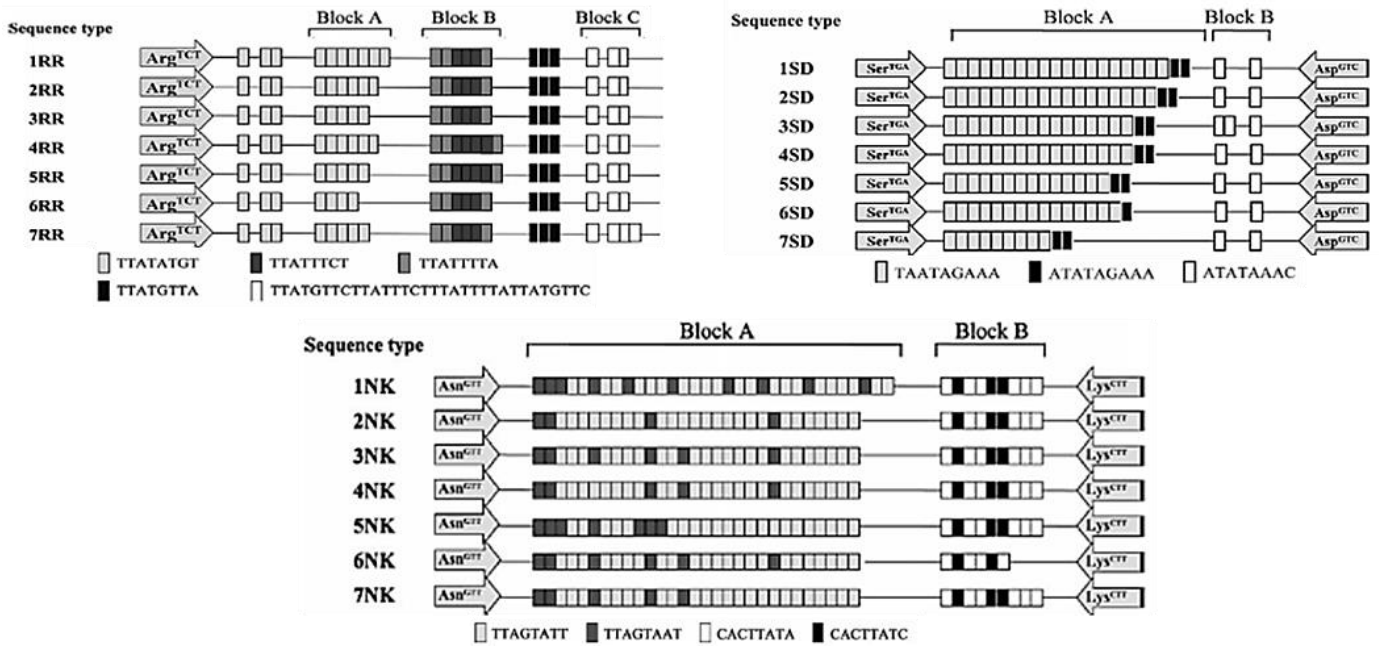


Figura 13. Organización de los arreglos de tRNAs en *E. histolytica*. Se muestran los diferentes arreglos de los genes de tRNA y de los bloques de STRs, los cuales son propuestos como telómeros de *E. histolytica*. Las flechas indican la posición de los genes de tRNAs con las tres letras del código del aminoácido, así como el triplete de bases del anticodón (Modificado de Tawari *et al.* 2008).

Otros organismos unicelulares por ejemplo *Giardia lamblia* presenta un arreglo telomérico interesante, ya que sus secuencias teloméricas se repiten de 5 a 49 veces y se encuentran flanqueados por genes que codifican para proteínas de superficie variantes específicas (VSP), rDNA o transposones tipo LINE-like los cuales se denominaron GiLM, GiLT (Tabla 5) (Arkhipova *et al.* 2001).

Tabla 5. Organización telomérica de *G. lambia*. Los repetidos teloméricos (TACCC) de *G. lambia* se encuentran flanqueados por elementos de unión (GiLM, GiLT, rDNA, VSP)

Clona	Elemento de unión	Repetidos teloméricos y nucleótidos para el inicio del elemento de unión
EJ1336/ej2414	GiLM 826	(tacc) ₅ tctcactgacgtattcacagagatggcgg
KJ4819/ki1170	GiLM 3374	(tacc) ₉ tactagcggaacggaccctgggctg
LJ0347	GiLM 94	(tacc) ₅₄ tacaggcccctactaggggactcccgatc
NF0311/ng2053	GiLM 5262	(tacc) ₁₈ tactctgtgcccgtgaccgcccgc
KJ1196	GiLT 5316	(tacc) ₂₇ tactctgcccagcatagtcttctctctccc
NJ1197	GiLT 1356	(tacc) ₂₅ tactctgtctgcccatacgatacaagag
HG1254	GiLT 783	(tacc) ₄ tacatgatcgggatacgagcggcaacccc
nj3761	GiLT 547	(tacc) ₄₇ tactccatccgcccactcctctggctgcc
KJ6036/ei1613	rDNA 5393	(tacc) ₈₁ tactytcycycstktggaattaccccggc
NJ2364 [†]	rDNA ←	(tacc) ₅₃ tcactttcgtttcggttggtccggcctcg
MJ3348/aj1354	VSP ←	(tacc) ₄₉ tactctggcgtatcagtatctgtagtagtg

Modificado de Arkhipova *et al.* 2001

En el caso de *Dictiostelium discoideum*, en los extremos de sus cromosomas presenta genes que codifican para RNAr, los que se ha propuesto que también podrían actuar como secuencias teloméricas (Song *et al.* 2005).

2.5. Familia de proteínas con dominio de unión a DNA MYB en *E. histolytica*

Los análisis filogenéticos hechos por Meneses y col. en el 2010 mostraron que las proteínas de unión al DNA con dominios MYB de *E. histolytica* se encontraban agrupadas en tres familias: la familia I EhMybR2R3, la familia II tipo Teloméricas y la familia III EhMybSHAQKYF. Las familias I y III están relacionadas con la actividad de factores de transcripción mientras que la familia II está relacionada con proteínas de unión a telómeros. La familia II consiste de cinco proteínas de unión tipo teloméricas, la que presenta un solo repetido DBD MYB y están codificadas en los *loci* EHI_009820, EHI_074810, EHI_148140, EHI_001090, EHI_001110 (Meneses *et al.* 2010).

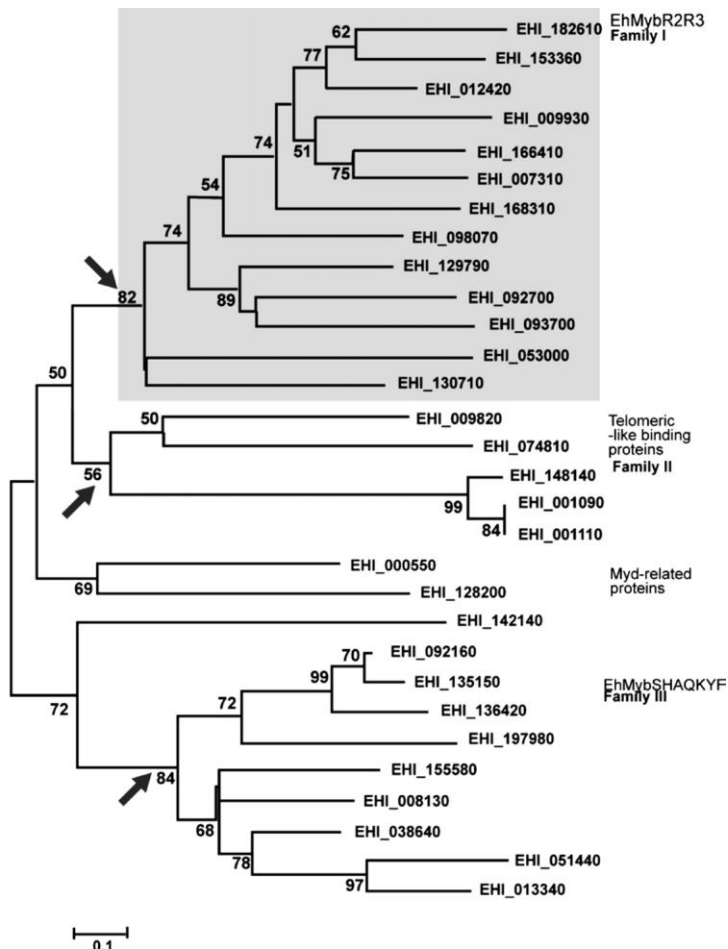


Figura 14. Familia de proteínas con dominio Myb-like en *Entamoeba histolytica*. Arbol filogenético donde se agrupan a las proteínas por familia con dominio Myb-like donde se encontró que la familia II presenta dominio Myb-like tipo telomérico (Meneses *et al.* 2010).

Las proteínas codificadas por estos genes presentan dominios de unión al ADN tipo MYB y son similares a las proteínas TRF de *H. sapiens*. Sin embargo, al realizar un alineamiento de los dominios Myb de estas proteínas con las de *Homo sapiens* se encontró que solamente las proteínas codificadas en los loci EHI_148140, EHI_001090, EHI_00111 conservan el motivo VDLKDKWRT (denominado TELEBOX) en la tercer α hélice de su DBD MYB. Estos aminoácidos están involucrados en el reconocimiento de la secuencia telomérica (Figura 15). A estas proteínas se les denominó EhTRF-like.



Figura 15. Alineamiento del dominio de unión al DNA de las proteínas TRFs de mamíferos con las proteínas EhTRF-like de *E. histolytica*. Las tres proteínas EhTRF-like conservan el dominio de unión al DNA tipo Myb, así como los aminoácidos que conforman al *Telebox*.

Las proteínas EhTRF-like presentan un porcentaje de identidad superior al 30% al compararlas con las proteínas TRF de vertebrados, lo que indica un alto grado de conservación entre estas dos especies (Tabla 6).

Tabla 6. Porcentaje de identidad entre el dominio de unión al ADN Myb entre las proteínas EhTRF-like de *E. histolytica* y las proteínas TRF de *H. sapiens*

<i>H. sapiens</i>	TRF-1	TRF-2
<i>E. histolytica</i>		
EhTRF-like I (EHI_001090)	35%	37%
EhTRF-like II (EHI_001110)	25%	33%
EhTRF-like III (EHI_148140)	25%	33%

Posteriormente, estudios *in silico* de interacción macromolecular de las proteínas EhTRF-like de *E. histolytica* mostraron que los aminoácidos de la tercer α hélice podrían formar enlaces con el DNA de una secuencia telomérica canónica

TTAGGG de *H. sapiens* intercalando la tercera hélice del dominio MYB en el surco mayor del DNA (Cárdenas Helios, Congreso de Bioquímica 2013) (Figura 16).

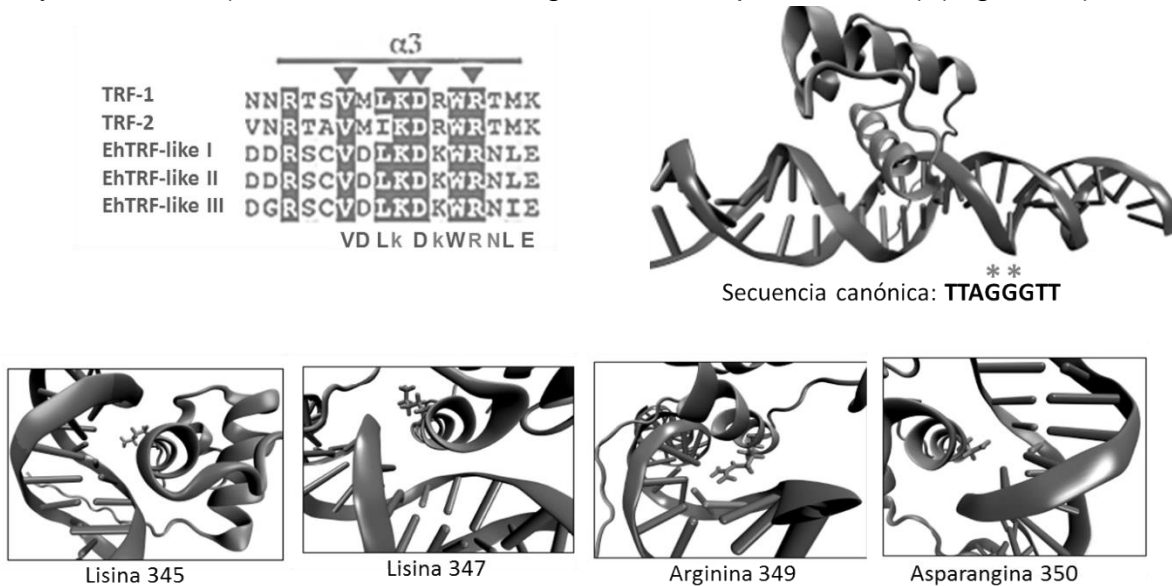


Figura 16. Interacción de las proteínas EhTRF-like con la secuencia canónica. A) alineamiento del *telebox*. B) *Docking* molecular el cual sugiere que las proteínas EhTRF-like podrían unirse al ADN intercalando la tercer α hélice del dominio MYB en el surco mayor de ADN de la secuencia telomérica clásica (TAAGGG). C) aminoácidos conservados los cuales podrían establecer interacciones con las bases de datos de la secuencia telomérica canónica (Cárdenas, Congreso de Bioquímica 2013).

Los genes que codifican para las proteínas EhTRF-like se amplificaron utilizando oligonucleotidos específicos a partir de DNA genómico (Figura 17A). Así mismo se determinó que estos genes se expresan en condiciones basales de cultivo siendo el gen que codifica para la proteína EhTRF-like III (locus EHI_148140) quien presenta mayor expresión (Cisneros M. Tesis de Maestría) como se observa en la figura 17B.

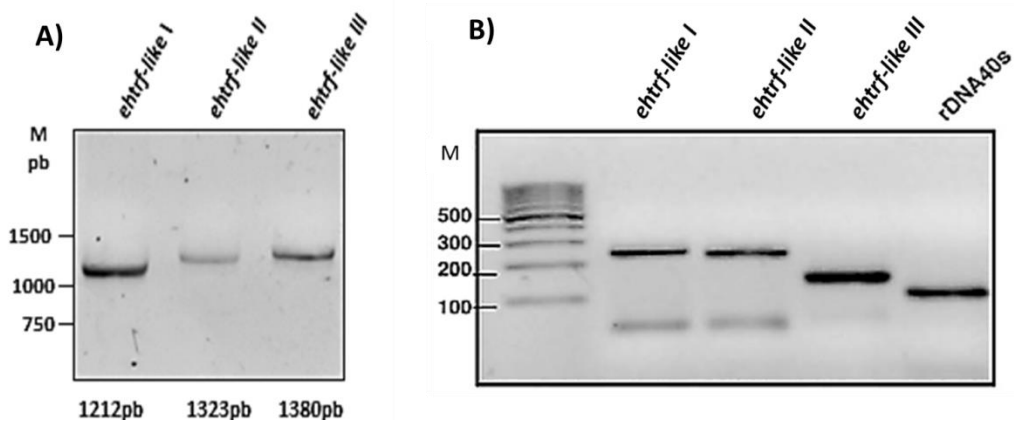


Figura 17. Expresión de los genes *ehtrf-like* en *E. histolytica*. A) Amplificación de los genes *ehtrf-like* a partir de ADN genómico. B) Expresión de los genes *ehtrf-like* en condiciones basales de cultivo en trofozoítos de *E. histolytica* (Cisneros M. Tesis de Maestría).

Todo lo anterior abre interrogantes acerca del papel que juegan las proteínas TRF-like en *E. histolytica*. El estudio de las mismas puede arrojar luz acerca de la biología de este parásito; así como los posibles mecanismos de respuesta que le han permitido su adaptación a los ambientes hostiles. Es por esto que es de fundamental importancia su estudio, lo que nos permitirá desarrollar estrategias para combatir a este protista.

3. JUSTIFICACION

En el genoma no se han encontrado evidencias de secuencias teloméricas clásicas ni de la presencia del gen que codifica para la enzima telomerasa. Sin embargo, estudios indican que *E. histolytica* presenta cromosomas lineales los cuales deben estar protegidos por maquinarias que eviten su acortamiento o daño. Es por ello que el estudio de las proteínas EhTRF-like nos permitirá comprender los mecanismos moleculares que podrían estar participando en la protección de los extremos terminales de los cromosomas, así como identificar las posibles secuencias teloméricas presentes en este organismo.

4. HIPÓTESIS

La proteína codificada en el *locus* EHI_148140 es una proteína TRF-like, por lo tanto se localiza en el núcleo y es capaz de unirse al DNA.

5. OBJETIVOS

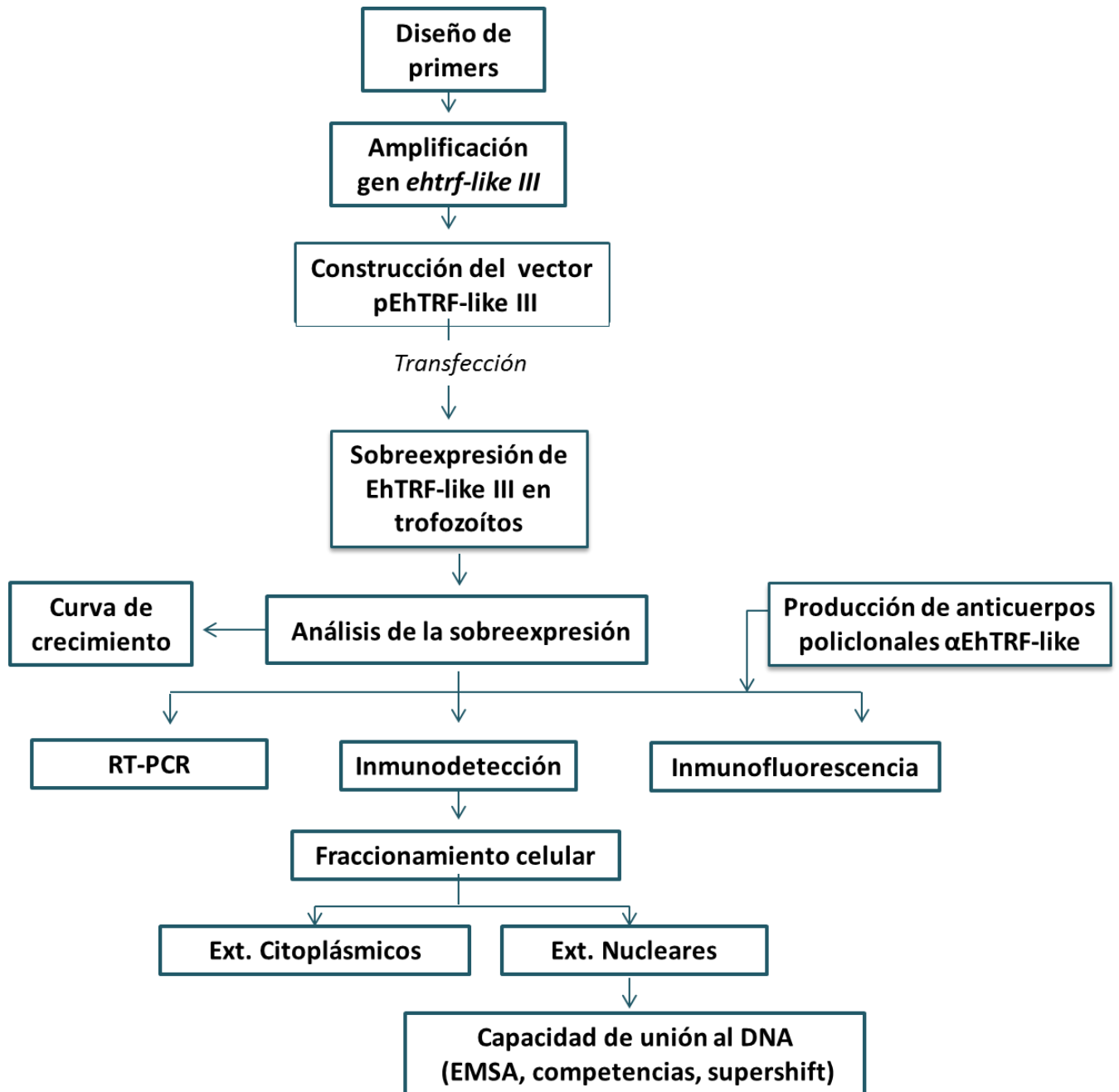
5.1. OBJETIVO GENERAL

Determinar la localización celular de la proteína EhTRF-like codificada en el *locus* EHI_148140, así como su capacidad de unirse al DNA.

5.2. OBJETIVOS PARTICULARES

- 1.- Sobre-expresar a la proteína EhTRF-like III en trofozoítos de *E. histolytica*.
- 2.- Determinar la localización celular de la proteína EhTRF-like III en trofozoítos de *E. histolytica*.
- 3.- Determinar la capacidad de unión de la proteína EhTRF-like III a secuencias de DNA.

6. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL



7. Materiales y métodos

7.1. Cultivo de trofozoítos de *E. histolytica*

Los trofozoítos de *E. histolytica* de la cepa HMI:IMSS Clona A, se cultivaron axenicamente a 37°C en tubos de 16 x 25 mm en medio BYI-S-33 (Diamond *et al.* 1978) suplementado con 3% de vitaminas Diamond (Sigma-Aldrich), penicilina 100 U/mL (Pengesod, Lakeside) y estreptomicina (100 µg/mL, SULFESTREP, Pisa) y 15% de suero bovino (Microlab) previamente inactivado por calor a 56°C durante 30 minutos. Para realizar los experimentos, se usaron trofozoítos en fase de crecimiento logarítmica, los cuales se incubaron en un baño de hielo durante 10 min y se cosecharon por centrifugación a 1500 rpm durante 5 min a 4°C.

7.2. Aislamiento de DNA genómico de *E. histolytica*

Se obtuvo el DNA genómico (DNAg) de trofozoítos de la cepa HMI: IMSS Clona-A, mediante el uso del kit Wizard Genomic DNA Purification (Promega). La extracción se llevó a cabo según las indicaciones del fabricante. Para ello 2×10^6 trofozoítos se lisaron con 600 µl de la solución I, posteriormente se trataron con 3 µl RNasa A e incubaron durante 30 min a 37°C. Las proteínas se precipitaron con 200 µl de la solución II, se mezclaron vigorosamente y se incubaron en hielo durante 5 min para posteriormente centrifugar a 14000 rpm durante 5 min. Se obtuvo el sobrenadante, el cual contiene el DNA genómico y se precipitó con 600 µl de isopropanol para finalmente centrifugar a 14000 rpm. La pastilla así obtenida se lavó con etanol al 70% y el DNAg se resuspendió en agua para rehidratarlo. El DNA obtenido se cuantificó en un NanoDrop Lite Spectrophotometer (Thermo Scientific), empleando la relación lineal entre la concentración del DNAs en solución y su A_{260nm} , tomando en cuenta que 1 unidad de A_{260nm} de DNAs corresponde a 50 µg, la concentración se determinó bajo la siguiente ecuación:

$$[\text{DNAs } \mu\text{g/ml}] = (A_{260nm}) (50) (\text{Factor de dilución del DNAg})$$

El DNAg cuantificado se llevó a una concentración de trabajo de 100 ng/µL.

7.3. Diseño de oligonucleótidos para la clonación del gen *ehtrf-like III*

Se diseñaron oligonucleótidos para amplificar la secuencia completa del gen *ehtrf-like III* (anotado en la base de datos de AmoebaDB como EHI_148140), el cual tiene un tamaño de 1383 pb, mediante el uso del programa OLIGO. Para lo cual se consideró que la longitud y el valor de temperaturas de alineamiento (T_m) de ambos oligonucleótidos fueran similares, que sus secuencias no favorecieran la hibridación entre sí, ni la formación de estructuras secundarias estables y además que fueran específicos, es decir, que no fueran complementarios a otras secuencias presentes en el genoma de *E. histolytica*. Adicionalmente, se le adicionaron los sitios de corte *SmaI* y *XhoI* los cuales son necesarios para la clonación en el vector pKT-3M. Los oligonucleótidos diseñados son *ehtrf-like III* Sentido (5'-TCCCCCCCGGGATGGAGAAAAACTAA-3') y el oligonucleótido *ehtrf-like III* Antisentido (5'-GGGGCCTCGAGTTAAAATTATCAGAATTA-3') donde en negritas se muestra la secuencia de reconocimiento de corte para las enzimas *SmaI* y *XhoI*, respectivamente.

La cuantificación de los oligonucleótidos se realizó por espectrometría, dada la relación lineal existente entre la concentración de los oligonucleótidos en solución y su A_{260nm} , tomando en cuenta que 1 unidad de A_{260nm} de oligonucleótidos de cadena sencilla corresponde a 33 μg , la concentración se determinó bajo la siguiente ecuación:

$$[\text{Oligonucleótidos } \mu\text{g/ml}] = (A_{260nm}) (33) (\text{Factor de dilución de los oligonucleótidos})$$

7.4. Amplificación del gen *ehtrf-like III*

Se usaron 100 ng de DNAG como molde para amplificar el gen *ehtrf-like III* utilizando 100 μM de los oligonucleótidos *ehtrf-like III* sentido y *ehtrf-like III* antisentido, para la reacción de amplificación se usó la enzima GoTag (Promega) de acuerdo a las condiciones de la tabla 7.

Tabla 7. Mezcla de reacción de amplificación

COMPONENTES	VOLUMEN	CONCENTRACION
GoTaq Buffer de reacción 5X	10 µL	1X (1.5nM MgCl ₂)
Mix PCR Nucleotidos 10 mM	1 µL	0.2M dNTP
Primer upstream	1 µL	0.1-1.0 µM
Primer downstream	1 µL	0.1-1.0 µM
GoTaq DNA polimerasa (5U/ µL)	0.25 µL	1.25U
DNA molde 100 ng	1 µL	<0.5µM/50µM
Agua libre de nucleasas	50 µL	

7.5. Clonación del gen *ehtrf-like III* en el vector de clonación pJET 1.2/blunt

Una vez obtenido el producto de PCR del gen *ehtrf-like III* se procedió a clonar en el vector de clonación pJET 1.2/blunt (Figura 18), para lo cual se preparó la reacción de clonación CloneJET PCR Cloning Kit (Thermo Fisher Scientific) de acuerdo con la tabla 8.

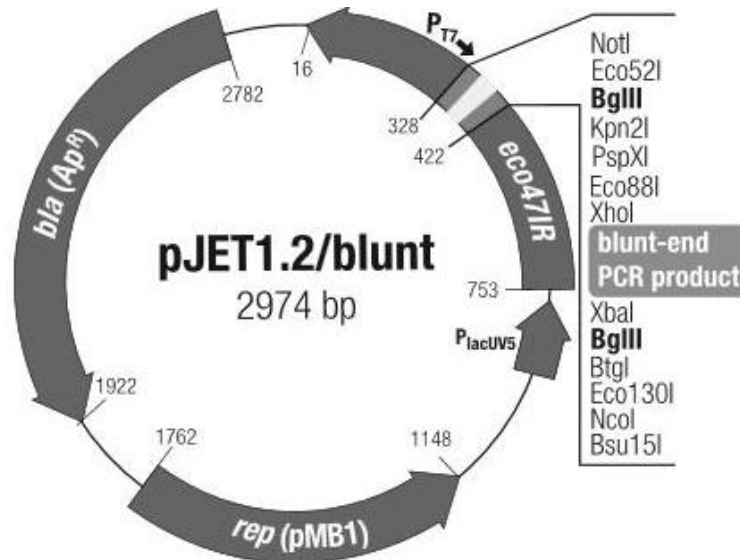


Figura 18. Estructura del vector pJET 1.2/blunt. Vector usado para la clonación del gen *ehtrf-like III* en donde se indican los sitios de restricción adyacentes al gen clonado. Tomado del kit de clonación Thermo Scientific CloneJET.

Tabla 8. Mezcla de reacción de ligación “Blunting”

COMPONENTES	VOLUMEN
Buffer de reacción 2X	10 μ l
Producto de PCR (24 ng/ μ l)	2 μ l
Agua libre de nucleasas	5 μ l
Enzima DNA Blunting	1 μ l
Volumen total	20 μ l

La mezcla se incubó a 70°C por 5 min, una vez transcurrido ese tiempo se colocó a 4°C y se agregó 1 μ L del vector pJET 1.2/blunt (50ng/ μ L) y 1 μ L de DNA T4 ligasa y se completo un volumen de 20 μ L. La mezcla fue incubada a temperatura ambiente durante 5 min. Transcurrido este tiempo la mezcla se usó para la transformación de las células *E. coli* DH5 α competentes.

7.6. Transformación de las células *E. coli* DH5 α

Para la transformación se agregó la mezcla de ligación a 200 μ L de células competentes *E. coli* DH5 α y los tubos se incubaron durante 30 min en hielo. A continuación las células fueron sometidas a un choque térmico de 42 °C durante 90 segundos. Inmediatamente se incubaron en hielo durante 2 minutos y se le adicionó a cada tubo 200 μ L de medio LB líquido estéril. El cultivo se dejó en agitación durante 45 min a 37 °C para permitir la recuperación de las células y la expresión del fenotipo resistente a ampicilina que se manifestó en las células que adquirieron el plásmido. Todo el cultivo se espatuló en placas con medio LB sólido suplementado con ampicilina 50 μ g/ml para seleccionar a las transformantes resistentes a penicilina y se incubaron toda la noche a 37°C.

7.7. Análisis de las clonas con el gen *EhTRF-like III* en el plásmido pJET 1.2/blunt mediante digestión con las enzimas de restricción *SmaI* y *XhoI*

Las clonas obtenidas de la transformación se crecieron en 1.5 ml de medio Luria con ampicilina (100 μ g/ml). Los plásmidos contenidos en las transfectantes se purificaron mediante el Kit QIAGEN Plasmid Mini (Qiagen) mediante el proceso que se describe a continuación. El pellet bacteriano se resuspendió en 250 μ L de

buffer P1 y se transfirió a un tubo de microcentrifuga, se le adicionó 250 μ L de buffer P2 y se mezcló por inversión de 4 a 6 veces. Posteriormente se agregó 350 μ L del buffer N3 y se centrifugó a 13000 rpm durante 10 min. El sobrenadante obtenido de la centrifugación se adicionó a la columna QIAprep y nuevamente se centrifugó de 30 a 60 seg. A esta columna se le adicionó 750 μ L del buffer PE y se centrifugó por 30–60 s. El medio de la columna QIAprep se transfirió a un tubo de microcentrifuga de 1.5 ml y el DNA se eluyó con 50 μ l de buffer EB.

Las preparaciones del plásmido pJET 1.2/blunt de las clonas transformadas se analizaron por restricción con las endonucleasas *Sma*//*Xho*I para determinar la presencia del gen *ehtrf-like III*. La reacción se preparó como sigue: se mezclaron 1 μ g de plásmido, 2 μ l del amortiguador de restricción 10X (New England Biolabs), 2 μ g de BSA y la reacción se completó a 20 μ l con agua bidestilada estéril. Los tubos se incubaron 2 horas a 25 °C para favorecer la reacción de la enzima *Sma*I (New England Biolabs) y posteriormente 3 horas más a 37°C para favorecer la reacción de la enzima *Xho*I (New England Biolab). Los productos de las reacciones de restricción fueron resueltos y analizados en geles de agarosa al 1% en TBE 1X para verificar la presencia y el tamaño del inserto. Se consideraron positivas aquellas clonas que liberaron el inserto que correspondió al tamaño del gen.

Se seleccionó una clona positiva la cual se creció en un pre-cultivo de 2 ml a partir de una colonia transformante en medio LB líquido con ampicilina 50 μ g/ml. Se tomaron 500 μ L de pre-cultivo y se inocularon en 100 ml de medio LB líquido con ampicilina y se incubaron a 37°C en agitación a 200 rpm toda la noche hasta saturación. Al día siguiente, se cosecharon las bacterias por centrifugación a 4°C durante 5 minutos a 7000 rpm. La lisis celular, la extracción y purificación del plásmido fue realizada mediante el uso del kit comercial QIAGEN Plasmid Midi Kit (Qiagen), según las instrucciones del fabricante. El plásmido purificado por este método se re-suspendió en 500 μ L de agua estéril y se almacenó a -20°C hasta su uso.

7.8. Cuantificación y secuenciación del plásmido pJET 1.2/blunt- *ehtrf-like III*

La cuantificación del plásmido purificado se realizó por espectrometría. Para esto se realizó una dilución del plásmido 1:500 en agua estéril y se midió su absorbancia a 260/280 nm (A_{260nm}). Ya que existe una relación lineal entre la $A_{260nm}/280nm$ y la concentración de DNA plasmídico (1 D.O= 50 μ g de plásmido)

en solución, la concentración del plásmido se estimó de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$[\text{DNA plasmídico } \mu\text{g/ml}] = (A_{260_{\text{nm}/280}})(50) \text{ (Factor de dilución del plásmido)}$$

7.9. Secuenciación del plásmido pJET 1.2/blunt-*ehtrf-like*

Para secuenciar el plásmido pJET 1.2/blunt-*ehtrf-like* que contiene al gen *ehtrf-like III* se preparó la mezcla de reacción de la siguiente forma: 500 ng de plásmido, 10 picomolar de oligonucleótido específico (*ehtrf-like III* Sentido y *ehtrf-like III* Antisentido) y 2 μl una mezcla del kit ABI Prism BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing (Applied Biosystem). La reacción se realizó en el secuenciador automático 31300 Genetic Analyzer (Applied Biosystem). Los resultados fueron generados y desplegados gráficamente por el programa Sequencing Versión 3.1 y posteriormente analizados.

7.10. Subclonación del gen *ehtrf-like III* en el vector pKT-3M

Para la subclonación y expresión del gen *ehtrf-like III* en los trofozoitos de *E. histolytica* se utilizó el vector pKT-3M que contiene el promotor del gen de la *cisteína sintasa* en el extremo 5' UTR y los sitios de restricción para las enzimas *SmaI* en el extremo 5' y *XhoI* en el extremo 3' para la ligación, además de un gen de resistencia a neomicina que nos permite seleccionar a las clonas que presentan este plásmido. Además contiene una etiqueta de tres repetidos del tag Myc (EQKLISEEDL), que es reconocido con un anticuerpo comercial. El mapa del plásmido se muestra en la figura 19 (Saito *et al.* 2004).

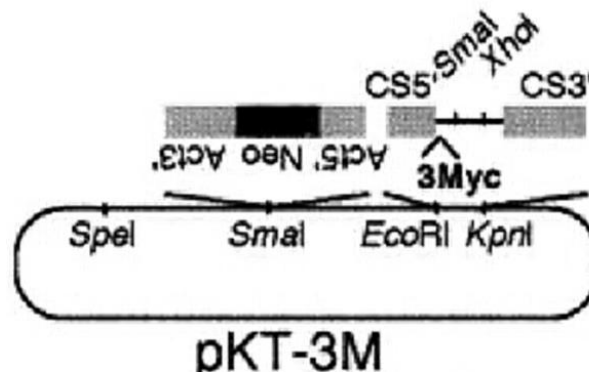


Figura 19. Estructura del vector pKT-3M. El vector usado para la expresión de la proteína EhTRF-like III fue el pKT-3M el cual contiene el promotor del cisteína sintasa en el extremo 5' UTR, sitios de restricción para clonación para las enzimas *SmaI* en el

extremo 5' y *XhoI* en el extremo 3' y una etiqueta de tres repetidos del tag Myc. Tomado de Y Saito *et al.* 2004.

Para realizar la subclonación, los plásmidos pJET 1.2/blunt- *ehtrf-like III* y vector pKT-3M se restringieron con las enzimas *SmaI* y *XhoI* para la liberación del inserto y para linearizar plásmido. Para la reacción de doble digestión del plásmido pJET 1.2/blunt y pKT-3M, se mezclaron 600 ng de cada plásmido, 5U de cada enzima *SmaI* y *XhoI*, 2 μ L de amortiguador de restricción No.2, 2 μ g de BSA y la reacción se llevó a 20 μ L con agua estéril. Las mezclas de reacción se incubaron durante toda la noche a 37°C.

Posteriormente, los productos de reacción se cargaron en geles de agarosa al 1% y se corrieron en presencia de TAE 1X a 100 V durante 30 min. Los geles fueron teñidos con Bromuro de Etidio y visualizados a través de un transiluminador de UV. Las bandas que correspondían al plásmido pKT-3M e inserto liberado del plásmido pJET 1.2/blunt digeridos se cortaron en gel y se purificaron con el kit Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega) siguiendo las indicaciones del fabricante.

El plásmido pKT-3M y el inserto que corresponde al gen *ehtrf-like III* digeridos y purificados fueron cuantificados en gel y por espectrometría, y se emplearon para hacer reacciones de ligación en una proporción 1:3 del vector/inserto. Como control interno, se preparó una reacción de ligación del plásmido pKT-3M digerido, pero sin inserto de acuerdo a la tabla 9. Las mezclas fueron incubadas durante toda la noche a 16 °C. Los productos de reacciones de ligación fueron empleados para transformar células *E. coli* DH5 α competentes como se describió anteriormente.

Tabla 9. Mezcla de reacción de ligación

COMPONENTES	VOLUMEN
Buffer de reacción 5X (Invitrogen)	10 μ L
inserto	3 μ L
Plasmido	1 μ L
Enzima ligasa	1 μ L
H2O csp	20 μ L

7.11. Análisis del plásmido pKT-3M que contiene al gen *ehtrf-like III* mediante digestión con las enzimas de restricción *SmaI* y *XhoI*

Los plásmidos obtenidos se analizaron por restricción con las endonucleasas *SmaI/XhoI* para determinar la presencia del gen *ehtrf-like III* en el plásmido pKT-3M. Para ello, en tubos Eppendorf de 1.5 µL se añadieron 1 µg de plásmido de cada una de las candidatas, 2 µL del amortiguador 2 de restricción 10X (New England), 10 µg de BSA y la reacción se llevó a 20 µl con agua bidestilada estéril. Los tubos se incubaron 1 hora a 25 °C para favorecer la reacción de la enzima *SmaI* y posteriormente 1 hora más a 37°C para favorecer la reacción de la enzima *XhoI*. Los productos de las reacciones de restricción fueron resueltos y analizados en geles de agarosa al 1% en TBE 1X para verificar la presencia y el tamaño del inserto. Se consideraron positivas aquellas clonas que liberaron el inserto que correspondía al tamaño del gen.

7.12. Purificación del plásmido pKT-3M y el pKT-3Mehtrf-like III para la transfección.

La purificación de los plásmidos se realizó empleando el kit de Plasmid Maxi kit (Qiagen). Con este kit se obtiene una mayor cantidad de DNA plasmídico libre de endonucleasas con la calidad que se requiere en ensayos funcionales de transfección. El protocolo de purificación de plásmidos se basa en el método modificado de lisis alcalina y la posterior unión del plásmido a una resina de intercambio de aniones, en condiciones específicas de pH y baja concentración de sales. Las proteínas, el RNA y otras impurezas de bajo peso molecular se eliminan mediante lavados moderadamente salinos. Finalmente, el DNA es eluído en un tampón altamente salino y, posteriormente, precipitado con isopropanol para concentrarlo y eliminar las sales. Se picó una colonia aislada y se inoculó un cultivo de 2-5 ml de LB con ampicilina, este se incubó durante 12 h a 37°C a 250 rpm. Posteriormente se diluyó el cultivo inicial 1:1000 en 500 ml de LB ampicilina y se incubó a 37°C durante 16 horas a 250 rpm.

Se cosechó el cultivo y se centrifugó durante 15 minutos a 5000 rpm durante 15 minutos y se decantó el sobrenadante. Posteriormente, se resuspendieron las células bacterianas en 10 ml del buffer P1 de lisis hasta que la solución fue homogénea. Posteriormente, se añadió 10 ml de buffer NP2, y se mezcló. Se incubó a temperatura ambiente durante 5 minutos. Después, se añadió 10 ml de buffer P3 y se incubó en hielo durante 20 minutos. Se centrifugó a 9000 rpm

durante 30 minutos a 4°C y se recuperó el sobrenadante. Se equilibró una columna con 10 ml de buffer QBT y una vez que se vació, se aplicó el sobrenadante. Se lavó dos veces la columna con 30 ml de buffer QC. Se eluyó el DNA con 15 ml de buffer QF y se precipitó el DNA añadiendo 0.7 volúmenes de isopropanol (19,5 ml) a temperatura ambiente. Se mezcló por inversión y centrifugó durante 1 hora a 9000 rpm a 4°C. Se decantó el sobrenadante, se lavó el precipitado de DNA con 5 ml de etanol al 70%, se centrifugó a 9000 rpm durante 30 minutos. Se decantó el sobrenadante y se secó el precipitado a temperatura ambiente para finalmente disolverlo en 500 µL de dH₂O. El DNA plasmídico se cuantificó por espectrofotometría y se comprobó la calidad mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1%.

7.13. Transfección de los trofozoítos y formación de los grupos pKT-3M, pTRF-likeIIlox

Los plásmidos purificados se emplearon para transfectar a los trofozoítos de *E. histolytica*. La transfección se realizó a partir de un cultivo con el 80 a 90% de confluencia. Se sembró una caja de 6 pozos con 600,000 trofozoítos por pozo. Se adicionó 5 ml de medio BYI-S-33 tibio por pozo y se incubó a 37 °C en atmosfera con 5% de CO₂ durante 30 min. Durante los 30 min de incubación, se realizó la mezcla de transfección en tubos eppendorf mezclando 100 µL de medio M199 (Sigma Aldrich), 20 µL de superfect (Incubado a temperatura ambiente por 10 min) y 20 µg del plásmido con el inserto *ehtrf-like III* o plásmido vacío. Al grupo de los trofozoítos transfectados con el plásmido vacío se les dio el nombre pKT-3M y al grupo de los trofozoítos transfectados con el plásmido con el inserto *ehtrf-like III* se les dio el nombre pTRF-likeIIlox y se incluyó el grupo Mock el cual no fue transfectado. Transcurrido el tiempo de incubación se retiró el medio BYI-S-33 de la placa de 6 pozos se agregó la mezcla y se incubaron a 37°C durante 4 horas. Al terminar este tiempo los trofozoítos, se transfirieron a tubos con medio BYI-S-33 y se incubaron a 37°C durante 24 horas. Transcurrido este tiempo se inició con la selección con el antibiótico G-418 a una concentración de 1µg/ml, la concentración se incrementó conforme los tubos alcanzaron una confluencia de 80% hasta llegar a 20 µg.

7.14. Extracción y cuantificación del RNA total de los trofozoítos transfectados

La extracción del RNA total se realizó utilizando el reactivo comercial TriZOL (Invitrogen), para ello 3×10^6 trofozoítos de los grupos PKT-3M y pTRF-likeIIlox se crecieron en presencia de 5 y 10 μg de G-418 se cosecharon y resuspendieron en 1 mL de TriZOL. Posteriormente, se incubaron a temperatura ambiente por 15 min. Al cabo de ese tiempo se agregaron 200 μl de cloroformo, se agitó vigorosamente durante 15 seg y se incubaron durante 3 min a temperatura ambiente. Las muestras se centrifugaron a 10,000 rpm por 15 min a 4°C. La fase acuosa se transfirió a un tubo eppendorf y se añadió 0.5 ml de isopropanol al 100%, se agitó e incubó por 10 min a temperatura ambiente, se centrifugó a 12,000 rpm por 10 min a 4°C. La pastilla obtenida fue lavada con 1 ml de etanol al 75% y centrifugada a 7500 rpm por 5 min a 4°C. Consecutivamente se decantó el sobrenadante y se dejó secar a temperatura ambiente. El RNA obtenido se hidrató con 100 μl de agua libre de nucleasas en un termoblock a 37°C y se cuantificó por espectrofotometría. El RNA así obtenido se trató con DNasa (Promega) en una relación de 2U por cada 10 μg de RNA durante 30 minutos a 37°C. Posterior, al tratamiento con DNasa, se agregó fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (Sigma-Aldrich) en un volumen 1:1, se agitó durante 15 segundos y se centrifugó a 12,000 g durante 15 minutos a 4°C. Se recuperó la fase acuosa transfiriéndola a otro tubo estimando el volumen obtenido y se agregó acetato de amonio 0.5 M en base a la siguiente relación:

Vol. Acetato de amonio= (volumen estimado/6.5)

Posteriormente, se agregó isopropanol en una relación 1:1, se incubó en hielo por 10 min, pasado este tiempo se centrifugó por 14,000 rpm por 20 min, se decantó y lavó la pastilla con 200 μL de etanol al 75%, se dejó secar a 37°C y se agregó 100 μL de agua libre de nucleasas. Se agregó acetato de amonio en base a la relación anteriormente citada y del total del volumen obtenido se agregó etanol absoluto en una relación 3:1, para precipitar el ARN, el cual se almacenó a -70°C para su uso posterior.

La cuantificación y determinación de la calidad del RNA total extraído se realizó de manera estándar por espectrometría. Debido a que el RNA cuando esta puro presenta una relación lineal entre concentración y absorbancia a 260 nm ($A_{260\text{nm}}$), su concentración se determinó midiendo su A_{260} en solución. Dado que una unidad

A_{260} de RNA de cadena sencilla corresponde a 44ug/ml, la concentración del RNA problema se estimó de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$[\text{RNA } \mu\text{g/ml}] = (A_{260}) (44) (\text{Factor de dilución del RNA en agua})$$

La pureza del RNA en solución también se determinó midiendo la relación de absorbancia a 260 y 280 nm (A_{260}/A_{280}), si esta es mayor que 2, entonces se considera puro. Un valor de A_{260}/A_{280} entre 1.8-2 indica la presencia de DNA y un valor menor a 1.7 significa contaminación con proteínas y fenol.

Así mismo, la calidad del RNA total extraído se determinó mediante la observación del patrón de corrimiento electroforético de las moléculas en geles de agarosa al 1% con amortiguador TBE 1X. El gel se corrió a 120 V durante 20 minutos y se tiñó con Bromuro de Etidio y fue visualizado en un transiluminador de rayos UV.

7.15. Reacción de retrotranscripción

La reacción de RT-PCR se realizó utilizando 500 ng de RNA total, 0.5 mg de oligo dT, 5 mM de DTT, 1 mM de dNTPs, 5 mM de MgCl₂ y 1 U de la enzima Improm-II (Promega). Las condiciones de reacción fueron las siguientes: 5 min a temperatura ambiente (alineamiento), 1 h a 42° C (Extensión) y 15 min a 70 C ° (Inactivación). El cDNA obtenido se utilizó como templado para la amplificación del gen *ehtrf-like III* y como control se usó el gen Rib40s. Para amplificar un fragmento interno del gen de 145 pb en las reacciones de PCR se utilizaron los oligonucleótidos que se muestran en la tabla 10.

Tabla 10. Oligonucleótidos usados para el análisis de la expresión del gen *ehtrf-like III*

Nombre del Oligonucleótido	Longitud (pb)	Secuencia
<i>ehtrf-like III</i> Sentido	27	5'-ATGAGAGAAAAAACTAAAAAAG-3'
<i>ehtrf-like III</i> Antisentido	29	5'-GATTATCATACAAATTAATTTTCG-3'
<i>Rib 40s</i>	21	5'-ATTCGGAAATAGAAGAGGAGG-3'
<i>Rib 40as</i>	20	5'-ACTAATCTTCCAAGCTTGGT -3'

Como control RT (-) se realizó la reacción de PCR del ARN total sin tratar con retrotranscriptasa.

Reacción en Cadena de la Polimerasa.

Se utilizó 1 μ L del cDNA como templado, para cada una de las reacciones de PCR. Para la mezcla de reacción se utilizaron las siguientes concentraciones finales de cada reactivo: 0.5 mM de cada oligonucleótido, 0.2 mM de dNTPs, 2.5 mM de $MgCl_2$ y 1U de la enzima GoTaq DNA polymerase (Promega) de acuerdo a la Tabla 10.

Tabla 11. Mezcla de reacción de PCR

COMPONENTES	VOLUMEN
5x Green Buffer --- 1x	5 μ L
$MgCl_2$ ---2.5Mm	2.5 μ L
DNTPs	0.5 μ L
Go Taq	0.125 μ L
Oligo S	1 μ L
Oligo AS	1 μ L
ARN	1 μ L
Agua	13.8 μ L
Vol. Reacción	25 μ L

7.16. Evaluación de la expresión génica de *ehtrf-like III* mediante qRT-PCR de los trofozoítos transfectados

También se evaluó la expresión génica de *ehtrf-like III* mediante qRT-PCR utilizando la tecnología Applied Biosystems 7300 Real-Time PCR System. La amplificación fue realizada en placas de 96 pozos. Se tomaron 100 ng de ARN extraído de los grupos pKT-3M y pTRF-likeIIIox sometidos a la presión de 5, 10 y 20 μ g de antibiótico G-418, la reacción se llevó a cabo en un solo paso de acuerdo al protocolo “QuantiFast SYBR Green RT-PCR Kit (Qiagen)”.

Los resultados se normalizaron con el gen de expresión constante para asegurar que las variaciones observadas en la expresión, fueron realmente debidas a cambios de expresión y no a una cantidad variable de muestra añadida entre los ensayos. Se usaron los mismos oligonucleótidos utilizados para RT-PCR semicuantitativa. Para el cálculo de $\Delta\Delta Ct$ se usó la siguiente formula:

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct (\text{Gen interés tratado-Gen referencia tratado}) - \Delta Ct (\text{Gen interés control-Gen referencia control})$$
$$\text{Fold change} = 2^{\Delta\Delta Ct}$$

7.17. Diseño de un péptido diferencial de la proteína EhTRF-like III

La Base de Datos AmoebaDB (<http://amoebadb.org/amoeba/>) se utilizó para obtener la secuencia de aminoácidos de las proteínas EhTRF-like. La secuencia de aminoácidos se alinearon utilizando la herramienta clustalw2 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>) para regiones diferenciales de las tres proteínas. Posteriormente, se analizó la secuencia de aminoácidos de la proteína EhTRF III utilizando el programa **Hopp-Woods** para determinar sus regiones hidrofóbicas. Finalmente se hizo una predicción de epítomos B utilizando el servidor ABCpred (<http://crdd.osdd.net/raghava/abcpred/>). A partir de los análisis realizados se seleccionó el péptido diferencial (CNKQKVQPQVSQPH- KLH). El cual se mandó sintetizó acoplado a KLH con la empresa GL Biochem.

7.18. Producción de anticuerpos policlonales contra la proteína EhTRF-like III

El péptido diferencial para la proteína EhTRF-like III (CNKQKVQPQVSQPH-KLH) acoplado a KLH se usó para inmunizar un conejo macho Nueva Zelanda de 2 kg de peso. Primeramente, se sangró a través de la vena de la oreja para obtener el suero preinmune. Posteriormente, se inmunizó con 500 μg del péptido diluido en 150 μL de DMSO, 15 días por 5 ocasiones; en todas las inmunizaciones se le administro adyuvante TiterMax volumen:volumen vía subcutánea (Figura 20). Transcurrido las 5 inmunizaciones, se obtuvo la sangre y se centrifugo para obtener el suero y se almacenó a -20°C . El suero se tituló mediante ensayos de Western blot para determinar la dilución de reconocimiento de la proteína EhTRF-like III en extractos totales de trofozoítos de *E. histolytica*.

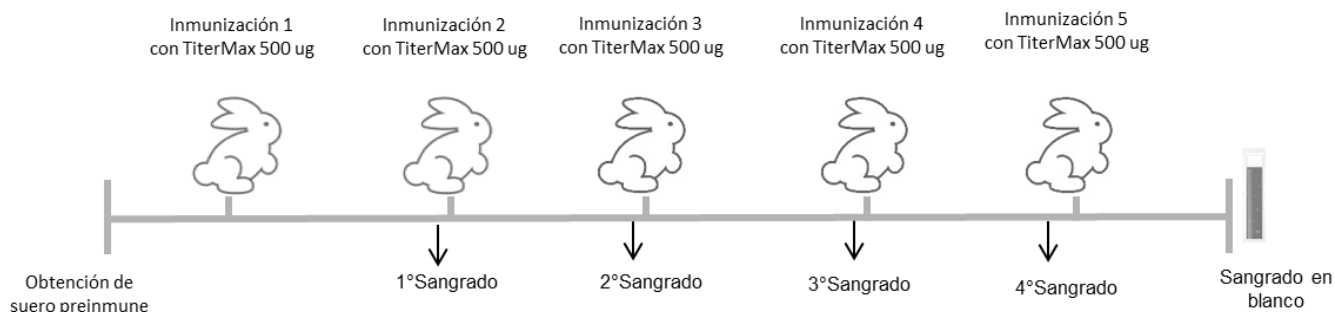


Figura 20. Esquema de inmunización del conejo donde se muestran el número de inmunizaciones, días de sangrado y cantidad de adyuvante usado para la obtención del anticuerpo policlonal EhTRF-like III.

7.19. Titulación de anticuerpos

Para estimar la reactividad y concentración específica del anticuerpo EhTRF-like III en el suero inmune, se evaluó por SDS-PAGE al 10% con extractos de proteínas totales precipitadas con TCA al 10% de las clonas EhTRF-like IIlox y pK-3M. Posteriormente, las proteínas resueltas fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa e incubadas con suero preinmune a las diluciones de 1:2500, 1:5000 del primer sangrado, 1:2500, 1:100 del segundo sangrado, 1:2500, 1:5000 del tercer sangrado, 1:2500 del cuarto sangrado y del quinto sangrado 1:2500 del quinto sangrado en PBS1x-Tween 0.05% leche durante toda la noche a 4°C. A continuación las membranas se lavaron con PBS-Tween 20 en leche al 0.05% y se les adicionó el anticuerpo secundario (anti-IgG de conejo) diluido en una solución de PBS 1X y leche descremada al 1.5% por 2 horas a temperatura ambiente con agitación. Las membranas se lavaron tres veces con PBS-Tween 20 en leche al 0.05% y se visualizaron en el ChemiDoc MP de BIO-RAD. El anticuerpo obtenido se almacenó a -20 °C.

7.20. Obtención de extractos totales de trofozoítos de *E. histolytica*

Para la obtención de extractos totales se utilizó TCA (ácido tricloroacético) al 10% en PBS pH 6.8. Los parásitos en fase logarítmica de crecimiento se lavaron tres veces con PBS pH 7.0 frío, se resuspendieron 1×10^6 parásitos en 0.9 ml de PBS pH 6.8 frío y se añadió 0.1 ml de TCA al 100%, se mezcló bien y se incubaron 18 h a 4°C. Posteriormente, la muestra se centrifugó a 12,000 \times g por 3 min a 4 °C y

la pastilla se lavó cinco veces con PBS pH 6.8 frío, centrifugando a 12,000 ×g por 5 min a 4°C. Las paredes del tubo se secaron con un hisopo estéril entre cada lavado. La pastilla se resuspendió en 400 µl de amortiguador de muestra 1× (BM 1×) con 5% de β-mercaptoetanol y se hirvió durante 5 min, se centrifugó a 12,000 ×g por 3 min y se cargaron de 10 µL de la muestra en minigeles preparativos de poli(acrilamida) al 12%. Las proteínas separadas se transfirieron a membranas de nitrocelulosa (NC) de 0.2 µm (BIO-RAD®).

7.21. Fraccionamiento subcelular: obtención de extractos nucleares y citoplásmicos

Para obtener las proteínas citoplasmáticas y nucleares de *E. histolytica* se utilizó el protocolo descrito por Schreiber et al. 1989. Para ello 3×10^6 trofozoítos que se encontraban en fase de crecimiento logarítmica, se cosecharon por centrifugación a 2000 rpm durante 5 min a 4°C. La pastilla se lavó dos veces con PBS 1X pH 6.8. Las pastillas de células se resuspendieron en 400 ml de buffer A (Hepes 1M pH 7.9, KCl 1M, EDTA 0.5M, EGTA 100mM, DTT 1M, PMSF 200mM, Complet 50x) y se incubó en hielo por 15 min. Durante ese tiempo se observaron las células bajo el microscopio para verificar que se mantuvieran turgentes. Pasado ese tiempo se añadió 25µl de NP-40 al 10% y se agitó vigorosamente mediante vortex. Se verificó nuevamente que las células estuvieran rotas y se centrifugaron a 14,000 rpm durante 10 min. El sobrenadante así obtenido corresponde a la fracción citoplásmica, la cual se almacenó a -70 C hasta su uso. La pastilla que corresponde a los núcleos se resuspendió en el mismo volumen de buffer A y se colocó sobre un colchón de sacarosa 0.3 M y se centrifugó 10 min a 14,000 rpm el sobrenadante se descartó y la pastilla de núcleos se resuspendió en 50µl de buffer C (Hepes 1M pH 7.9, NaCl 1M, EDTA 0.5M, EGTA 100mM, DTT 1M, PMSF 200mM, Complet 50x). Para extraer las proteínas nucleares, los núcleos se agitaron energéticamente en el vortex a 4 °C durante 15 min. Finalmente, se centrifugaron durante 5 min a 4°C y los sobrenadantes que corresponden a las proteínas nucleares, se alicuotaron en tubos eppendorf, almacenado a -70 °C. Se tomó una alícuota de cada fracción para cuantificar por el método de Bradford y analizar su integridad por SDS-PAGE.

7.22. Cuantificación de las proteínas

Para determinar la concentración de las proteínas extraídas se utilizó el método de Bradford el cual consiste en la cuantificación de la unión del colorante, el Azul de Coomassie G-250 unido a la proteína, donde la cantidad de colorante unido es proporcional a la concentración de la proteína, para ello se realizó una curva de calibración utilizando proteína Albúmina de Suero Bovino (Bovine Serum Albumin) Y se interpretó la absorbancia de nuestra proteína en ella.

Tabla 12. Curva de BSA 0-1200 ng/ μ L usada para determinar la concentración de proteínas

Concentración (ng/ μ L)	0	150	300	450	600	750	900	1050
Reactivo								
BSA (1200 ng/μL)	0	12.5	25	37.5	50	62.5	75	87.5
H₂O (μL)	100	87.5	75	62.5	50	37.5	25	12.5
Vol. Final (μL)	100	100	100	100	100	100	100	100

En una placa de 96 pozos, se adicionaron 200 μ L de la solución diluida de Bradford a cada pozo. Los puntos de la curva y de las muestras se hicieron por triplicado. Se adicionaron 10 μ L de cada punto de la curva o de la muestra al pozo correspondiente (Tabla 12) y se incubó a temperatura ambiente por 5 minutos.

La cuantificación se realizó midiendo la absorbancia en un espectrofotómetro, a 595 nm y graficando la absorbancia vs la concentración de proteínas.

7.23. Ensayos de Inmunodetección para determinar la sobreexpresión y localización de la proteína EhTRF-like III

Las proteínas extraídas de las células transfectadas con las construcciones pKT3M y pTRF-like IIIox se separaron por electroforesis en geles SDS-PAGE. Posteriormente, las proteínas separadas se transfirieron a membranas de nitrocelulosa que posteriormente se bloquearon con 5% de leche descremada en PBS 1X toda la noche. A continuación se le agregó el anticuerpo primario diluido (anti-myc y/o anti-EhTRF-like III) en una disolución que contiene 1.5% de leche

descremada en PBS 1X por 2 h a temperatura ambiente. Después las membranas se lavaron con PBS-Tween 20 al 0.05% y se les adicionó el anticuerpo secundario (anti-IgG de conejo) diluido en una solución de PBS 7.4 1X y leche descremada al 1.5% por 1 hora a temperatura ambiente con agitación. Las membranas se lavaron tres veces con PBS-Tween 20 al 0.05% y se visualizaron en el ChemiDoc MP de BIO-RAD.

7.24. Stripping de membranas Western blot

Para la remoción de los anticuerpos primarios se preparó la solución de Stripping para 0.1 L (SDS 10%, Tris HCl 0.5M pH 6.8, 0.8 ml de β -mercaptoetanol, 67.5 ml H₂O). La disolución anterior fue atemperada a 50°C y se colocó en un pequeño recipiente con tapa. La membrana se colocó dentro de este recipiente y se incubó a 50°C por 45 min con agitación gentil. Finalmente se lavó vigorosamente por 5 min con PBS 7.4 y de esta manera la membrana se logró volver a bloquear para su posterior incubación con un nuevo anticuerpo primario. La eficacia del Stripping fue revisada al incubar la membrana con un reactivo de detección quimioluminisciente.

7.25. Ensayos de inmunofluorescencia para la detección de la proteína EhTRF-like III

Para determinar la localización de la proteína EhTRF-like III los trofozoítos se centrifugaron a 2000 rpm durante 5 min a 4 °C y se adiciono la cantidad de 1×10^6 trofozoítos a los pozos de una placa de Corning, dentro de los cuales previamente se colocarán cubreobjetos estériles. Enseguida, se les retiro el medio y las muestras se fijaron con paraformaldehído (PFA) al 4% en PBS pH 7.4 a 37°C, durante 45 min y se lavaron con PBS. Posteriormente, las células se permeabilizaron con Tritón X-100. Cada pozo se lavó nuevamente con PBS, las preparaciones se bloquearon con una disolución de BSA al 1% a 37 °C durante 40 minutos. Una vez bloqueadas, las células se incubaron a 37 °C por 1 h o a 4°C ON con el anticuerpo policlonal primario anti-EhTRF-like III obtenido y también con el anticuerpo comercial anti-myc, usando una dilución 1:200. Como anticuerpo secundario se utilizará anti-IgG de conejo acoplado a fluoresceína TRITC (Zymed) en una dilución 1:100; este se incubó por 30 min a temperatura ambiente. Después, las células se lavaron con PBS e incubadas con una solución de DAPI (10 μ g/ml) por cinco minutos, y por ultimo otro con agua estéril. Después del último lavado, los cubreobjetos con las células se montaron en un portaobjetos con Vectashield al 50%. El control negativo consistió de trofozoítos incubados con el suero preimmune. La fluorescencia de los planos ópticos seriales de los trofozoítos

se observaron en un microscopio confocal Leica (SP2) del laboratorio de microscopía del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN y se analizó usando el programa Image J (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>).

7.26. Ensayos de unión a DNA con extractos nucleares de los trofozoítos que sobre expresan a la proteína EhTRF-like III

A) Hibridación de los oligonucleótidos

Para hibridar los oligonucleótidos 1 µg de cada una de los oligonucleótidos sentido y antisentido se colocaron en un tubo con buffer TM (50 mM Tris-HCl, 2.5 mM MgCl₂ pH 7.0) (Tabla 13). Los tubos se calentaron a 85 °C durante 5 min y se dejaron enfriar hasta alcanzar la temperatura ambiente. Una vez que se alcanzó la temperatura ambiente estos se guardaron a -20 °C hasta su uso.

Tabla 13. Sondas diseñadas para el análisis de la capacidad de unión de la proteína EhTRF-like III

SONDA	SECUENCIA
HuTRF	S:5'GCTCTAGATGTTAGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGG3' AS: 5'AATCCCAATCCCAATCCCAATCCCGAGATCTAC3'
EhTRF	S:5'GCTCTAGATGTTTAGTATTTTAGTATTTTAGTATTTTAGTATT3' AS: 5'AATCATAAAATCATAAAATCATAAAATCATAACGAGATCTAC3
No Tel	S:5'GCTCTAGATGTGGGTAGCTAGCTCTGACTCAGG3' AS:5'ACCCGATCGATCGAGACTGAGTCCCGAGATCTAC3'
No Relacionada	S:5'GCTCTAGATGTCGAGTCTGTGTGTACATTACGTGTG3' AS:5'AGCTGAGACACACATGTAATGCACACCGAGATCTAC3'

B) Marcaje con α -³²P[dATP]de las sondas

100 ng de los oligonucleótidos así hibridados se marcaron empleando 1 µl de la enzima Klenow (Klenow Fragment (3'→5' exo-) (New England Biolabs) en el buffer 2 y se agregaron una mezcla de dNTPs los cuales no contenían dATP. Finalmente se agregó 1 µl de dATP[α -³²P](120 Ci/mmol) (Perkin Elmer). Estos experimentos se realizaron en el laboratorio del Dr. Jesús Valdés Flores en el Departamento de Bioquímica del Cinvestav-IPN.

c) Ensayos de retardamiento de movilidad electroforética (EMSA)

Extractos nucleares de trofozoitos transfectados con los plásmidos pKT3M o pTRF-like III_{ox} se diluyeron en buffer BDG 1X (HEPES 12 mM pH 7.8; glicerol 10%, EDTA 0.05 mM, MgCl₂ 4 mM, KCl 10 mM, DTT 1 mM y espermidina 4 mM) y se incubaron con 100 ng de poly(dI-dC).poly(dI-dC) (Sigma-Aldrich) por 10 min a 4° C. Posteriormente se le agregó 1 ng del oligonucleótido marcado con dATP[α-³²P] y se incubaron por 1 minutos. Las mezclas de reacción se sometieron a electroforesis en un gel de acrilamida al 6% utilizando TBE 0.5x (Trizma-Base 89 mM, ácido bórico 89 mM y EDTA 2 mM pH 8.0). El gel se corrió a 120 V aproximadamente 3h. Posterior a la corrida, el gel fue desmontado de los vidrios y colocado en un secador de geles y secado a 80°C en vacío durante 40 minutos. Una vez que estuvo completamente seco, este se expuso placas auto radiográficas (Kodak Eastman) sensibles a radioactividad durante toda la noche. Finalmente, se digitalizó la imagen y se analizaron los resultados.

D) Ensayos de competencias

Para los ensayos de competencias, las mezclas de reacción se preincubaron con cantidades crecientes de oligonucleótidos homólogos y heterólogos fríos antes de agregar los oligonucleótidos marcados.

E) Ensayo de Supershift

Para los ensayos de superretardamiento, las mezclas de la reacción de los complejos DNA-proteína se incubaron a 4°C con 4µg de los anticuerpos α EhTRF-like III (Policlonal de conejo, IgG), el anticuerpo comercial α-Myc o suero preinmune durante una hora, previo a la electroforesis. Las reacciones fueron resueltas en un gel de poli(acrilamida) al 6% y posteriormente secados y digitalizados como se describió anteriormente.

7.27. Curva de crecimiento

Para evaluar el crecimiento celular se agregó medio BYI-S33 completo en tubos de 10 ml, donde cada tubo contaba con 100 000 trofozoitos. Posteriormente se realizó el conteo de trofozoitos cada 24 h, usando la cámara de Neubauer durante

10 días. Esto se realizó colocando 10 µl de medio con trofozoítos en la cámara y se contaron los trofozoítos que se encontraban en cada uno de los cuadrantes. Este conteo se realizó para los grupos pKT-3M y EhTRF-like Ilox. Una vez obtenidos todos los datos, estos fueron graficados con ayuda del programa Excel® para obtener la curva de crecimiento.

7.28. Análisis de la estructura de la proteína EhTRF-like III y sus modificaciones postraduccionales

Para el análisis de la estructura de la proteína EhTRF-Like III, se realizó un alineamiento múltiple mediante el programa ClustalW. El alineamiento realizado se sometió al programa BOXSHADE para facilitar el análisis de las regiones conservadas. También se hizo uso del servidor ExPASy para determinar el punto isoeléctrico y masa teórica de la proteína EhTRF-Like III. Para la determinación de las modificaciones postraduccionales se hizo uso de los servidores NetPhos 2.0 Server, NetNGlyc 1.0 Server, YingOYang 1.2 server y Jci-bioinfo.cn

8. Resultados

8.1. Clonación del gen *ehtrf-like III* en el vector pJET 1.2/blunt

Para clonar el gen *ehtrf-like III*, en este trabajo se diseñaron e utilizaron oligonucleótidos específicos los cuales además contienen sitios de restricción para su clonación. El DNA genómico utilizado para la amplificación del gen *ehtrf-like* de obtuvo de trofozoítos cultivados en condiciones normales de crecimiento. Se observó que del DNA genómico de *E. histolytica* se amplificó un producto de 1383 pb como se muestra en la figura 21.

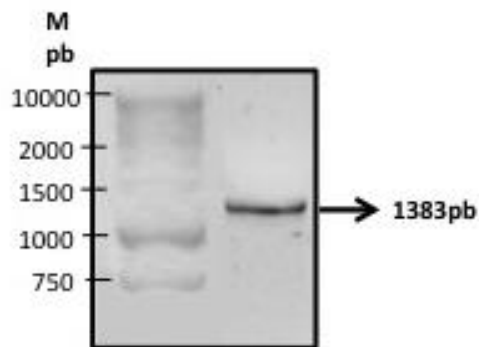


Figura 21. Amplificación del gen *ehtrf-like III*. A partir de DNA genómico se amplificó el gen *ehtrf-like III* y se obtuvo un amplicón que corresponde con el tamaño esperado de 1383 pb.

Una vez amplificado el gen *ehtrf-like III*, el amplicón de 1383 pb y que corresponde al tamaño esperado del gen, se clonó en el vector pJET 1.2/blunt, donde se obtuvieron 10 colonias candidatas, las cuales se analizaron por restricción del DNA plasmídico con las enzimas *SmaI/XhoI*, de las cuales se obtuvieron dos clonas positivas. En la figura 22 A se indica con una flecha las dos clonas positivas que liberaron el inserto con el tamaño esperado de 1383 pb. El plásmido de una de estas colonias fue purificado y se le realizó una nueva restricción donde nuevamente se observó la liberación del inserto con el tamaño correspondiente al gen *ehtrf-like III* como se observa en la figura 22 B.

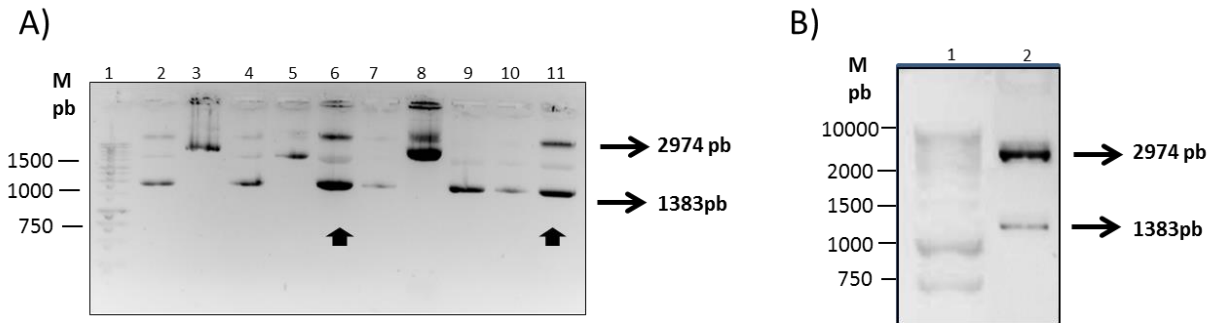


Figura 22. Análisis de las clonas candidatas para la verificación de la clonación del gen *ehtrf-like III* en el vector pJET1.2/blunt. A) Restricción de los plásmidos obtenidos de las 10 colonias candidatas. B) Restricción y purificación del plásmido candidato el cual se corroboró que liberó el inserto correspondiente al gen *ehtrf-like III*.

El fragmento de DNA amplificado de 1383 pb, se secuenció para corroborar que el gen clonado no presentaba ningún cambio en su secuencia de DNA y que pudiera conducir a errores en la proteína expresada. Con la secuencia de DNA obtenida se realizó un alineamiento con la secuencia del gen *ehtrf-like III* obtenida de la base de datos AmoebaDB y se corroboró que no presentaba ninguna modificación a lo largo de su secuencia (Figura 23).

EHI_148140 secuencia for 1 -----NNNNNTNNNTATGAACTCAAACAATACTATG
EHI_148140 secuencia BD 1 ATGAGAGAAAAAATAAAAAAGAACAAATGAAAATATGAACTCAAACAATACTATG
EHI_148140 secuencia rev 1 -----

EHI_148140 secuencia for 37 AACGATGACAAATGTCCTTCAGCACGTCGTATTATTGACCAATTAACAACAAATCAAAT
EHI_148140 secuencia BD 61 AACGATGACAAATGTCCTTCAGCACGTCGTATTATTGACCAATTAACAACAAATCAAAT
EHI_148140 secuencia rev 1 -----

EHI_148140 secuencia for 97 GACGAAATTAATTTGTATGATAATCATAAAAAACATTATTATCAATTTGCGAATATCTT
EHI_148140 secuencia BD 121 GACGAAATTAATTTGTATGATAATCATAAAAAACATTATTATCAATTTGCGAATATCTT
EHI_148140 secuencia rev 1 -----

EHI_148140 secuencia for 157 ATTGATTCAGGAATTAATTTCTGATCTTTTTGAACAATGTTTAAACACAACAAGTATTCATG
EHI_148140 secuencia BD 181 ATTGATTCAGGAATTAATTTCTGATCTTTTTGAACAATGTTTAAACACAACAAGTATTCATG
EHI_148140 secuencia rev 1 -----

EHI_148140 secuencia for 217 GAATCAGACATTCCACAGTCTCTTCATAATAAAGATCATTGGCATTGTTATTCAATTT
EHI_148140 secuencia BD 241 GAATCAGACATTCCACAGTCTCTTCATAATAAAGATCATTGGCATTGTTATTCAATTT
EHI_148140 secuencia rev 1 -----

EHI_148140 secuencia for 277 CTTGAATGTGTAGAACCCATGTTGTGAAGTAGAGAAATTAACCAAAGTTATAGCTAAT
EHI_148140 secuencia BD 301 CTTGAATGTGTAGAACCCATGTTGTGAAGTAGAGAAATTAACCAAAGTTATAGCTAAT
EHI_148140 secuencia rev 1 -----NTGTAGAACCCATGTTGTGAAGTAGAGAAATTAACCAAAGTTATAGCTAAT

EHI_148140 secuencia for 337 GTAATTCAAATTTATGTTCTGATAGTAATGCAGAAATTAATAAACTGTTCTTCATTG
EHI_148140 secuencia BD 361 GTAATTCAAATTTATGTTCTGATAGTAATGCAGAAATTAATAAACTGTTCTTCATTG
EHI_148140 secuencia rev 54 GTAATTCAAATTTATGTTCTGATAGTAATGCAGAAATTAATAAACTGTTCTTCATTG

EHI_148140 secuencia for 397 ATAGGAATAGTTGGAATGATTTCTGTATTTCATATGTTGCGCGTTCTCAAATACAACCA
EHI_148140 secuencia BD 421 ATAGGAATAGTTGGAATGATTTCTGTATTTCATATGTTGCGCGTTCTCAAATACAACCA
EHI_148140 secuencia rev 114 ATAGGAATAGTTGGAATGATTTCTGTATTTCATATGTTGCGCGTTCTCAAATACAACCA

EHI_148140 secuencia for 457 AGTGAACATAATCGAGAATTAATAATTTTACTTCTGCAGCCTCTGAACAGCCATATGTA
EHI_148140 secuencia BD 481 AGTGAACATAATCGAGAATTAATAATTTTACTTCTGCAGCCTCTGAACAGCCATATGTA
EHI_148140 secuencia rev 174 AGTGAACATAATCGAGAATTAATAATTTTACTTCTGCAGCCTCTGAACAGCCATATGTA

EHI_148140 secuencia for 517 GCCTCGTCTAGAAAAATATTGTTTAGCTGCTACAGAAGCATTATTAAGCACCACCAAAA
EHI_148140 secuencia BD 541 GCCTCGTCTAGAAAAATATTGTTTAGCTGCTACAGAAGCATTATTAAGCACCACCAAAA
EHI_148140 secuencia rev 234 GCCTCGTCTAGAAAAATATTGTTTAGCTGCTACAGAAGCATTATTAAGCACCACCAAAA

EHI_148140 secuencia for 577 GATGAAACAACCTGATAGCTTTAAGTATTTATCAACTATACCTGACGTACAATATATTCTT
EHI_148140 secuencia BD 601 GATGAAACAACCTGATAGCTTTAAGTATTTATCAACTATACCTGACGTACAATATATTCTT
EHI_148140 secuencia rev 294 GATGAAACAACCTGATAGCTTTAAGTATTTATCAACTATACCTGACGTACAATATATTCTT

EHI_148140 secuencia for 637 TCTCGGTACCCATTAGATAGGACAATAGATCATATTAACAATTTATATCAATACAAA
EHI_148140 secuencia BD 661 TCTCGGTACCCATTAGATAGGACAATAGATCATATTAACAATTTATATCAATACAAA
EHI_148140 secuencia rev 354 TCTCGGTACCCATTAGATAGGACAATAGATCATATTAACAATTTATATCAATACAAA

EHI_148140 secuencia for 697 GAAAGTAGTATACAATCAACACTAAGAGATGTTTTCTATGGATATCTTGATGGTAGAGTT
EHI_148140 secuencia BD 721 GAAAGTAGTATACAATCAACACTAAGAGATGTTTTCTATGGATATCTTGATGGTAGAGTT
EHI_148140 secuencia rev 414 GAAAGTAGTATACAATCAACACTAAGAGATGTTTTCTATGGATATCTTGATGGTAGAGTT

EHI_148140 secuencia for 757 GTTTCTAAACCATTTTCATGGCTACAACCTGATTTTATTTCAATTAAGAAATACAAACA
EHI_148140 secuencia BD 781 GTTTCTAAACCATTTTCATGGCTACAACCTGATTTTATTTCAATTAAGAAATACAAACA
EHI_148140 secuencia rev 474 GTTTCTAAACCATTTTCATGGCTACAACCTGATTTTATTTCAATTAAGAAATACAAACA

EHI_148140 secuencia for 817 GCTATGAACCTTGACTCATCAACATTTCAATCAATTGTATTAGGAGAAGACCCAAAAGTA
EHI_148140 secuencia BD 841 GCTATGAACCTTGACTCATCAACATTTCAATCAATTGTATTAGGAGAAGACCCAAAAGTA
EHI_148140 secuencia rev 534 GCTATGAACCTTGACTCATCAACATTTCAATCAATTGTATTAGGAGAAGACCCAAAAGTA

```

EHI_148140 secuencia for      877  AAGGAGTTCTTAACTCAACAACAACCAGAAACTTTTGAGACATTACAAAATCAACAATA
EHI_148140 secuencia BD      901  AAGGAGTTCTTAACTCAACAACAACCAGAAACTTTTGAGACATTACAAAATCAACAATA
EHI_148140 secuencia rev     594  AAGGAGTTCTTAACTCAACAACAACCAGAAACTTTTGAGACATTACAAAATCAACAATA

EHI_148140 secuencia for      937  CCTGCTAGTACACAACCCTAGCCCAACAACAAGGCAACTTATGCAAGTACAACCTAAA
EHI_148140 secuencia BD      961  CCTGCTAGTACACAACCCTAGCCCAACAACAAGGCAACTTATGCAAGTACAACCTAAA
EHI_148140 secuencia rev     654  CCTGCTAGTACACAACCCTAGCCCAACAACAAGGCAACTTATGCAAGTACAACCTAAA

EHI_148140 secuencia for      997  ATCAAACAAGAAAAAGAAACGTAATATAAAAAAAGGCATTAAATCTAAAAGCCAA
EHI_148140 secuencia BD     1021  ATCAAACAAGAAAAAGAAACGTAATATAAAAAAAGGCATTAAATCTAAAAGCCAA
EHI_148140 secuencia rev     714  ATCAAACAAGAAAAAGAAACGTAATATAAAAAAAGGCATTAAATCTAAAAGCCAA

EHI_148140 secuencia for     1057  GANN-----
EHI_148140 secuencia BD     1081  GATGCAACAAAACCAAGAAATGGAAGATGATGAACATAGTAAATTAAGAAAAAGAAAAGA
EHI_148140 secuencia rev     774  GATGCAACAAAACCAAGAAATGGAAGATGATGAACATAGTAAATTAAGAAAAAGAAAAGA

EHI_148140 secuencia for      1141  -----
EHI_148140 secuencia BD     1141  AGATTTAGTGAAGAAGAAACACAAAACCTTAATCGAAGGAGTTCAACAATTTGGTATTGGA
EHI_148140 secuencia rev     834  AGATTTAGTGAAGAAGAAACACAAAACCTTAATCGAAGGAGTTCAACAATTTGGTATTGGA

EHI_148140 secuencia for      1201  -----
EHI_148140 secuencia BD     1201  CATTGAAAAGCATCTTAAATGCTTATAAATTTGATGGTAGAAGTTGTGTTGATTTAAAA
EHI_148140 secuencia rev     894  CATTGAAAAGCATCTTAAATGCTTATAAATTTGATGGTAGAAGTTGTGTTGATTTAAAA

EHI_148140 secuencia for      1261  -----
EHI_148140 secuencia BD     1261  GATAAATGGAGAAATATTGAAAATTCAGAAATAGGATAAATAAACAAAAAGTCCAACCA
EHI_148140 secuencia rev     954  GATAAATGGAGAAATATTGAAAATTCAGAAATAGGATAAATAAACAAAAAGTCCAACCA

EHI_148140 secuencia for      1321  -----
EHI_148140 secuencia BD     1321  CAAGTATCTCAACCCCATTCGAAACGCATCTATGTTACCTCCTTTTAATCTGATAATTTT
EHI_148140 secuencia rev     1014  CAAGTATCTCAACCCCATTCGAAACGCATNNNNNNNNNN-----

EHI_148140 secuencia for      ---
EHI_148140 secuencia BD     1381  TAA
EHI_148140 secuencia rev     ---

```

Figura 23. Alineamiento de la secuencia obtenida por secuenciación y la secuencia del gen *ehtrf-like III* contenida en la base de datos. Se realizó el alineamiento de la secuencia obtenida del gen *ehtrf-like III* clonado en el vector pJET 1.2/blunt y la secuencia obtenida de la base de datos AmoebaDB.

Posteriormente, se hizo la subclonación del gen *ehtrf-like III* en el vector de expresión amebiano pKT-3M. Para ello el plásmido pKT-3M y el gen *ehtrf-like III* se restringieron con las enzimas *SmaI* y *XhoI*, se ligaron usando una relación inserto: plásmido de 3:1 (Figura 24 A). Posteriormente a las clonas positivas se les hizo una restricción con las enzimas *SmaI* y *XhoI* donde se eligieron aquellas clonas que liberaron el inserto con el tamaño esperado (1383pb para gen *ehtrf-like III* y 7530 del vector pKT-3M) (Figura 24 B). La construcción obtenida se denominó pTRF-like IIIox, mientras que el vector vacío se le dió el nombre de pKT-3M.

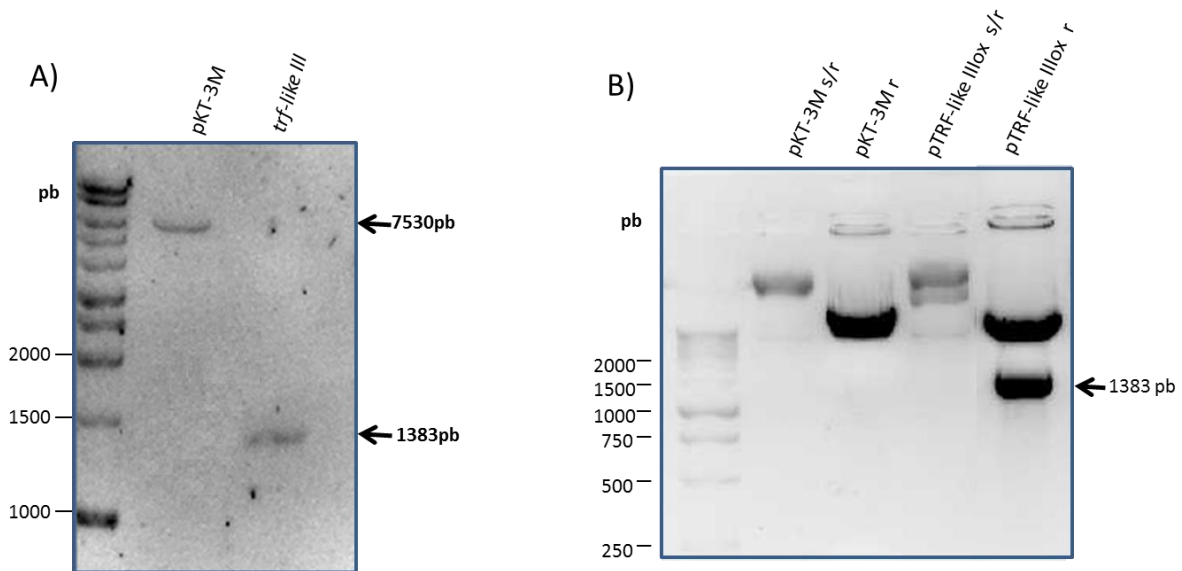


Figura 24. Subclonación del gen *ehtrf-likeIII* en el vector de expresión pKT-3M. A) Purificación del vector pKT-3M y el gen *ehtrf-likeIII* para su posterior ligación del gen en el vector pKT-3M. B) Restricción de una clona positiva que contiene el gen *ehtrf-like III* el cual libera un fragmento de 1383 pb (s/r: sin restricción, r: restringida).

El siguiente paso fue la purificación de los plásmidos pKT-3M y pTRF-like IIlox de manera que tuvieran la calidad necesaria para realizar los ensayos de transfección en los trofozoítos de *E. histolytica* HMI: IMSS clona A. Los trofozoítos transfectados se seleccionaron con concentraciones crecientes del análogo de neomicina G-418, hasta llegar a los 20 μg . Una vez que se logró el mantenimiento de los trofozoítos con G-418, se mantuvieron cultivos de este parásito en 5, 10 y 20 μg .

8.2. Determinación de la sobreexpresión del gen *ehtrf-like III* por RT-PCR y qRT-PCR

Se crecieron cultivos de las clonas pKT-3M y pTRF-like IIlox para realizar extracción de RNA total y así analizar a que concentración de G-418 hay una mayor sobreexpresión del gen *ehtrf-like III*. En la figura 25 A se muestra la integridad del RNA total extraído. Posteriormente, se realizó un ensayo de RT-PCR semicuantitativo en donde se observó que los trofozoítos transfectados pTRF-like IIlox en 5 y 10 μg sobreexpresan al gen *ehtrf-likeIII* en comparación al vector vacío (Figura 25 B).

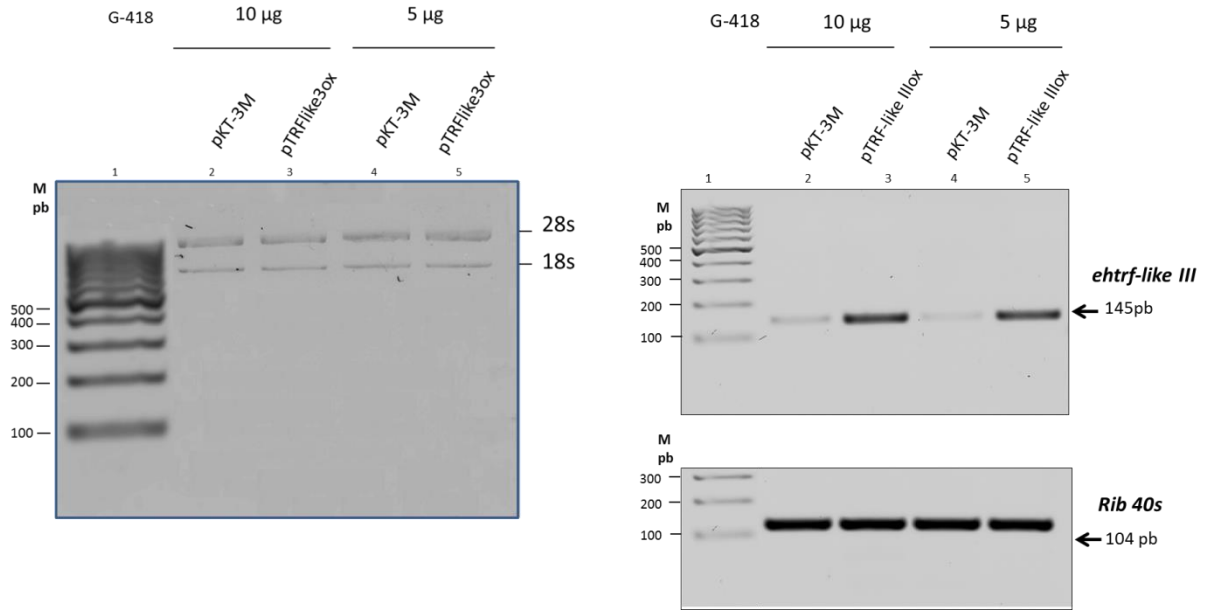


Figura 25. Sobreexpresión del gen *ehtrf-like III* en trofozoítos de *E. histolytica*. A) Aislamiento del RNA total de las células transfectadas con los plásmidos pKT-3M y pTRFlIke3ox crecidas a diferentes concentraciones de G-418 (5-20 µg). B) RT-PCR semicuantitativa donde se muestra el amplificado el gen *ehtrf-like III* (145 pb) y el gen Rib 25s (104 pb) usado como control de carga.

Para corroborar la sobreexpresión del gen en las clonas transfectadas se realizó un ensayo de qRT-PCR en tiempo real y se encontró que el gen se sobreexpresa 8 veces más en los trofozoítos transfectados con la construcción pTRF-like IIIox a una concentración de 20 µg de G-418, esto se puede ver en la figura 26. Es por ello que se seleccionó esta concentración para realizar los ensayos posteriores.

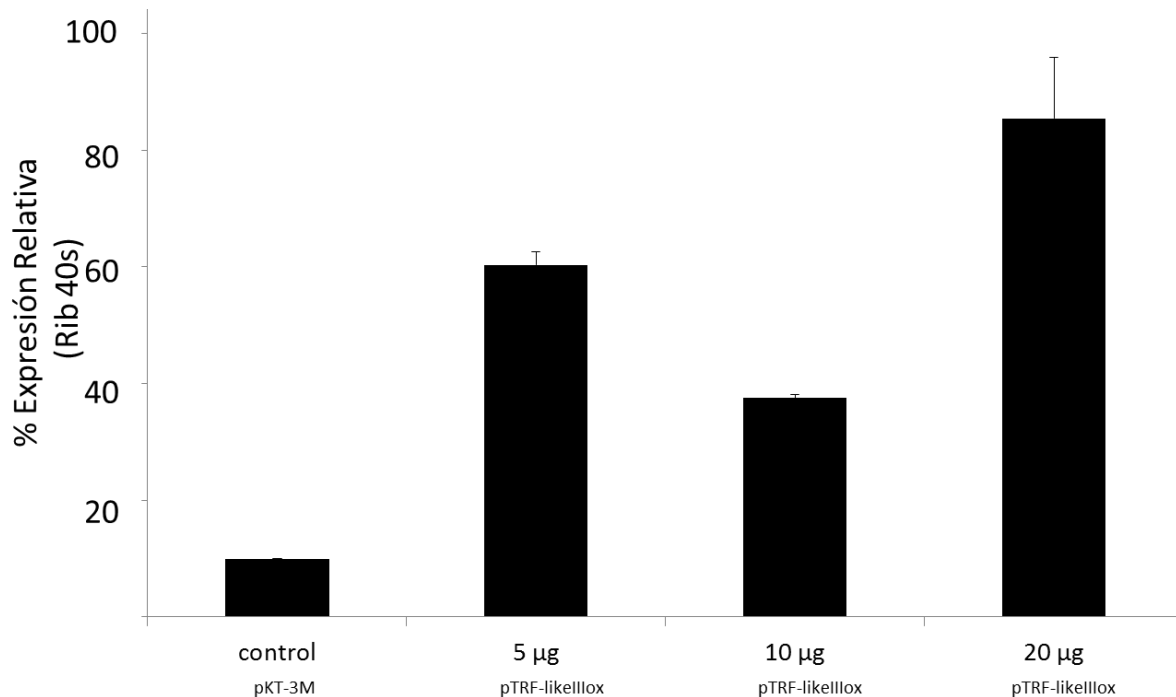


Figura 26. Análisis de la sobreexpresión del gen *ehtrf-like III* en trofozoítos de *E. histolytica* analizada por *qRT-PCR*. Se muestra la expresión del gen *ehtrf-like III* en las concentraciones de 5, 10 y 20 ug de G-418.

8.3. Análisis de la estructura de las proteínas EhTRF-like

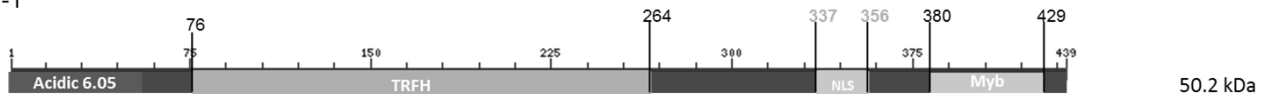
Para determinar si las proteínas EhTRF-like tenían la misma estructura y conservaban los mismos dominios funcionales que las proteínas TRF-1 y TRF-2 de *H. sapiens* se realizó un alineamiento múltiple de las secuencias de aminoácidos de las proteínas con el programa ClustalW. El alineamiento obtenido se sometió al programa BOXSHADE para facilitar el análisis de las regiones conservadas.

El análisis mostró que las proteínas EhTRF-like presentan una estructura similar a la que se encuentra en las proteínas TRF-1 y TRF-2. Las tres proteínas EhTRF-Like presentan un dominio de unión al DNA tipo Myb/SANT, ambas comparten una secuencia aminoacídica similar en el dominio de dimerización TRFH y además presentan un sitio de señalización nuclear cerca del extremo carboxilo terminal. Sin embargo, en el dominio N-terminal la proteína EhTRF-like I y II poseen un dominio ácido mientras que la proteína EhTRF-like III presenta un dominio básico. Al analizar los primeros 50 aminoácidos encontramos que el punto

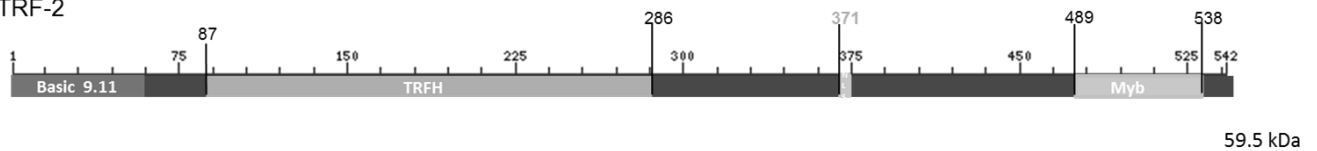
isoelectric para la proteína EhTRF-like I y EhTRF-like II es de 6.53 y 5.32 respectivamente, mientras que para la proteína EhTRF-like III es de 9.58. El peso teórico de la proteína EhTRF-like I es de 46.7 kDa, para la proteína EhTRF-like II de 51.4 kDa y para la proteína EhTRF-like III de 53 kDa. Las tres proteínas EhTRF-like presentan un tamaño de un rango similar al de las proteínas TRF de *H. sapiens* lo cual se ilustra en la figura 27.

H. sapiens

TRF-1

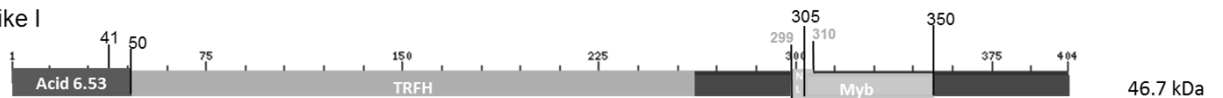


TRF-2



E. histolytica

EhTRF-like I



EhTRF-like II



EhTRF-like III

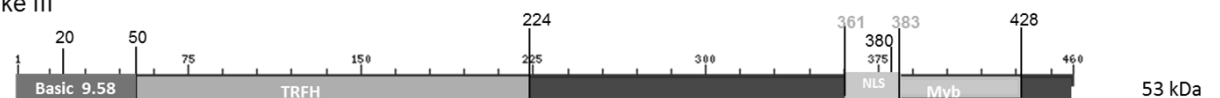


Figura 27. Análisis de la estructura de las proteínas EhTRF-like. Las proteínas EhTRF-like resentan dominios similares a los que de las proteínas TRF de *Homo sapiens*, además cada una presenta diferente punto isoelectrico en su extremo amino.

Por otro lado las funciones de las proteínas TRF son reguladas por modificaciones postraduccionales (PTMs) por lo cual también analizamos las probables PTMs que la proteína EhTRF-like III puede presentar, para lo cual se hizo uso de los servidores NetPhos 2.0 Server, NetNGlyc 1.0 Server, YingOYang 1.2 server y Jci-bioinfo.cn. Las PTM predichas se muestran en la figura 28.

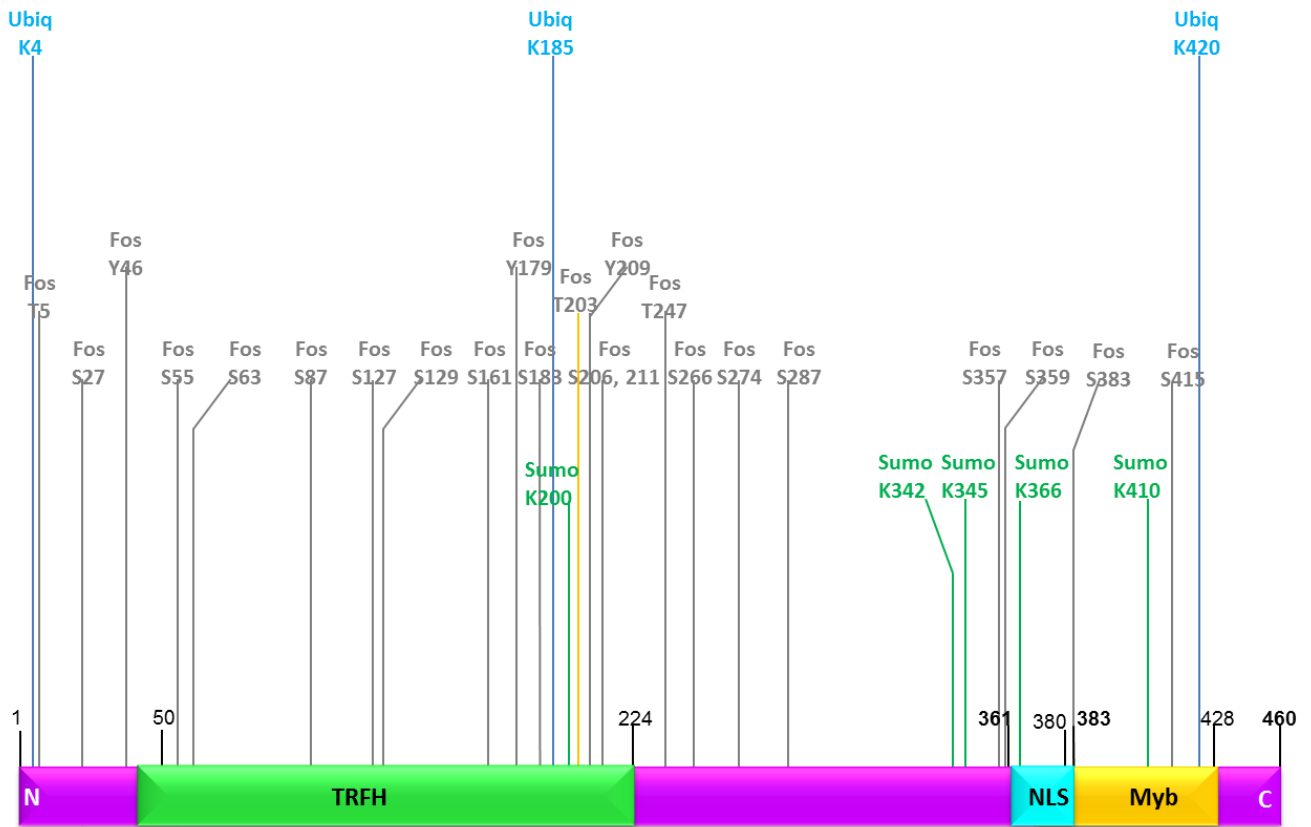


Figura 28. Análisis de las modificaciones postraduccionales de la proteína EhTRF-like III. Esta proteína presenta sitios de fosforilación (Fos) indicados en negro, sitios de ubiquitinación (Ubiq) en azul, así como sitios de SUMOilación (Sumo) en verde.

Tabla 14. Comparación de las modificaciones postraduccionales entre las proteínas TRF2 de *H. sapiens* y EhTRF-like III de *E. histolytica*

PTM	Función	Referencia	a.a con PTM en TRF2	a.a con PTM en EhTRF-like III
Ubiquitinación	Involucrada en el alargamiento del ciclo de vida de las células.	Fujita <i>et al.</i> 2010	K 180, 184	K 185
SUMOilación	Regula la formación de APB.	Potts and Yu 2007	K 333	K 345, 366
Fosforilación	Disminuye su afinidad por el DNA telomérico.	Buscemi <i>et al.</i> 2009; Zhou <i>et al.</i> 2010	S 20	S 27
	Responsable de la rápida activación de la vía de reparación del DNA de doble cadena.	Tanaka <i>et al.</i> 2005; Huda <i>et al.</i> 2009	T 188	T 183
Fosforilación por Aurora C	Regulación de la mitosis, crecimiento y morfología.	Spengler 2007; Carmena and Earnshaw 2003; Giet <i>et al.</i> 2005; Sasai <i>et al.</i> 2004; Slattery <i>et al.</i> 2009.	T 358	T 357

El análisis mostró que la proteína EhTRF-like III puede presentar sitios susceptibles de ubiquitinación en los aminoácidos de lisina 4, 185 y 420, así como sumoilaciones en las lisinas 200, 342, 345, 366, 410. Sin embargo, esta proteína presenta múltiples sitios susceptibles a fosforilarse en los aminoácidos de treonina 5, 247, tirosina 46, 179, 209 y serina 27, 55, 63, 87, 127, 129, 161, 183, 206, 211, 266, 274, 287, 357,359, 383, 415, las cuales al compararlas con PTMs de TRF2 se enocontraron relacionadas con funciones previamente reportadas, algunas de estas se muestran el la tabla 14.

8.4. Obtención y titulación de anticuerpos policlonales contra la proteína EhTRF-like III

Para determinar la localización de la proteína codificada por el gen *ehtrf-like III*, se generaron anticuerpos policlonales contra la proteína EhTRF-like III. Para lo cual se produjeron, primeramente anticuerpos policlonales contra un péptido sintético acoplado a KLH.

Este péptido sintético fue diseñado de tal manera que su secuencia fuera diferencial de la proteína EhTRF-like I y EhTRF-like II y permitiera identificar de manera específica a la proteína EhTRF-like III, como se muestra en la figura 29.

También se realizó un alineamiento múltiple con las proteínas restantes de Entamoeba histolytica, para evitar tener alguna reacción cruzada con las otras proteínas de la misma familia y favorecer el obtener el reconocimiento de la proteína de nuestro interés.

```

EhTRF-Like I (EHI_001090) -----MNNPQFATLQRIVSQEPLHPTQNIPIEVKMEQSPMIVSTDLETLCRKKLTLEDI
EhTRF-Like III (EHI_148140) MREKTKKRTIKNMNTQNTMNDKDCPSARRIIDQLKQNQIDEINLYD----NHKKTLLSI
EhTRF-Like II (EHI_001110) -----MNCIEDKCIVAHHIIDQLKQNKVDDYNVFD----NHKKTLISI
                               ::   ..*  ::*  ::   *   .**** *

EhTRF-Like I (EHI_001090) CEYLMDDIECGLFNQLIQNEYINPDELSQNYKKKRTLKYALQIINGIDPNCQVQESLQK
EhTRF-Like III (EHI_148140) CEYLIDSGINSDLFEQCLTQQVFMESDIPQSLHNKRSLAFVIQFLECVPEPPCCEVENLPK
EhTRF-Like II (EHI_001110) CEYLIDSGINCELYEQCLNQQIFVESDIPQELHNKRALATVINFFESIEPFNIEIEYLPK
*****..*:. **:* : :: : ..:*. :***:* .: : : :* :* * *

EhTRF-Like I (EHI_001090) ISECVIQLFQEDSKSEILKPLPSLIGLTGMITLFYQYVSKKVQQTAMWDWLDLLLPAISQ
EhTRF-Like III (EHI_148140) VIANVIQIYCSDSNAEILKTVPSLIGIVGMISVHFMFARSQIQPSELNRELNILLPAASE
EhTRF-Like II (EHI_001110) IISNVIQIYCSDPNAEILKSIPSLIGIIGMISIFHLYSKFQIQGELIRHINILLPESE
:  **:: .*. :***: :***: :***: : : :* : : :*** *

EhTRF-Like I (EHI_001090) LPYLKTSRSCSEEAIDILSETEIPDNLTNPEEFLMRITSIHQIARYPVIIATLEHIKTQL
EhTRF-Like III (EHI_148140) QPYVASSRKYCLAATEALLKAPPKDETTDSFKYLSTIPDVQYILSRYPLDRIDHIKQLL
EhTRF-Like II (EHI_001110) QPYVASSRKYCLSAIEALLKTPIKEGITDSNEYLQNIQEVKYILSRYPLIRTIIEHIKHL
**:*:. * : * : : : * : : * * : : :***: * :*** *

EhTRF-Like I (EHI_001090) EKYHQSLNPSLVQQLIYQYAE-----PVKLPVGIY-----
EhTRF-Like III (EHI_148140) YQYKESSIQSTLRDVFYGYLDGRVSVKPF SWPTTDFISIKEIQTAMNLDSSTFQSVLGE
EhTRF-Like II (EHI_001110) YQFKEICPSSTLRNVFYNLNGKIVSKPFSWPSTDFISIREIQTAMGLDSTTFQAVFGE
: : : * : : : * * .. * :

EhTRF-Like I (EHI_001090) DNKIDDL SLTNK-----V NKKKNEKVNKPIRQP---
EhTRF-Like III (EHI_148140) DPKVKEFLTQQQPETFETLQNNQLPASTQPLAQQQRQLMQVQPKIKQEKEERNIKKKALN
EhTRF-Like II (EHI_001110) DPKVKDFLLQQQSDLIENYSQYIHLQTPHIHQHQLLL--QQKIKCDKEEKSKKKPSP-
* * : : : : : * * * * : :

EhTRF-Like I (EHI_001090) -----VDEN--GQVIKKKKRRFTEETQNLIEGVQQFGIGHWKLILNFKFDDRS
EhTRF-Like III (EHI_148140) SKSQDATKPKMEDD-EHSKLKKKKRRFSEETQNLIEGVQQFGIGHWKSILNAYKFDGRS
EhTRF-Like II (EHI_001110) -KLLNSSIKIDDGTENKLLKKKKRRFTEETQNLIEGVQQFGIGHWKLILNFKFDDRS
: : : . :*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****

EhTRF-Like I (EHI_001090) CVDLKDKWRNLEFSRLRNNKOKSNEPTMTHPNNEQEKNTLPSVGNALIPPSLMSDGFKQL
EhTRF-Like III (EHI_148140) CVDLKDKWRNIENSRNIN KOKVOPOVSOPHS-----NASMLPPFNSDNF---
EhTRF-Like II (EHI_001110) CVDLKDKWRNLENSRLRNNKQKSNEPTMTQFKS-----NGTILPPFNSDNY---
*****:* * * * * * : * : : : . * . : * : * : * :

EhTRF-Like I (EHI_001090) DL SQ
EhTRF-Like III (EHI_148140) ----
EhTRF-Like II (EHI_001110) ----

```

Figura 29. Diseño de un péptido diferencial de la proteína EhTRF-like III. La secuencia del péptido sintético (mostrada en el recuadro) es diferente de las otras proteínas EhTRF-like lo que permite detectar de manera específica a la proteína EhTRF-like III.

Una vez obtenido el péptido se inmunizó un conejo macho Nueva Zelanda y el suero se tituló mediante ensayos de Western Blot para determinar la mejor dilución de reconocimiento del anticuerpo a la proteína EhTRF-like III en extractos totales de trofozoítos de *E. histolytica* que sobreexpresaban a la proteína EhTRF-like III. En el ensayo de inmunodetección se observó una banda de aproximadamente 65 kDa en el quinto sangrado a una dilución de 1:1200. En el suero preinmune no mostró ningún reconocimiento (Figura 30).

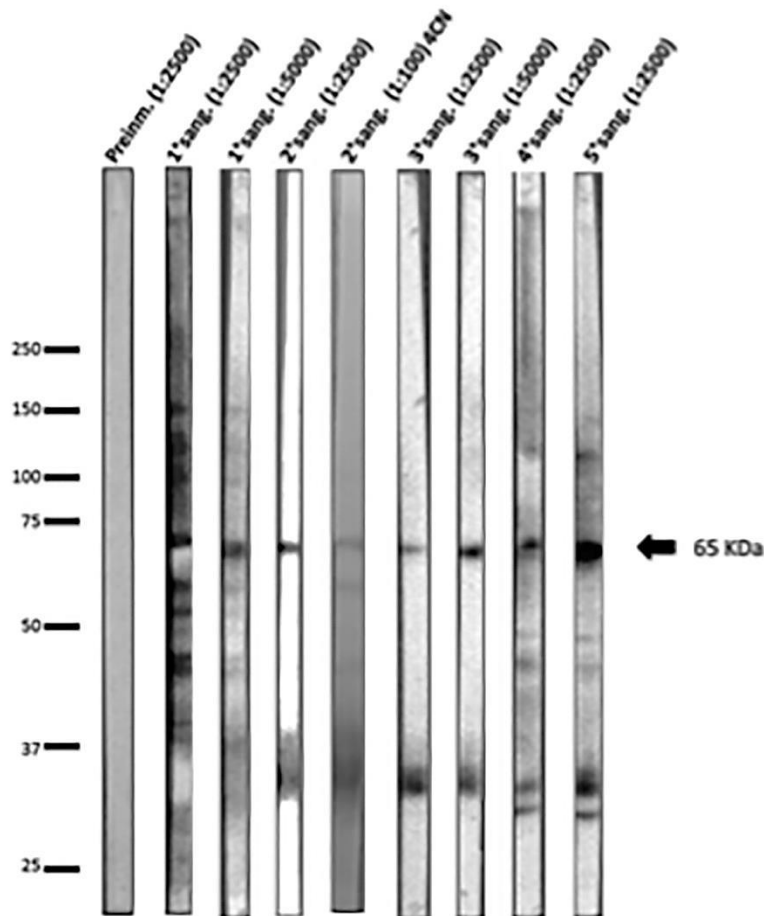


Figura 30. Titulación del anticuerpo policlonal α -TRF-like III. Inmunodetección de la proteína EhTRF-like III obtenida a partir de extractos totales de trofozoítos transfectados con el vector pEhTRF-IIIox. La flecha indica una proteína de 65 kDa la cual es reconocida por el anticuerpo obtenido.

8.5. Inmunodetección de la proteína EhTRF-like III en trofozoítos de *E. histolytica*

Después de determinar la dilución a la cual es reconocida de manera específica la proteína EhTRF-like III, se realizó un ensayo de inmunodetección de extractos proteicos citoplásmicos y nucleares de trofozoítos de *E. histolytica*. En ellos se detectó a la proteína tanto en la fracción citoplasmática como en la nuclear. Sin embargo, como se esperaba en las amibas transfectadas con la construcción pTRF-like IIIox se observó un aumento en la cantidad de proteína EhTRF-like III con un peso molecular de 65 kDa. Como control del fraccionamiento celular se incluyó un anticuerpo anti-histona 3 trimetilada, observando solo la inmunodetección de la proteína en la fracción nuclear (Figura 31).

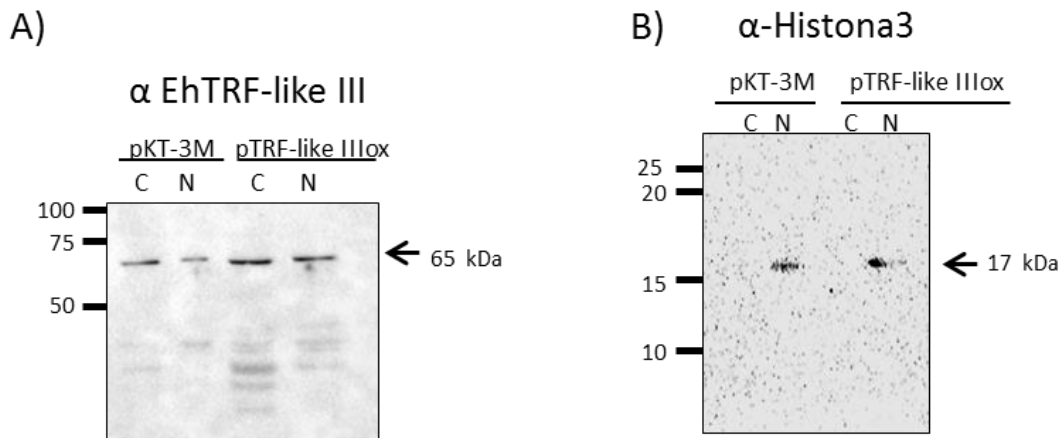


Figura 31. Localización celular de la proteína EhTRF-like III. A) Utilizando el anticuerpo anti-EhTRF-like III, se observó a la proteína en el citoplasma (C) como en el núcleo (N) en la clona transfectada. B) Se utilizó el anticuerpo anti-histona 3 trimetilada como control nuclear, donde solo se observó reconocimiento en los extractos nucleares. La flecha indica el reconocimiento de la proteína EhTRF-like III.

En diversas especies la ubicación de los telómeros cambia durante el ciclo celular, pues durante la interfase los telómeros se encuentran localizados en la membrana nuclear formando *focas* teloméricas, regularmente en el extremo opuesto del nucléolo, mientras que una vez entrada la mitosis los telómeros se disocian permitiendo la segregación de los cromosomas (Gonzalo *et al.* 2016). Por lo cual nos interesó analizar la presencia de la proteína EhTRF-like III en la fracción de proteínas citoplásmicas, en la fracción nuclear soluble y en la fracción nuclear insoluble. De manera interesante se encontró a la mayor parte de la proteína EhTRF-like III que se encuentra en el núcleo en la fracción nuclear insoluble, fracción en la que se encuentra presente la membrana nuclear, esto a 5, 10 y 20 μ g de G-418 (Figura 32).

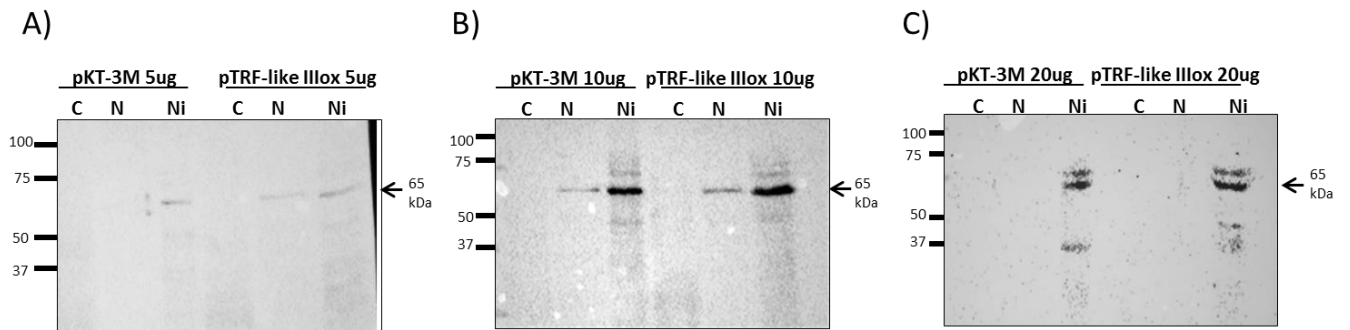


Figura 32. Expresión y localización de la proteína EhTRF-like III en trofozoítos transfectados de *E. histolytica*. Inmunodetección de la proteínas EhTRF-like III en la fracción citoplasmática (C), nuclear soluble (N) y nuclear insoluble (Ni) de trofozoítos de *E. histolytica* que se encontraban a la presión de antibiótico de 5 µg B), 10 µg B) y 20 µg C) de G-418.

8.6 Determinación de la proteína EhTRF-like III por microscopía confocal

Para corroborar la localización de la proteína EhTRF-like III y analizar su localización *in situ* se realizaron inmunofluorescencias usando el anticuerpo policlonal α -EhTRF-like III generado y el suero preinmune de los conejos como control. Como anticuerpo secundario se utilizó anti-IgG de conejo acoplado a TRITC (Zymed) de las clonas sometidas a la concentración de 5, 10 y 20 µg de G-418 (Figura 33). Las microscopías muestran que los trofozoítos que se encuentran a la presión de selección de 5 µg de G-418 una baja presencia de esta proteína en el citoplasma, mientras que las clonas que se encuentran en la concentración de 10 y 20 µg de G-418 en el núcleo formando *focas* y en menos proporción en el citoplasma del trofozoito. De manera interesante la proteína se encuentra de manera perinuclear lo cual correlaciona con su presencia en la fracción insoluble nuclear. Estos efectos observados son específicos ya que en las células que fueron tratadas con el suero preinmune no se observa presencia de la proteína EhTRF-like.

Para lograr diferenciar a la proteína EhTRF-like III sobreexpresada de la endógena se usó el anticuerpo anti-Myc ya que este anticuerpo reconoce una etiqueta que presenta la proteína heteróloga, como anticuerpo secundario se utilizó anti-IgG de conejo acoplado a TRITC (Zymed) en las clonas sometidas a la concentración de 5, 10 y 20 µg de G-418 (Figura 34). Se observó una escasa presencia en trofozoítos que se encuentran con presión de selección de 5µg de G-418. En las clonas que sobreexpresan a la proteína EhTRF-like III en la concentración de 10 ug se ubicó distribuida en el núcleo pero ausente en el citoplasma; mientras que en las clonas sometidas a una presión de 20 µg de G-418 esta se encontró

principalmente en la periferia nuclear lo cual correlacionó con los resultados obtenidos por inmunodetección.

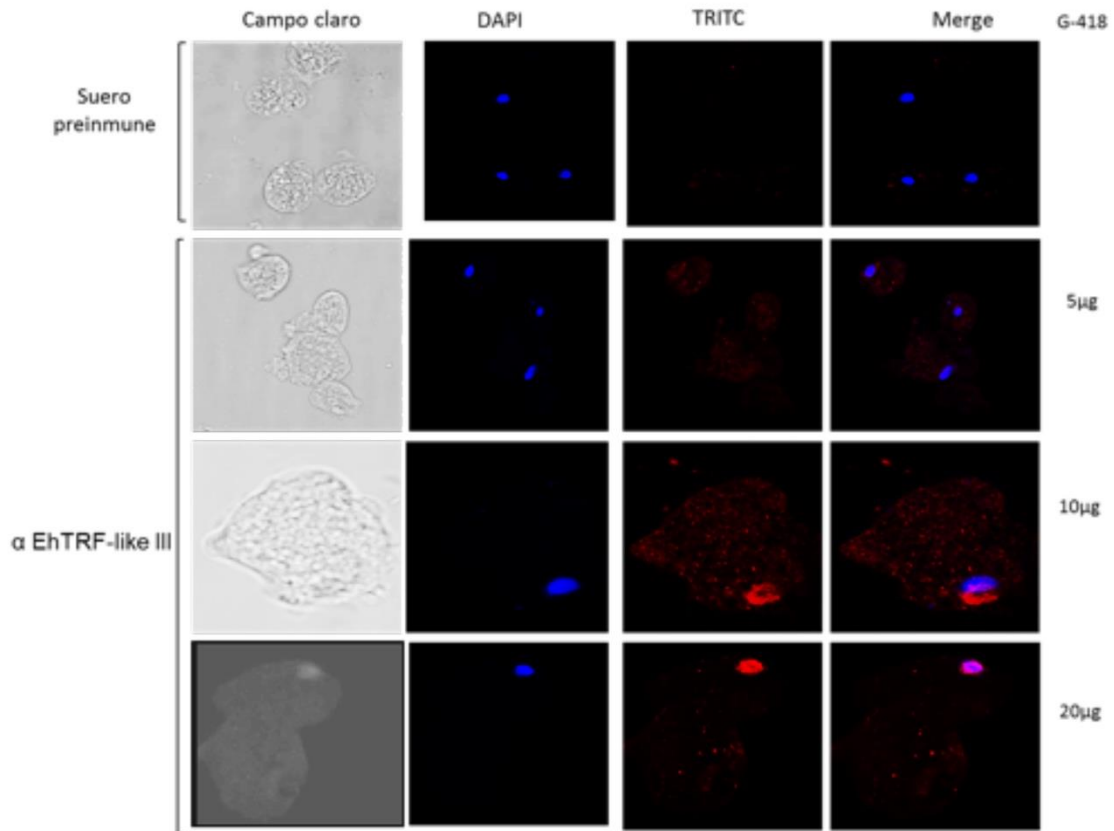


Figura 33. Inmunofluorescencia de la proteína EhTRF-like III usando el anticuerpo α EhTRF-like III. De izquierda a derecha en el primer panel se observa a los trofozoítos en campo claro, la proteína de estudio detectada con TRITC y en el último panel el solapamiento. El núcleo es marcado con DAPI y el suero preinmune fue incluido como control negativo.

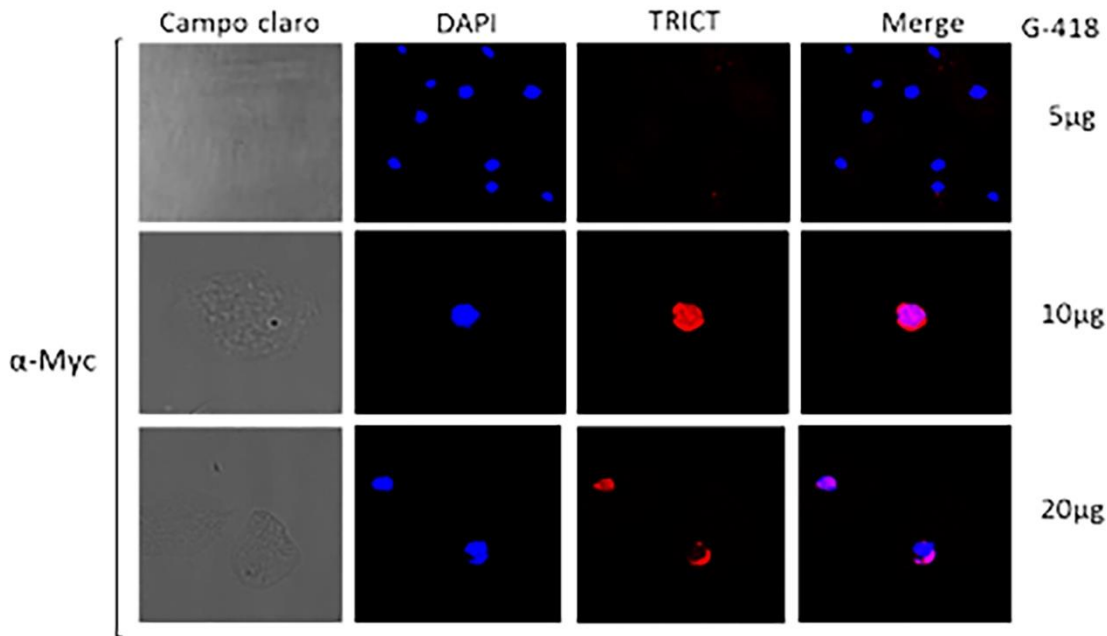


Figura 34. Inmunofluorescencia de la proteína EhTRF-like III usando el anticuerpo comercial α -Myc. Trofozoítos de *E. histolytica* transfectados establemente y sometidos a diferentes concentración de G-418 (5 a 20 μ g), donde la proteína EhTRF-like III se encuentra acoplada a TRITC y DAPI como marcador nuclear.

8.7 Determinación de la capacidad de unión de la proteína EhTRF-like III a secuencias de DNA por ensayos EMSA

Para determinar la capacidad de unión de la proteína EhTRF-like III se diseñaron oligonucleótidos que contuvieran las secuencias que ya están descritas como secuencias teloméricas en humanos (HuTRF), la secuencia candidata como secuencia telomérica en *E. histolytica* (EhTRF), secuencias no teloméricas y no relacionadas (Tabla 13).

Se utilizó como referencia una de las secuencias previamente reportadas por el grupo de Tawari et al., 2008 donde se sugiere que los arreglos de genes que codifican para tRNA se encuentran en los extremos de los cromosomas y a su vez presentan bloques de secuencias repetidas tipo STR (sonda denominada EhTRF). También se usó la sonda que lleva la secuencia telomérica de *H. sapiens* ya que estudios *in silico* de interacción macromolecular sugieren que las proteínas EhTRF-like son capaces de unirse al DNA, intercalando la tercer hélice del dominio MYB en el surco mayor (sonda denominada HuTRF). Además se usó una sonda con secuencia no telomérica ya usada anteriormente por el grupo de

Tahmaseb et al., en el 2010 donde se comprobó experimentalmente que las proteínas TRF no son capaces de unirse (sonda denominada No Tel) y finalmente se usó una sonda con secuencia no relacionada a telómeros (Sonda denominada No relacionada).

Al hacer el ensayo de retardamiento con los extractos nucleares de las proteínas provenientes de las clonas pTRF-likeIIIox sometidas a la concentración de 5 µg, 10 µg y 20 µg de G-418 con las sondas EhTRF y HuTRF se observó la formación de 3 complejos DNA-proteína. Se encontró que con la sonda EhTRF se obtuvieron 3 complejos de los cuales el complejo II se enriqueció cuando se usaron los extractos provenientes de las clonas pTRF-likeIIIox. En el caso de la sonda HuTRF se obtuvo un enriquecimiento del complejo DNA-proteína III en la concentración de 20 µg (Figura 35).

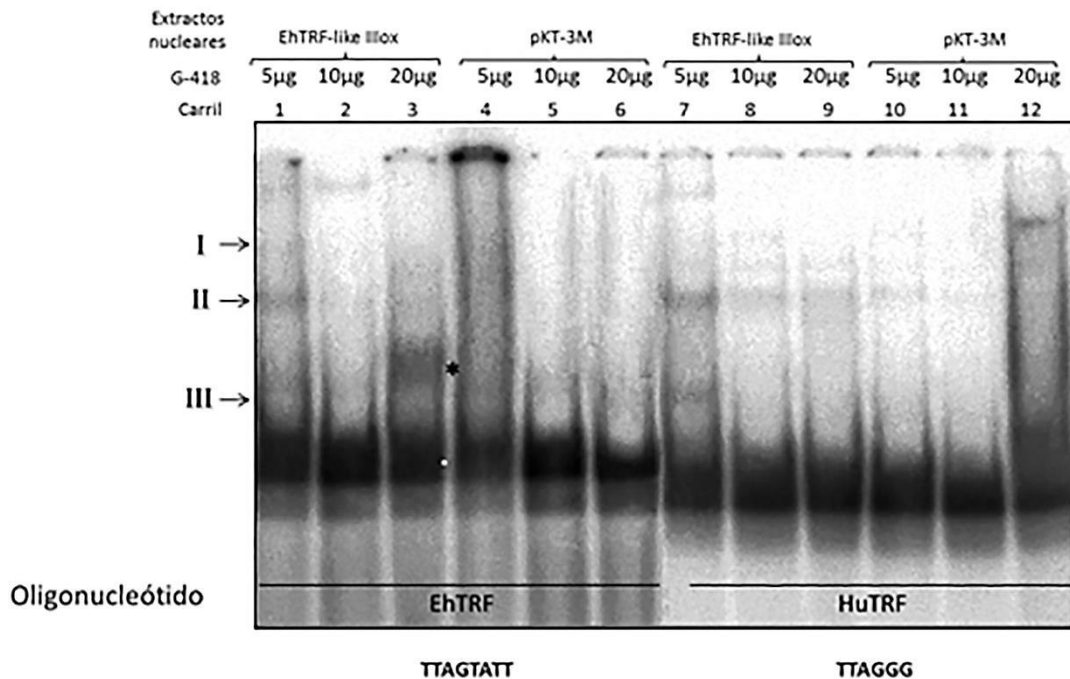


Figura 35. Ensayo EMSA de la proteína EhTRF-like III con la secuencia de *H. sapiens* (HuTRF) y la secuencia derivada de los arreglos de tRNA de *E. histolytica* (EhTRF). Se usaron extractos nucleares de clonas que sobreexpresan la proteína EhTRF-like III o de clonas transfectadas con el vector vacío los cuales se incubaron con las sondas.

8.8. ENSAYO DE COMPETENCIAS

Al observar el enriquecimiento de los complejos DNA-proteína con las sondas que contiene la secuencia telomérica humana y la sonda de *E. histolytica* se procedió a hacer un ensayo de competencias para comprobar la especificidad de los complejos DNA-proteína obtenidos con la sonda EhTRF. Por lo tanto se hicieron competencias con excesos molares (50, 100 y 200) de las oligonucleótidos EhTRF, HuTRF, No Tel y No Relacionada utilizando extractos nucleares.

La sonda HuTRF es capaz de competir los 3 complejos obtenidos con la sonda EhTRF, lo cual indica que las proteínas que forman estos complejos están relacionadas a secuencias teloméricas humanas. Al competir con la sonda EhTRF, los complejos compitieron más eficientemente, de esta manera se corrobora la especificidad, porque sondas no relacionadas a secuencias teloméricas no fueron capaces de competir con complejos, lo cual nos sugiere la especificidad de las proteínas EhTRF-like III por las secuencias de tipo telomérico (Figura 36).

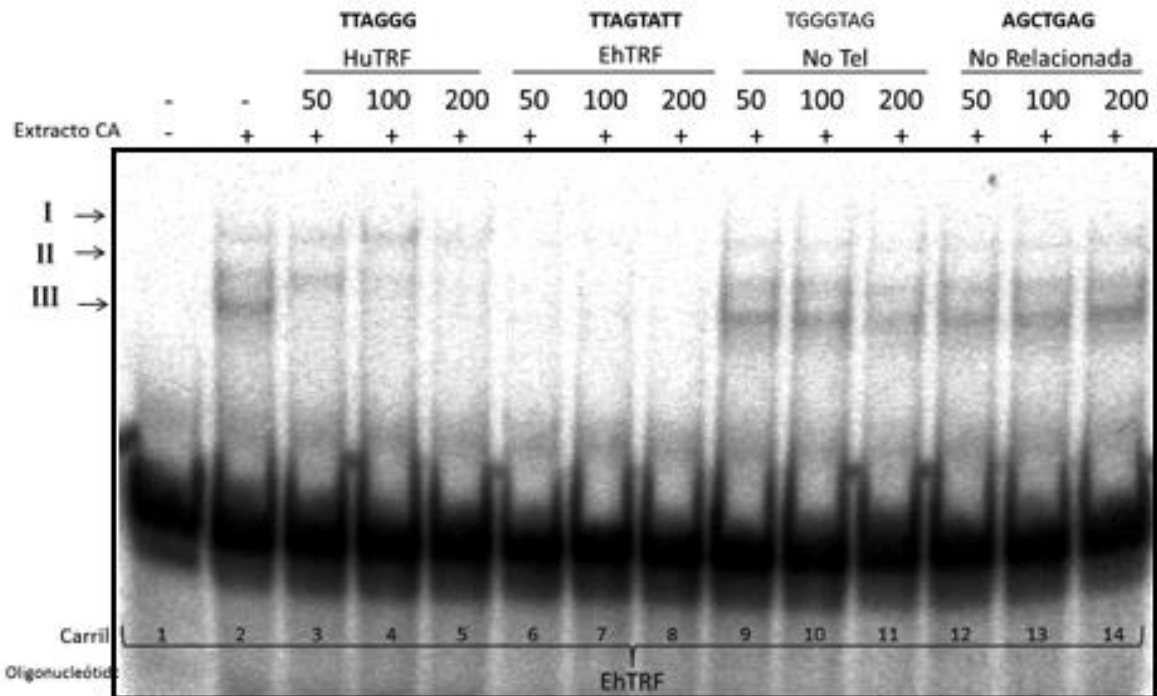


Figura 36. Ensayo de competencia de la sonda EhTRF con las sondas HuTRF, EhTRF, No Tel y la no relacionada. La sonda EhTRF fue competida con 50, 100 y 200 veces de exceso molar de las sondas HuTRF, EhTRF, No Tel y la no relacionada usando extractos nucleares de las clonas que sobreexpresan a la proteína EhTRF-like III.

8.9. Ensayos de superretardamiento

Para corroborar la identidad de las proteínas que forman los complejos DNA-proteína se realizó un ensayo de Super-retardamiento, donde se usó el oligonucleótido EhTRF y HuTRF, extractos nucleares de clonas pTRF-like IIIox, y los anticuerpos α -EhTRF-like III y α -Myc (Figura 37). Se observó la formación de un segundo complejo II con la sonda EhTRF de extractos proteicos nucleares obtenidos de la clona pTRF-like IIIox y con el anticuerpo α -EhTRF-like III. Al realizar el mismo experimento con la sonda HuTRF, se observó un enriquecimiento del complejo II y III, sin embargo estos no fueron tan significativos comparados con la sonda EhTRF. No se observó ningún cambio con el anticuerpo α -Myc.

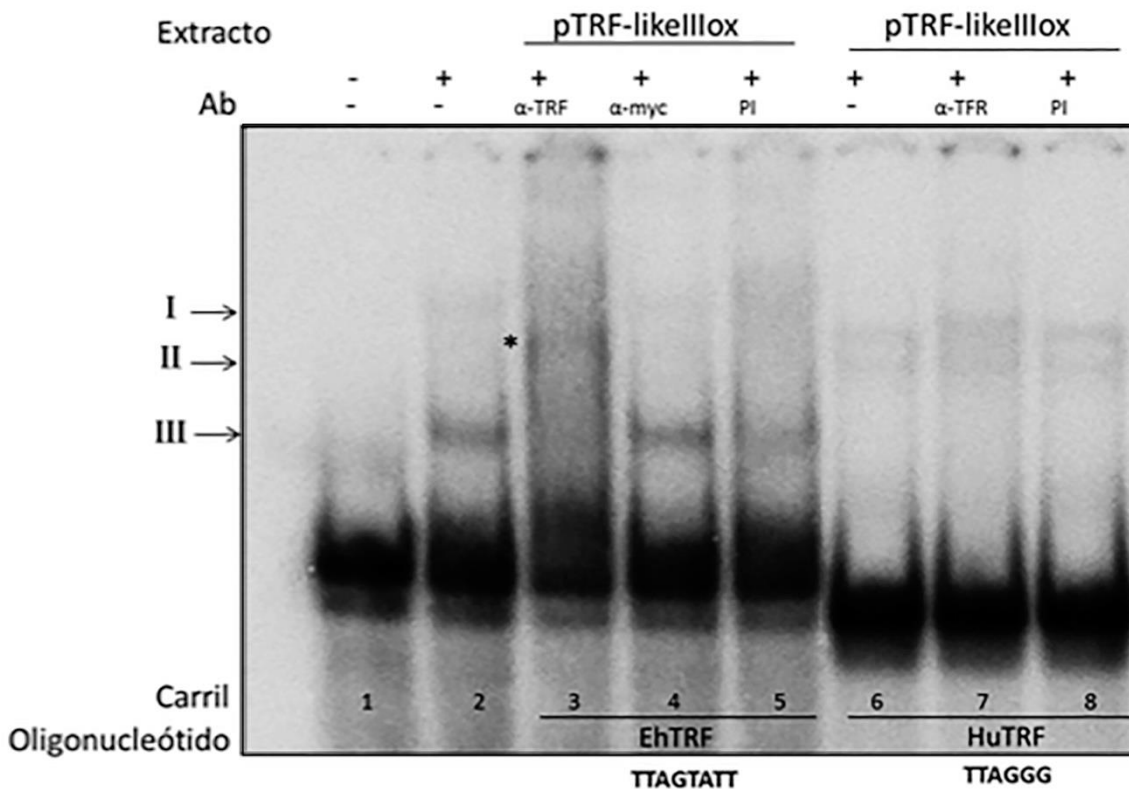


Figura 37. Ensayo de supershift usando los anticuerpos α EhTRF-like III y α -Myc. Las sondas EhTRF y HuTRF fueron incubadas con extractos nucleares de clonas pTRF-like IIIox las cuales sobreexpresan a la proteína EhTRF-like III, donde esta a su vez interaccionó con los anticuerpos α EhTRF-like III y α -Myc. El suero preinmune fue usado como control negativo (PI).

8.10. Curva de crecimiento

Como se mencionó anteriormente, la sobreexpresión de TRF-1 y TRF-2 puede inducir cambios en la homeostasis de la regulación de los telómeros y por lo tanto en el fenotipo de las células. Reportes indican que la sobreexpresión de TRF-1 promueve el acortamiento de los telómeros, inhibición de la resolución de las cromátides hermanas, etc. mientras que la sobreexpresión de TRF-2 induce un arresto proliferativo con características de senescencia, inestabilidad cromosomal, además puede promover la tumorigenesis, entre otras características (Hohensinner *et al.* 2011, NV Patel Trupti *et al.* 2015).

Es por esto que también nos interesó analizar el efecto de la sobreexpresión de la proteína EhTRF-like III sobre el crecimiento de los trofozoítos para lo cual se realizó una curva de crecimiento de 100 000 trofozoítos y se les realizó el conteo cada 24 h durante 10 días se observó un comportamiento similar durante los primeros cuatro días pero posteriormente se observó un alargamiento de la fase estacionaria en las clonas pTRF-like IIIox donde se presenta la sobreexpresión de la proteína EhTRF-like III, para finalmente entrar a la fase de muerte (Figura 38).

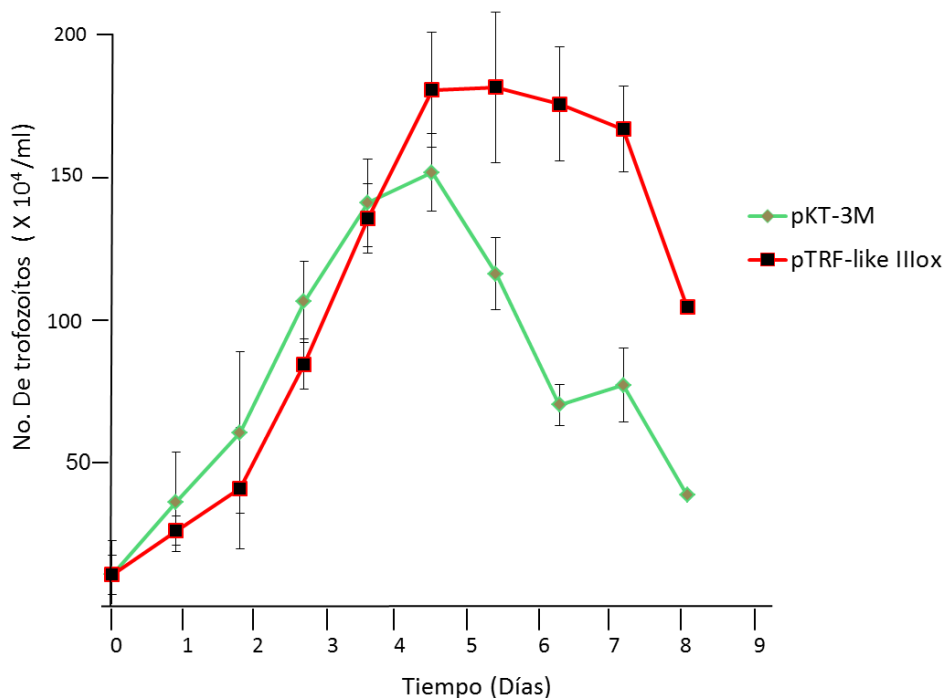


Figura 38. Curvas de crecimiento de trofozoítos de *E. histolytica* que sobreexpresan a la proteína EhTRF-like III (pTRF-like IIIox) o transfectados con el vector vacío (pKT-3M). Los parásitos crecieron en tubos y fueron contados cada 24 hrs. usando cámara de Neubauer. Los datos se muestran como la media \pm SD de tres ensayos independientes.

9. Discusión

En *Entamoeba histolytica* a través de diferentes estudios se ha mostrado la presencia de cromosomas lineales los cuales se propone que tienen regiones centroméricas (Valdés *et al.* 1990; Tannich *et al.* 1999; Riveron *et al.* 2000; Willhoeft *et al.* 2000; Chávez-Munguía *et al.* 2006; López-Robles *et al.* 2000), sin embargo a la fecha no se han identificado las secuencias teloméricas canónicas y ha permanecido la duda acerca de la existencia de telómeros. Sin embargo todos los cromosomas lineales son susceptibles a que sus extremos terminales sean dañados por nucleasas lo que hace de extrema importancia que estos tengan una organización estructural, así como maquinarias proteicas de protección a telómeros.

Los primeros datos obtenidos acerca de proteínas de protección a telómeros en *Entamoeba histolytica* fueron hechos Meneses y col. en el 2010 a través de análisis filogenéticos y *Docking Molecular* (Cárdenas H. Congreso de Bioquímica 2013), donde estos datos sugirieron la presencia de tres proteínas con dominio Myb tipo telomérico y que estas podrían ser capaces de reconocer y unirse a secuencias teloméricas canónicas.

Los resultados aquí obtenidos muestran que la proteína EhTRF-like III presenta alta similitud superior al 30 % con respecto las proteínas TRF de *H. sapiens* así como en otros organismos eucariontes. El análisis de su estructura mostró que presentan los mismos dominios estructurales que las proteínas TRF de *H. sapiens*, como es el dominio TRFH de dimerización, el dominio de unión a DNA MYB, señal de localización nuclear (NLS) y posible motivo de unión a Rap (Figura 27). Estos dominios también se han identificado en las proteínas TRF de otros protozoarios como *T. brucei* y *L. amazonensis* (da Silva *et al.*, 2010; Li *et al.*, 2005).

Nuestro análisis también mostró que presentan punto isoeléctrico similar a los de las proteínas TRF1 y TRF2. En el caso de la proteína EhTRF-like I y EhTRF-like II sus extremos amino terminales (correspondiente a los primeros 50 aminoácidos) presentan puntos isoeléctricos de 6.53 y 5.32 respectivamente. Lo cual es similar al pI de la proteína TRF1 de mamíferos que presenta un extremo amino ácido de 6.05. En el caso de la proteína EhTRF-like III su extremo amino terminal presenta un pI de 9.58 y esto es similar al de la proteína TRF2 de mamíferos es el cual es básico de 9.11. Es por esto que el grupo de investigación de la Dra. Azuara Liceaga propuso que las proteínas EhTRF-like I y EhTRF-like II podrían ser

homólogas a la proteína TRF1, mientras que la proteína EhTRF-III podrían ser homóloga a la proteína TRF2 de *H. sapiens*.

El análisis también mostro que la proteína EhTRF-like III presentaba un peso teórico de 53 kDa. Sin embargo, nosotros encontramos que el peso experimental es de 65 kDa. Para explicar esta diferencia en el peso, hicimos uso de diferentes servidores para determinar las posibles modificaciones postraduccionales que esta proteína puede presentar. El análisis bioinformático mostro que la proteína EhTRF-like III es susceptible a SUMOilaciones, ubiquitinaciones y una gran cantidad de fosforilaciones, las cuales al comparlas con las PTMs de TRF2 se mostraron conservadas y posiblemente se encuentran relacionadas con las funciones reportadas para TRF2 (Tabla 14).

La ubiquitinación es unas de las PTM más usadas por la células blanco para marcar proteínas para su degradación en el proteosoma, también puede servir en eventos de señalización. Por ejemplo, la ubiquitinación de la lisina 184 de TRF2 media su ubiquitinación y su degradación por lo tanto funciona regulador negativo de su función. Si se muta a la enzima Siah1, la cual es una enzima involucrada en la vía de ubiquitinación (E3 ligasa), se extiende la vida de fibroblastos evitando la senescencia celular. El análisis bioinformático de la proteína EhTRF-like III identifica el residuo conservado lisina 185 lo cual nos permite proponer que esta proteína puede ser susceptible a ubiquitinación. Estos datos nos dan mayores argumentos para sugerir que la proteína EhTRF-like III puede tener una función en la protección a telómeros (Walker y Zhu, 2012).

Otra PTM importante identificada en la proteína EhTRF-like III es la SUMOilación. Esta modificación podría ayudar a explicar la diferencia en peso que observamos en nuestros análisis. Ya que nosotros detectamos a la proteína EhTRF-like III con un peso de 65 kDa a diferencia del peso predicho de 53.1 kDa. Se ha reportado por cada unidad del grupo SUMO adicionada a la proteína blanco se agrega alrededor de 15 a 17 kDa (Park-Sarge et al., 2005), lo cual podría explicar el peso molecular encontrado. La SUMOilación es similar a la ubiquitinación ya que se requiere una cascada enzimática similar que ubiquitinación. Las proteínas SUMOiladas no son blancos para degradarse sin embargo esta modificación permite controlar su localización celular, así como la interacción con otras proteínas y juegan un rol importante en respuesta al DNA dañado y en la reparación. La SUMOilación de TRF1 Y TRF2 se lleva a cabo en células tumorales que carecen de telomerasa las cuales mantienen su longitud telomérica a traves

de recombinación homóloga por medio de la vía Alternativa de Mantenimiento de los telómeros (vía ALT). En el caso TRF-2 la SUMOilación se encuentra relacionada con la formación de los cuerpos APB (ALT-associated PML bodies), lugar donde se lleva a cabo eventos de replicación y recombinación de los telómeros (Walker y Zhu, 2012).

Finalmente, también se identificaron los residuos susceptibles a fosforilación en la proteína EhTRF-like III, en los que se identificaron algunos que están conservados con respecto a la proteína TRF2 (R13-18, S20 y la T188), los cuales son la R2, S27 y la T203. La cinasa ATM fosforila a la T188 de TRF2 en respuesta al DNA dañado y este evento es importante para la reparación del DNA de doble cadena. Esta fosforilación ocasiona una disminución de la unión de TRF2 al DNA telomérico lo cual podría ocasionar cambios en su localización (Walker y Zhu, 2012). Otra cinasa que fosforila a TRF2 es la Aurora cinasa C en el residuo T358 sin embargo este no se encuentra conservado en EhTRf-like III.

Cisneros M. para su tesis de maestría mostró también que el gen *ehtrf-likeIII* presenta una mayor expresión en los trofozoitos en condiciones basales (Figura 17). En este trabajo pudimos analizar la abundancia de la proteína EhTRF-like III lo cual permite proponer que se expresa abundantemente, lo cual nos indica la importancia de la presencia de esta proteína en la célula. Lo cual corresponde con lo publicado para las proteínas TRF1 y 2 las cuales se expresan abundantemente (de Lange, 2005).

Las proteínas TRF1 y TRF2 en mamíferos se encuentran localizadas en el núcleo, estas proteínas tienen señales de localización nuclear (NLS) las cuales ya se han demostrado su funcionalidad. Así mismo los telómeros se han encontrado localizados en núcleos en interfase cercanos a envoltura nuclear. No en todos los organismos ocupan esta posición, por ejemplo, en plantas como *A. thaliana* se han reportado cercanos al nucléolo. Por lo que se ha concluido que la localización subnuclear depende de la especie, el tipo celular y la fase celular. Sin embargo, a manera de un consenso se ha propuesto la localización de los telómeros unidos a la matriz nuclear en una fracción insoluble proteica. Nosotros analizamos la ubicación de la proteína EhTRF-like III en los trofozoitos que la sobre-expresaban. La proteína EhTRF-like III fue localizada próxima a la membrana o envoltura nuclear lo cual correlaciona con la ubicación previamente descrita para las proteínas humanas. En donde esta reportado que TRF2 tiene una papel primordial

en la unión con la membrana nuclear y anclándose a la matriz nuclear (Masayuki *et al.* 2011; Carson E. 2013, Ilicheva y *et al.*, 2015). De manera interesante también la inmunodetectamos enriquecida en la fracción nuclear insoluble, lo cual podría sugerir que está asociada a la membrana. Sin embargo, para corroborar la presencia de la proteína en la periferia nuclear sería importante colocarla con lamininas. (Masayuki *et al.* 2011; Carson E. 2013) y nosotros encontramos que la proteína EhTRF-like III se encuentra en la periferia nuclear de *E. histolytica* también formando *foci*.

En el caso de *E. histolytica* diversos investigadores han propuesto que en este parásito los repetidos de genes de *tRNA* podrían encontrarse en los extremos de los cromosomas o en regiones subtelo méricas. Estos repetidos contienen secuencias tipo STR de las cuales se han identificado 12 secuencias cortas diferentes (Tawari *et al.* 2008), lo cual también ha hecho pensar que estos bloques de secuencias repetidas podrían funcionar como repetidos de secuencias teloméricas. La propuesta de que estos arreglos de repetidos flanqueados por genes que codifican para tRNA pueden funcionar como secuencias teloméricas se basa en la similitud de la estructura presente en *Giardia lamblia* donde sus repetidos de secuencias teloméricas se encuentran flanqueados por genes que codifican para proteínas o por transposones, además de que la longitud de estos repetidos también es muy variada (Arkhipova *et al.* 2010). También en *Disctiostelium discoideum* en el cual se ha propuesto que sus repetidos compuestos por genes de RNA ribosomal podrían funcionar como telómeros (Sucgang *et al.*,2003). La presencia de diferentes de secuencias teloméricas en un mismo organismo también se puede encontrar en otros organismos como *S. pombe* pues esta presenta más de una secuencia telomérica (Sepsiova R. *et al* 2016).

Nosotros seleccionamos una secuencias tipo STR presente en los repetidos de tRNA del genoma de *E. histolytica*, la corresponde a una de las más abundantes. En este trabajo encontramos que la proteína EhTRF-like III presenta una gran afinidad por esta secuencia, mucho más que por la secuencia telomérica canónica de vertebrados. Adicionalmente, a esto el *docking* que se hizo de la proteína EhTRF like III con la secuencia telomérica canónica de vertebrados sugirió una interacción con secuencias canónicas teloméricas, el análisis experimental mostró que la secuencia canónica humana también es reconocida por la proteína EhTRF-like III. Es importante mencionar que se observó la formación de tres complejos. Sin embargo, solo el complejo II se enriqueció cuando se usaron los extractos

provenientes de las clonas que sobreexpresan a la proteína TRF-like III al usar la sonda EhTRF la cual contiene repetidos de secuencia propuesta como telomérica de *E. histolytica*. Al usar la sonda HuTRF la cual contiene repetidos de la secuencia canónica presente en vertebrados se obtuvo un enriquecimiento del complejo III, estos cambios nos indica que las proteínas que forman estos tres complejos se encuentran relacionadas a secuencias teloméricas. Ya que *E. histolytica* tiene tres genes que codifican para tres proteínas con dominio MYB tipo teloméricas sería interesante investigar si estos tres complejos DNA-proteína corresponden a estas tres proteínas.

En *Tripanosoma* las secuencias sub teloméricas se encuentran flanqueadas por genes que codifican para proteínas de variación antigénica, sin embargo las secuencias subteloméricas y teloméricas presentan las misma secuencia, esto es importante ya que se ha demostrado que al existir la pérdida de telómeros, los subtelómeros pueden tomar la función como estructuras teloméricas como sucede en *Sacharomices pombe*. Sin embargo datos sugieren que los subtelómeros son inactivos, es decir que los genes presentes en esa área no se expresan y las secuencias que nosotros proponemos como telómeros están flanqueadas por tRNAs y se ha comprobado que estos genes son transcripcionalmente activos, lo cual sugiere que no corresponde a la carga génica que es pobre en las secuencias subteloméricas y teloméricas. *Alium cepa* tiene minisatelites que funcionan como telómeros (no transposones). Se ha propuesto que esta planta perdió sus telómeros a través de la evolución y que fueron sustituidos con estos minisatelites (G. Sook Do *et al.* 2001); surge la interrogante si habrá ocurrido lo mismo con *E. histolytica*.

Para determinar si la proteínas TRF-like III de *E. histolytica* podía formar complejos DNA-proteína con secuencias teloméricas canónicas y con las secuencias que se proponen para repetidos teloméricos para *E. histolytica* extractos nucleares obtenidos de los trofozoítos de *E. histolytica* transfectados que sobre-expresaron a la proteína TRF-like III. Para ello incubamos oligonucleótidos de doble cadena que contenían secuencias teloméricas canónicas humanas o una bien las propuestas por Tawari y cols. Interesantemente, se obtuvieron complejos DNA-proteína con secuencias HuTRF y EhTRF. Estos resultados son muy alentadores porque muestran que la proteína EhTRF-like III reconocen tanto secuencias canónicas como una de las secuencias propuestas por Tawari y cols., la cual tiene un 55% de identidad con la secuencia canónica. En este ensayo se obtuvieron 3 complejos DNA-proteína (I, II y III) los cuales se compitieron eficientemente con excesos

molares (50, 100 y 200) de la secuencia EhTRF, de manera muy interesante la secuencia telomérica canónica HuTRF compite también eficientemente los 3 complejos DNA-proteína. Estos complejos son específicos ya que no fueron competidos con las secuencias No-TEL y la No-REL en los mismos excesos molares. Con ello podemos concluir que en *E. histolytica* existen proteínas capaces de reconocer secuencias teloméricas clásicas, posiblemente las proteínas TRF-like. Estos hallazgos son muy importantes que al momento no se han identificado secuencia canónicas teloméricas en este organismo y con estos datos al menos se sugiere que las secuencias propuestas por Tawari podrían ser regiones teloméricas al unir proteínas tipo TRF como lo es la proteína EhTRF-like III.

Finalmente la sobreexpresión de la proteína EhTRF-like III en los trofozoitos indujeron un alargamiento de la fase estacionaria de los trofozoitos de *E. histolytica* transfectados, lo cual se relaciona con los reportes donde la sobreexpresión de la proteína TRF-2 de vertebrados puede inducir la inhibición de la división celular, una de las características del estado de senescencia. Sin embargo se necesitan más estudios que confirmen o descarten el estado de senescencia.

Estos datos en conjunto son los primeros indicios de la proteína EhTRF-like III como una proteína de protección a telómeros en *E. histolytica*.

Modelo de la organización y localización de la proteína EhTRF-like III

Con base en estos hallazgos se realizó un modelo que sugiere la localización y una posible organización nuclear de la proteína EhTRF-like III, donde se muestra que esta proteína se encuentra cercana a la periferia nuclear interaccionando con secuencias repetidas tipos STR las cuales se encuentran en los repetidos de tRNA las cuales se proponen como posibles regiones teloméricas.

10. Conclusiones

- La estructura de la proteína EhTRF-like III es similar a la proteína TRF2.
- La proteína EhTRF-like III tiene un peso molecular de 65 kDa posiblemente debido a la modificación post-traducciona SUMOilación.
- La proteína EhTRF-like III se encuentra presente en el citoplasma y en el núcleo y se encuentra enriquecida en la periferia nuclear de los trofozoitos de *E. histolytica*.
- La proteína EhTRF-like III forma 3 complejos DNA-proteína con los secuencias teloméricas canónicas humanas y con la secuencia repetida de *E. histolytica*. Hubo un mayor enriquecimiento del complejo II con la secuencia *E. histolytica* cuando se usan los extractos nucleares obtenidos de los trofozoítos que sobre-expresan a la proteína EhTRF-like III.
- Los complejos obtenidos con el oligonucleótido EhTRF son competidos eficientemente por el oligonucleótido HuTRF y no por oligonucleótidos no teloméricos y la no relacionada, por lo que la proteína EhTRF-like III es capaz de unirse de manera específica a secuencias tipo teloméricas.
- Los complejos DNA-proteína obtenidos con el oligonucleótido EhTRF disminuyen su movilidad electroforética en presencia del anticuerpo α EhTRF-like III, por lo tanto se pudo corroborar que la proteína EhTRF-like III reconoce a los oligonucleótidos teloméricos.

11. Bibliografía

1. Al-Hakim, A., Escribing-Diaz, C., Landry, M.C., O'Donnell, L., Panier, S., Szilard, R.K., Durocher, D., 2010. The ubiquitous role of ubiquitin in the DNA damage response. *DNA Repair* 9, 1229–1240.
2. Arkhipova *et al.* Three retrotransposon families in the genome of *Giardia lamblia*: Two telomeric one dead. 2001. *Proc Natl Acad Sci USA* 4:98 (25): 14497-14502.
3. Atanassov, B.S., Koutelou, E., Dent, S.Y., 2011. The role of deubiquitinating enzymes in chromatin regulation. *FEBS letters* 585, 2016–2023.
4. Aurora-C kinase is a novel chromosomal passenger protein that can complement Aurora-B kinase function in mitotic cells. *Cell Motility and the Cytoskeleton* 59, 249–263.
5. Banerjee *et al.* Molecular analysis of repetitive DNA elements from *Entamoeba histolytica*, which encode small RNAs and contain matrix/scaffold attachment recognition sequences. 2003. *Molecular & Biochemical Parasitology* (126) 35–42.
6. Bhanot, M., Smith, S., 2012. TIN2 stability is regulated by the E3 ligase Siah2. *Molecular and Cellular Biology* 32, 376–384.
7. Bibo Li *et al.* Trypanosome telomeres are protected by a homologue of mammalian TRF2. 2015. *Mol Cell Biol.* 25(12):5011-21.
8. Bradshaw, P.S., Stavropoulos, D.J., Meyn, M.S., 2005. Human telomeric protein TRF2 associates with genomic double-strand breaks as an early response to DNA damage. *Nature Genetics* 37, 193–197.
9. Broccoli *et al.* Human telomeres contain two distinct Myb- related proteins, TRF1 and TRF2. 1997. *Nature Genetics.* 231-235.
10. Buscemi, G., Zannini, L., Fontanella, E., Lecis, D., Lisanti, S., Delia, D., 2009. The shelterin protein TRF2 inhibits Chk2 activity at telomeres in the absence of DNA damage. *Current Biology: CB* 19, 874–879.
11. Carmena, M., Earnshaw, W.C., 2003. The cellular geography of aurora kinases. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 4, 842–854.
12. Carson E. Tracking Telomeres to the Edge. 2013. Live Science

13. Cesare AJ, Redden RR. Alternative Lengthening of Telomeres in Mammalian Cells. 2000. Madame Curie Bioscience Database. Austin (TX): Lands Bioscience.
14. Cesare, J. Karlseder. A three-state model of telomere control over human proliferative boundaries. 2012. *Curr Opin Cell Biol* ; 24(6): 731–738.
15. Chávez-Mingxia et al. (2006) *Entamoeba histolytica*: Ultrastructure of the chromosomes and the mitotic spindle *Experimental Parasitology* 114 235–239.
16. Chen Y. Yang Y. van Overbeek, M., Donigian, J.R., Baciú, P., de Lange, T., Lei, M., 2008. A shared docking motif in TRF1 and TRF2 used for differential recruitment of telomeric proteins. *Science* 319, 1092–1096.
17. Clark CG *et al.* Structure and Content of the *Entamoeba histolytica* Genome. 2007. *Advances in parasitology*. (65)151-190.
18. Clark CG. *et al.* Unique organization of Tran genes in *Entamoeba histolytica*. 2006. *Moll Brioche Parasite*. 146(1):24–29.
19. Crabbe, L. Cesare, A. J., Kasuboski, J. M., Fitzpatrick, J. A. J., & Karlseder, J. Human telomeres are tethered to the nuclear envelope during post-mitotic nuclear assembly. 2012. *Cell Reports*. 2(6), 1521–1529.
20. da Silva *et al.* The *Leishmania amazonensis* TRFTRF (TTAGGG repeat-binding factor) homologue binds and co-localizes with telomeres. 2010. *BMC Microbiology*. 10:136.
21. de Lange T. Shelterin: The protein complex that shapes and safeguards human telomeres. 2005. *Genes Dev*. 19(18):2100-10.
22. Dephoure, N., Zhou, C. Villen, J., Beausoleil, S.A., Bakalarski, C.E., Elledge, S.J., Gygi, S.P., 2008. A quantitative atlas of mitotic phosphorylation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105, 10762–10767.
23. Diamond *et al.* A new médium for the axenic cultivation of *Entamoeba histolytica* and other *Entamoeba*. 1978. *Transactions of the royal society of tropical medicine and hygiene*. 72(4).

24. Fang *et al.* Oxytricha telomere-binding protein: DNA-dependent dimerization of the α and β subunits. 1993. Proc. Natl. Acad. (90) pp. 6056-6060.
25. Fujita, K., Horikawa, I., Mondal, A.M., Jenkins, L.M., Appella, E., Vojtesek, B., Bourdon, J.C., Lane, D.P., Harris, C.C., 2010. Positive feedback between p53 and TRF2 during telomere-damage signalling and cellular senescence. Nature Cell Biology 12, 1205–1212.
26. G. S. Do *et al.* Identification and Chromosomal Location of Tandemly Repeated DNA Sequences in *Allium cepa*. 2001. Genes Genet. Syst. 76, p. 53–60.
27. Galati A, Magdinier F, Colasanti V, Bauwens S, Pinte S, *et al.* TRF2 Controls Telomeric Nucleosome Organization in a Cell Cycle Phase-Dependent. 2012. PLoS ONE 7(4): 1-10.
28. Giet, R., Petretti, C., Prevent, C., 2005. Aurora kinases, aneuploidy and cancer, a coincidence or a real link. Trends in Cell Biology 15, 241–250.
29. Gilson *et al.* How telomeres are replicated. 2007. Nature Publishing Group, 825-838.
30. Giraud-Panis *et al.* One identity or more for telomeres. 2013. Frontiers in Oncology. 3:(48), 1-16.
31. Griffith *et al.* Mammalian Telomeres End in a Large Duplex Loop. 1999. Cell. Vol. 97, 503–514.
32. Hiraoka *et al.* Not so peculiar: fission Yeasts telomere repeat. 1998. Trends Brioche Sci. 23(4):126.
33. Hohensinner *et al.* Telomere Dysfunction, Autoimmunity and Aging. 2011. Aging and Disease. 2:(6).
34. Huda, N., Tanaka, H., Mendonca, M.S., Gilley, D., 2009. DNA damage-induced phosphorylation of TRF2 is required for the fast pathway of DNA double-strand break repair. Molecular and Cellular Biology 29, 3597–3604.
35. Ishi, S., Zhou, X.Z., Ziv, Y., Khoo, C., Hill, D.E., Shiloh, Y., Lu, K.P., 2001. Telomeric protein Pin2/TRF1 as an important ATM target in response to double strand DNA breaks. Journal of Biological Chemistry 276, 29282–29291.

36. John R. *et al.* Post-translational modifications of TRF1 and TRF2 and their roles in telomere maintenance. 2012. *Mechanisms of Ageing and Development*. 133 (2012) 421–434.
37. Katherine S. Ralston. Chew on this: Amoebic trophocytosis and host cell killing by *Entamoeba histolytica*. 2015. *Trends Parasite*. 31(9): 442–452.
38. Lenain, C., Bauwens, S., Amiard, S., Brunori, M., Giraud-Panis, M.J., Gilson, E., 2006. The Apollo 50 exonuclease functions together with TRF2 to protect telomeres from DNA repair. *Current Biology: CB* 16, 1303–1310.
39. Loayza, D., Parsons, H., Donigian, J., Hoke, K., De Lange, T., 2004. DNA binding features of human POT1: A nonamer 5'-TAGGGTTAG-3' minimal binding site, sequence specificity, and internal binding to multimeric sites. *Journal of Biological Chemistry* 279, 13241–13248.
40. Lopez-Robles *et al.* Centromeric structure identification in *Entamoeba histolytica* by anticentromeric/kinetochore antibodies obtained from patients with the CREST syndrome. 2000. *Arch Med Res*. S207–S209.
41. Lorenza HA, *et al.* New Assembly, Reannotation and Analysis of the *Entamoeba histolytica* Genome, Reveal New Genomic Features and Protein Content Information. 2010. *PLoS Negl Trop Dis* 4(6): e716.
42. Lúcio H. *et al.* Identification of the telomere in *trypanosoma cruzi* reveals highly heterogeneous telomere lengths in different parasite strains. 1999. *Nucleic Acids Research*. 27:(12) 2451-2456.
43. Marumoto, T., Zhang, D., Saya, H., 2005. Aurora-A a guardian of poles. *Nature Reviews Cancer* 5, 42–50.
44. Masayuki Kimura *et al.* Measurement of telomere DNA content by dot blot analysis. 2011. *Nucleic Acids Research*, 39(12): 1-7.
45. McElligott, R., Wellinger, R.J., 1997. The terminal DNA structure of mammalian chromosomes. *The EMBO Journal* 16, 3705–3714.
46. Meneses *et al.* The R2R3 Myb protein family in *Entamoeba histolytica*. 2010. *Gene*. 1;455(1-2):32-42.
47. Najbauer, J., Johnson, B.A., Young, A.L., Aswad, D.W., 1993. Peptides with sequences similar to glycine, arginine-rich motifs in proteins interacting with

RNA are efficiently recognized by methyltransferase(s) modifying arginine in numerous proteins. *Journal of Biological Chemistry* 268, 10501–10509.

48. Ostendorff, H.P., Peirano, R.I., Peters, M.A., Schluter, A., Bossenz, M., Scheffner, M., Bach, I., 2002. Ubiquitination-dependent cofactor exchange on LIM homeodomain transcription factors. *Nature* 416, 99–103.
49. Park-Sarge, O.K., Sarge, K.D. (2005). Detection of Sumoylated Proteins. *Methods in Molecular Biology* (Clifton, N.J.), 259-895-1:329.
50. Patel *et al.* Shelterin Proteins and Cancer. 2015. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, (16) 3085-3090.
51. Potts, P.R., Yu, H., 2007. The SMC5/6 complex maintains telomere length in ALT cancer cells through SUMOylation of telomere-binding proteins. *Nature Structural & Molecular Biology* 14, 581–590.
52. Raffa *et al.* Organization and evolution of *Drosophila* terminin: similarities and differences between *Drosophila* and human telomeres. 2013. *Frontiers in Oncology*, (3) 112 PP 1-7.
53. Rhodes *et al.* Telomere architecture. 2002. *EMBO report*. (12) pp 1139-1145.
54. Riveron *et al.* Circular and linear DNA molecules in *Entamoeba histolytica* complex molecular karyotype. 2000. *Ear Biopsy's J* 29: 48-56.
55. Rossen Donev, Chapter Three - Telomere Repeat-Binding Factor 2 Is Responsible for the Telomere Attachment to the Nuclear Membrane. Academic Press, *Advances in Protein Chemistry and Structural Biology*, 2015, Volume 101, P. 67-96.
56. Saint-Léger *et al.* The basic N-terminal domain of TRF2 limits recombination endonuclease action at human telomeres. 2014. *Cell Cycle* 13:15, 2469-2479.
57. Sasai, K., Katayama, H., Stennian, D.L., Fuji, S., Honda, R., Kimura, M., Okano, Y., Watseka, M., Suzuki, F., Nag, E.A., Earnshaw, W.C., Brinkley, W.R., Sen, S., 2004.
58. Seimiya, H., Muramatsu, Y., Smith, S., Tsuruo, T., 2004. Functional subdomain in the ankyrin domain of tankyrase 1 required for poly(ADP-

ribosylation of TRF1 and telomere elongation. *Molecular and Cellular Biology* 24, 1944–1955.

59. Sepsiova R. *et al.* Evolution of Telomeres in *Schizosaccharomyces pombe* and Its Possible Relationship to the Diversification of Telomere Binding Proteins. 2016. *PLoS One*. Apr 21;11(4).
60. Slattery, S.D., Mancini, M.A., Brinkley, B.R., Hall, R.M., 2009. Aurora-C kinase supports mitotic progression in the absence of Aurora-B. *Cell Cycle* 8, 2984–2994.
61. Song J. *et al.* Comparing the *Dictyostelium* and *Entamoeba* genomes reveals an ancient split in the conosa lineage. 2005. *PLoS Comput Biol* 1(7): e71.
62. Spengler, D., 2007. The protein kinase Aurora C phosphorylates TRF2. *Cell Cycle* 6, 2579–2580.
63. Sucgang, R., Chen, G., Liu, W., Lindsay, R., Lu, J., Muzny, D., Kuspa, A. (2003). Sequence and structure of the extrachromosomal palindrome encoding the ribosomal RNA genes in *Dictyostelium*. *Nucleic Acids Research*, 31(9), 2361–2368.
64. Tanaka, H., Mendonca, M.S., Bradshaw, P.S., Hoelz, D.J., Malkas, L.H., Meyn, M.S., Gilley, D., 2005. DNA damage-induced phosphorylation of the human telomere associated protein TRF2. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102, 15539–15544.
65. Tannic *et al.* The electrophoretic karyotype of *Entamoeba histolytica*. 1999. *Moll Briche Parasite* 99:41–53.
66. Tawari *et al.* Patterns of Evolution in the Unique Tran Gene Arrays of the Genus *Entamoeba*. 2008. *Moll Biol Evol.* 25(1): 187–198.
67. Valdés *et al.* Molecular Karyotype of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba invadens*. 1990. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene.* 84,537-541.
68. Verdun *et al.* Replication and protection of telomeres. 2007. *NATURE* 447(21): 924-931.

69. Willhoeft *et al.* Fluorescence microscopy and fluorescence in situ hybridization of *Entamoeba histolytica* nuclei to analyse mitosis and the localization of repetitive DNA. 2000. *Molecular and Biochemical Parasitology* (105)291–296.
70. Wood *et al.* 2014 TRF2 and lamin A/C interact to facilitate the functional organization of chromosome ends. *NATURE COMMUNICATIONS* 5:5467 pp. 1-9.
71. Wu, Y., Mitchell, T.R., Zhu, X.D., 2008a. Human XPF controls TRF2 and telomere length maintenance through distinctive mechanisms. *Mechanisms of Ageing and Development* 129, 602–610.
72. Ximenes *et al.* Novelties on Amoebiasis: A Neglected Tropical Disease. 2011. *Journal of Global Infectious Diseases*. Vol 3 (2) pp. 166-174.
73. Ximenez *et al.* Amibiais intestinal: estado actual del conocimiento. 2007. *Med Int Mex*. 23(5):398-407.
74. Yeager, T.R., Neumann, A.A., Englewood, A., Hopscotch, L.I., Noble, J.R., Redden, R.R., 1999. Telomerase-negative immortalized human cells contain a novel type of pyroelectric leukemia (PML) body. *Cancer Research* 59, 4175–4179.
75. Zhou, J., Deng, Z., Norseen, J., Lieberman, P.M., 2010. Regulation of Epstein-Barr virus origin of plasmid replication (OriP) by the S-phase checkpoint kinase Chk2. *Journal of Virology* 84, 4979–4987.
76. Zimmermann *et al.* TRF1 negotiates TTAGGG repeat associated replication problems by recruiting the BLM helicase and the TPP1/POT1 repressor of ATR signaling. 2014. *GENES & DEVELOPMENT*. 28:2477–2491.

12. ANEXOS



Functional analysis of the EhTRF-like III protein of *Entamoeba histolytica*

*Díaz Medina V.*¹, *Álvarez Hernández V.*¹, *Rendón Gandarilla F.J.*¹, *Cárdenas Hernández H.*¹, *Castañeda Ortiz E.J.*¹, *Valdés Flores J.*², *Orozco E.*³, *García Rivera G.*³, *Betanzos-Fernández A.*³, *Cárdenas E.*¹, *Azuara Liceaga E.*¹

¹Posgrado en Ciencias Genómicas, Universidad Autónoma de la Ciudad de México, México DF, México. CP. 06720

²Departamento de Bioquímica, Cinvestav-IPN, México DF, México.

³Departamento de Infectómica y Patogénesis Molecular, Cinvestav-IPN, México DF, México.

E-mail: vanessa00santana@hotmail.com

CONACYT (CB-2014-222956). DMV fellowship UACM. FJRG fellowship CONACYT (247322).

Telomeric Repeat Binding Factors (TRF) bind to double stranded DNA sequences in the telomeres and play a critical role in telomere length regulation, chromosomes end protection, prevent chromosomes fusion, sensors of DNA damage, and regulate senescence or aging. In *Homo sapiens* two paralogues TRF1 and TRF2 bind to specific sequences in the telomeric region. Phylogenetic analysis have shown that *E. histolytica* contains three genes encoding proteins with high identity to TRF proteins dubbed EhTRF-like I, II, and III. In this work we selected and over-expressed the EhTRF-like III protein in *E. histolytica* trophozoites to gain insights into their cellular function in this parasite. Using Western Blot and immunofluorescence assays we observed that EhTRF-like III protein is localized in the nucleus mainly in the perinuclear region. EMSA assays demonstrated that this protein form specific DNA-protein complexes. Finally, we observed a lengthening of the stationary phase in the clones overexpressing the TRF-like III. These data show evidence that EhTRF-like III protein could be involved in the regulation of growth of *E. histolytica*.

Telomere repeat binding factors in *Entamoeba histolytica*

Elisa Azuara Liceaga¹, Vanessa Díaz¹, Helios Cárdenas Hernández¹, David Hernández-Álvarez¹, Elizabeth J. Castañeda-Ortiz¹, Guillermina García Rivera², Esther Orozco², Bibiana Chávez Muguia², Anel Lagunes Guillen², Abigail Betanzos Fernandez², Jesús Valdés Flores³ y Francisco J Rendón Gandarilla¹

¹Posgrado en Ciencias Genómicas, Universidad Autónoma de la Ciudad de México, Mexico City. ²Departamento de Infectómica y Patogénesis Molecular, Cinvestav-IPN, Mexico City. ³Departamento de Bioquímica, Cinvestav-IPN, Mexico City.

*Corresponding author: elisa.azuara@uacm.edu.mx. Posgrado en Ciencias Genómicas. San Lorenzo 290. Col Del Valle. CP.03100

CONACYT (CB-2014-222956). FJRG fellowship from CONACYT (247322), HCH fellowship from BI 080530161142/ICyT/179/2011

Telomeres are specialized structures at the end of chromosomes essential for maintaining genome stability and cell viability. Telomeric repeat binding factors 1 and 2 (TRF1 and TRF2) are telomeric double-stranded DNA binding proteins because of a Myb-like DNA-binding domain (DBD). These proteins regulate telomere length and protect chromosome ends. *E. histolytica* contains three genes encoding for EhTRF-like proteins with significant sequence similarity with higher eukaryotic TRFs in their c-terminal DBD Myb-like (25 to 35%) DBD, but only weak similarity in their N-terminal domains. Multiple alignment of the DBD amino acid sequence from TRF-1, TRF-2 and EhTRF-like proteins, showed that the VDLKDKWRT motive is conserved in the third alpha helix where the lysine and arginine residues are involved in the DNA recognition. In this work we determinate the effect of DNA damage by H₂O₂ treatment in the expression of EhTRF-like proteins. qRT-PCR analysis of trophozoites under basal conditions, and after H₂O₂ treatment showed that *Ehtrf-like* genes overexpress immediately after treatment but only with low concentrations of H₂O₂. By the other hand, we selected and over-expressed one EhTFR-like protein in *E. histolytica* trophozoites and observed its nuclear localization by western blot using subcellular fractions, indirect immunofluorescence and electron microscopy. EhTRF-like protein localize mainly in regions of more condensed chromatin, which suggest an interaction with DNA. These results provide the first evidence that EhTRF-like proteins might participate during damage to DNA protecting telomeric DNA from the instability caused by oxidative stress as telomeric proteins in *Entamoeba histolytica*.

El jurado designado aprobó la Tesis titulada:

“Análisis funcional de una proteína TRF-like de *Entamoeba histolytica*”

que presentó **Vanessa Díaz Medina** el día 27 de febrero del 2018.

Dra. Lilia Lopez Cánovas

Universidad Autónoma de la Ciudad de México
P R E S I D E N T A

Dra. Elisa Irene Azuara Liceaga

Universidad Autónoma de la Ciudad de México
S E C R E T A R I A

Dr. Francisco J. Rendón Garandilla,

Universidad Autónoma de Guerrero
V O C A L

Dr. Jesús Valdés Flores

Cinvestav-IPN
V O C A L