

UACM

Universidad Autónoma
de la Ciudad de México

Nada humano me es ajeno

POSGRADO EN CIENCIAS GENÓMICAS

Identificación de la maquinaria de reparación del DNA
por recombinación homóloga en *Entamoeba*
histolytica y caracterización de la recombinasa
EhRAD51

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTORA EN CIENCIAS GENÓMICAS

P R E S E N T A

M. en C. MAVIL LÓPEZ CASAMICHANA

DIRECTORES DE TESIS

Dr. MARIO CÉSAR LÓPEZ CAMARILLO
Dra. LAURENCE A. MARCHAT

MÉXICO, D.F.

JUNIO, 2008

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.

COMITÉ TUTORIAL

DIRECTOR

Dr. Mario César López Camarillo
Profesor Titular. Posgrado en Ciencias Genómicas
Universidad Autónoma de la Ciudad de México

CO-DIRECTORA

Dra. Laurence A. Marchat Marchau
Profesor Titular. Posgrado Institucional en Biomedicina Molecular
Escuela Nacional de Medicina y Homeopatía del IPN

ASESORES

Dra. María Esther Orozco Orozco
Profesora Titular. Departamento de Patología Experimental
Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN

Dra. Minerva Camacho Nuez
Profesora Titular. Posgrado en Ciencias Genómicas
Universidad Autónoma de la Ciudad de México

Dr. Juan Pedro Luna Arias
Profesor Titular. Departamento de Biología Celular
Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN

El presente proyecto de investigación contó con el apoyo académico y económico de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México.

La mayor parte del trabajo experimental se llevó a cabo en el Laboratorio 2 del Departamento de Patología Experimental del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN, a cargo de la Dra. María Esther Orozco Orozco.

Esta tesis doctoral forma parte del proyecto CONACYT # 54085 "Genómica comparativa y análisis funcional de los mecanismos de recombinación genética homóloga y reparación del DNA en respuesta al daño al DNA en *E. histolytica*" y asimismo recibió financiamiento de fondos provenientes de la COFAA-IPN y el SIP-IPN.

DEDICATORIA

*A la memoria de mi preceptor: Antonio Miguel López Noda, quien
me ha heredado como estigma un modelo a alcanzar*

*A Digna Casamichana Alberti, por su fortaleza, su arduo quehacer
y porque sigue siendo cómplice de mis sueños y coautora de mis
logros*

*A Gerardo Juan Ayala Bonilla, por las enseñanzas, el apoyo, la
comprensión y el amor que me ha regalado durante catorce años*

*A mi hijo, Gerardo Adrián por ser mi esencia, mi orgullo y la razón
tangibile de mis imperecederas ganas de seguir*

AGRADECIMIENTOS

Sin cada una de las personas con quienes tuve el goce de trabajar, coincidir, simpatizar, compartir e incluso disentir en estos años; mi formación de doctorado no hubiese logrado ser tan redituable....

Agradezco a la Dra. Esther Orozco el haberme acogido en septiembre del 2003 en el, aquel entonces, naciente proyecto del posgrado en Ciencias Genómicas de la UACM, y el proporcionarme el espacio, las instalaciones y todas las facilidades para realizar el trabajo experimental dentro de su laboratorio.

Soy deudora de la confianza, el apoyo, la amistad y las valiosas enseñanzas que me brindaron mis tutores César y Laurence, a quienes respeto y admiro.

Agradezco a Minerva su trabajo de asesora, su amistad y su muy familiar convivencia.

Agradezco a Juan Pedro, su asesoría a este trabajo y todas sus interrogantes y fundamentados cuestionamientos.

Expreso de igual modo mi gratitud

A los compañeros profesores del posgrado, con quienes día tras día me ha tocado ejercitar algo nuevo: Ely, Pepe, Liz, Martha, Mauricio, Selene, Sara, Lorena, Humberto y Rosana.

A Sollange y Alfredo por su ayuda en el diseño de las imágenes del artículo.

A Víctor Rosales por su apoyo en los experimentos de Citometría

A todas las generaciones de estudiantes del Posgrado en Ciencias Genómicas por permitirme transmitir mis conocimientos en materia de Bioquímica, en especial a mis alumnas favoritas Itzel López y Olga Nohemí Hernández.

A mis amigos del CINVESTAV, ENMyH, UACM, ICyT y otros lugares:

<i>Angélica Rueda,</i>			
<i>Adela Rendón,</i>			
<i>Abigail Betanzos,</i>	<i>Eduardo Carrillo,</i>		
<i>Beatriz Gallo,</i>	<i>Eduardo Flores,</i>		
<i>Catalina Sánchez</i>	<i>Esther Herrera,</i>	<i>Jessica García,</i>	
<i>Cecilia Bañuelos,</i>	<i>Eric Meneses,</i>	<i>Jorge Guillén,</i>	<i>Mónica Romero,</i>
<i>Doña Ale,</i>	<i>Guadalupe de Dios,</i>	<i>Lorena García,</i>	<i>Carmen López,</i>
	<i>Guille García,</i>	<i>Lourdes Rodríguez,</i>	<i>Rocío Guerrero,</i>
	<i>Israel López,</i>	<i>Máximo Martínez,</i>	<i>Soco Charcas,</i>
		<i>María E. Ramírez</i>	<i>Teresa Guadalupe</i>
		<i>Milenis Curbelo,</i>	<i>y</i>
			<i>Tomás Sánchez</i>

ÍNDICE

pág.

ABREVIATURAS	i
LISTA DE FIGURAS	iv
LISTA DE TABLAS	viii
RESUMEN	ix
I. INTRODUCCIÓN	
1. Antecedentes generales del tema	1
1.1. Mantenimiento de la integridad del genoma	1
1.2. Origen y tipos de daño al DNA	2
1.3. Reparación de las rupturas en la doble cadena del DNA	3
1.4. La recombinación homóloga	5
1.5. Mecanismo molecular de recombinación homóloga en <i>E. coli</i>	9
1.6. El grupo de genes de epistasis <i>RAD52</i>	15
1.7. La familia de recombinasas <i>RECA/RAD51</i>	21
1.8. Organización molecular de la familia <i>RECA/RAD51</i>	25
1.9. Interacciones y regulación de <i>RAD51</i>	28
2. Estado del arte	35
2.1. Generalidades de la amibiasis humana	35
2.2. Epidemiología de la amibiasis	35
2.3. Clasificación taxonómica y evolutiva de <i>E. histolytica</i>	39
2.4. Morfología de <i>E. histolytica</i>	42
2.5. Ciclo de vida de <i>E. histolytica</i>	44
2.6. Virulencia y patogenia de <i>E. histolytica</i>	47
2.7. El genoma de <i>E. histolytica</i>	50
3. Antecedentes particulares del proyecto	53
3.1. Eventos de recombinación genética en parásitos protozoarios	53
3.2. Importancia del estudio de la recombinación homóloga en <i>E. histolytica</i>	56
II. OBJETIVOS	
1. Objetivo general	58
2. Objetivos particulares	59
III. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	
1. Análisis <i>in silico</i>	60

2. Cultivo de trofozoítos de <i>E. histolytica</i>	61
3. Irradiación de los trofozoítos con luz ultravioleta	61
4. Ensayo de TUNEL por citometría de Flujo (FACS)	62
5. Ensayo COMETA	62
6. Preparación de extractos proteicos citoplásmicos y nucleares	65
7. Determinación de la concentración de proteínas	66
8. Electroforesis de proteínas en condiciones desnaturizantes	66
9. Transferencia de proteínas a membranas de nitrocelulosa	67
10. Ensayos de Western Blot	67
11. Extracción de RNA total	68
12. Electroforesis en geles desnaturizantes de agarosa para RNA.	69
13. Obtención del cDNA	70
14. Ensayos de RT-PCR	70
15. Cuantificación de la expresión de los genes	73
16. Preparación de bacterias competentes congeladas	73
17. Obtención de DNA de trofozoítos de <i>E. histolytica</i>	74
18. Amplificación por PCR del gen <i>Ehrad51</i>	75
19. Separación del DNA en geles de agarosa.	76
20. Clonación del gen <i>Ehrad51</i> en el vector de expresión <i>pRSET-A</i> .	76
21. Obtención del DNA plasmídico mediante el método de lisis alcalina (Miniprep)	79
22. Condiciones de la digestión con <i>BamH I</i> y <i>Hind III</i> de la construcción <i>pRSET-Ehrad51</i>	80
23. Secuenciación automática del plásmido <i>pRSET-Ehrad51</i>	81
24. Expresión de la proteína recombinante <i>EhRAD51</i>	81
25. Purificación de la proteína recombinante en condiciones desnaturizantes y nativas por cromatografía de afinidad en columna de <i>Ni NTA</i>	82
26. Electroelución de la proteína <i>EhRAD51</i> .	84
27. Producción de anticuerpos policlonales contra la proteína <i>EhRAD51</i> .	84
28. Inmunolocalización de la proteína <i>EhRAD51</i> en <i>Entamoeba histolytica</i>	87
29. Ensayos de unión de la proteína <i>EhRAD51</i> al DNA	88

30. Ensayo de formación de D-loop para la proteína EhRAD51	89
IV. RESULTADOS	
1. La irradiación de los trofozoítos con luz UV-C (254 nm) 150 J/m ² induce fragmentación del DNA	91
2. La fosforilación temprana de la histona EhH2AX correlaciona con la presencia de daño al DNA	96
3. El genoma de <i>E. histolytica</i> contiene genes homólogos al grupo de epistasis RAD52	100
4. Los genes ortólogos del grupo de epistasis RAD52 de <i>E. histolytica</i> se expresan diferencialmente en respuesta a la irradiación con luz UV-C	102
5. La proteína EhRAD51 predicha conserva la arquitectura típica de la familia RECA/RAD51	105
6. Predicción de la estructura secundaria y terciaria de EhRAD51	111
7. La expresión del mensajero del gen <i>Ehrad51</i> está regulada en las fases del ciclo celular	114
8. Clonación del gen <i>Ehrad51</i> en el vector de expresión PRSET A	116
9. Inducción de la expresión de la proteína recombinante EhRAD51 en <i>E. coli</i> .	119
10. Purificación de la proteína recombinante EhRAD51	121
11. Inmunodetección de la proteína endógena EhRAD51	123
12. Inmunolocalización de la proteína EhRAD51	125
13. Evaluación de la actividad de unión al DNA de la proteína rEhRAD51	128
14. Evaluación de la actividad de apareamiento entre cadenas de DNA homólogas para la proteína rEhRAD51	130
V. DISCUSIÓN	133
VI. CONCLUSIONES	142
VII. APÉNDICE	
1. Soluciones	143
2. Publicaciones	146
VIII. BIBLIOGRAFÍA	168

ABREVIATURAS

A _{260 nm}	Absorbancia a 260 nm
aa	Aminoácido
ATPasa	Enzima que hidroliza el ATP
BLAST	Alineamiento de secuencia tipo local
BrdUTP	Deoxitimidina 5 bromo 2 deoxiuridina 5 trifosfato
BS	Síndrome de Bloom
BSA	Albúmina de suero bovina
C	citosa
cDNA	DNA complementario
CE	Extractos de proteínas citoplásmicas
cols.	colaboradores
cpm	Cuentas por minuto
C-terminal	Extremo carboxilo
c/u	cada uno
D.O.	Densidad óptica
ddH ₂ O	Agua desionizada
ddTPs	Dideoxinucleótidos trifosfatados
DEPC	Dietil pirocarbonato
DNA	Ácido dexosirribonucleico
DNAsa	Enzima que degrada DNA
dNTPs	Deoxinucleótidos trifosfatados
DSB	Ruptura de la doble cadena del DNA
dsDNA	DNA de doble cadena
DTT	Ditiotreitol
ECL	Enzymatic chemiluminiscence
EDTA	Ácido etilén diamino tetraacético
EMSA	Ensayo de retardamiento de la movilidad electroforética
F	Fluorescencia
FACS	Fluorescence-activated cell sorting
FITC	Fluorescein isothiocyanate
g	gramo
g	gravedades
G	guanina

h	hora
H	Homología
HEPES	Ácido 4-(2 hidroxietil)-1-piperazina etano sulfónico
His	histidina
I	Identidad
IgG	Inmunoglobulina tipo G
IMSS	Instituto Mexicano del Seguro Social
IPTG	Isopropil- β -D- tiogalactopiranosido
J	joules
Kb	Kilo base
kcat	Constante catalítica
KDa	Kilodalton
l	litro
Kg	kilogramo
LB	Medio de cultivo Luria-Broth
m ²	metro cuadrado
mA	miliamperes
MDR	Multiresistencia a drogas
MEGA	Molecular Evolutionary Genetics Analysis
mg	miligramo
min	minuto
ml	mililitro
mM	milimolar
MMS	Metil metano sulfonato
<i>n.d.</i>	No determinado
NE	Extractos de proteínas nucleares
NER	Reparación por escisión de nucleótidos
ng	nanogramo
nM	nanomolar
No.	número
N-terminal	Extremo amino
O/N	Durante toda la noche
ORF	Marco de lectura abierto
PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida

pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PDB	Protein Data Bank
PFA	paraformaldehído
pH	Potencial de hidrogeniones
PI	Ioduro de propidio
pm	picomolar
PM	Peso molecular
PSA	Persulfato de amonio
RNA	Ácido ribonucleico
RNA _m	RNA mensajero
RNA _s	Enzima que degrada RNA
rpm	Revoluciones por minuto
rRNA	RNA ribosomal
RT	Retrotranscripción
SDS	Dodecil sulfato de sodio
seg	segundo
Ser	serina
SINAVE	Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica
SSB	Proteína de unión a cadena sencilla de DNA
ssDNA	DNA de cadena sencilla
SUMO	Modificador relacionado con ubiquitinas pequeñas
TA	Temperatura ambiente
TAE	Tris-acetato-EDTA
TBE	Tris-borato-EDTA
TdT	Deoxonucleotil terminal transferasa
TEMED	N,N,N',N', tetrametilen-diamina
TIGR	The Institute for Genomic Research
T _m	Temperatura de alineamiento
Tris	Tris (hidroximetil)-amino-metano
TUNEL	Terminal dUTP nick-end labeling
TYI-S-33	Medio de tripticasa, extracto de levadura, hierro y suero
UBL1	Proteína tipo ubiquitina 1
UV	ultravioleta

UV-C	Radiación ultravioleta tipo C (longitud de onda corta)
V	volt
v:v	volumen a volumen
VSG	Glicoproteína variante de superficie
WHO	World Health Organization
μCi	microcurie
μg	microgramo
μl	microlitro
μM	micromolar
~	aproximado
3' UTR	Región 3' no traducida

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Modelo de rotura en la doble cadena para la recombinación homóloga, elaborado a partir de estudios en <i>S. cerevisiae</i>	pág 7
Figura 2. Micrografía electrónica de DNA de plásmido en proceso de recombinación	8
Figura 3. Papel de RECBCD y RECA en la recombinación homóloga de <i>E. Coli</i>	11
Figura 4. RECA se une al DNA de cadena sencilla para formar el nucleofilamento	13
Figura 5. El complejo MRN de humano localiza, procesa y estabiliza la ruptura en la doble cadena del DNA	18
Figura 6. Representación esquemática de las principales etapas del mecanismo de reparación del DNA por recombinación homóloga en humano, enfatizando la participación de las proteínas del grupo de epistasis RAD52	20
Figura 7. Dominios funcionales de la familia RECA/RAD51.	27
Figura 8. Interacciones descritas de RAD51 humana con otras proteínas	30
Figura 9. Modificaciones postraduccionales descritas para RAD51 humana	34
Figura 10. Casos acumulados por notificación semanal por entidad federativa hasta 2005.	38
Figura 11. Morfología de <i>E. histolytica</i>	43
Figura 12. Ciclo de Vida de <i>E. histolytica</i>	45
Figura 13. Tabla 2 tomada del artículo de Conway y cols., 2002.	55
Figura 14. Representación esquemática de los pasos más importantes en el protocolo para el ensayo Cometa o electroforesis en una única célula	64
Figura 15. Mapa del plásmido pRSET	78
Figura 16. Cromatografía de afinidad en resina de Ni-NTA.	83

Figura 17. Esquema de inmunización para la obtención de anticuerpos policlonales anti-EhRAD51 en conejo	86
Figura 18. Efecto de la irradiación con luz UV-C en la viabilidad de las células	92
Figura 19. Ensayo de TUNEL por citometría de flujo en trofozoítos sometidos o no a irradiación con luz UV-C	93
Figura 20. Ensayo Cometa o Electroforesis en una única célula realizada en trofozoítos sometidos o no a irradiación con luz UV-C	95
Figura 21. Identificación de las histonas H2AX de <i>E. histolytica</i>	98
Figura 22. Inmunodetección de las histonas H2AX de <i>E. histolytica</i>	99
Figura 23. Perfiles de expresión de los RNAm de los genes relacionados al grupo de epistasis <i>rad52</i> en <i>E. histolytica</i>	104
Figura 24. Alineamiento múltiple de la secuencias de proteínas de la familia RECA/RAD51	108
Figura 25. Comparación de la secuencia de EhRAD51 con otras proteínas RAD51	109
Figura 26. Relaciones filogenéticas entre EhRAD51 y otros miembros de la familia RECA/RAD51 de diferentes especies	110
Figura 27. Predicción de la estructura terciaria de la proteína EhRAD51	113
Figura 28. Perfil de expresión de los RNA mensajeros del gen <i>Ehrad51</i> en las diferentes fases del ciclo celular	115
Figura 29. Clonación del gen <i>Ehrad51</i> en el plásmido PRSET-A	117
Figura 30. Electroferograma de la secuenciación del gen <i>Ehrad51</i>	118
Figura 31. Inducción de la expresión de la proteína recombinante EhRAD51 en bacterias BL21(DE3)pLysS	120
Figura 32. Purificación de la proteína rEhRAD51	122
Figura 33. Inmunodetección de la proteína endógena EhRAD51 por Western Blot usando los anticuerpos policlonales anti-EhRAD51	124

Figura 34. Localización subcelular de EhRAD51 en trofozoítos no irradiados (No UV-C) e irradiados (UV-C) luego de 30 min, 3 y 12 h del tratamiento	126
Figura 35. Porcentaje de células positivas para <i>foci</i> de EhRAD51 en trofozoítos no irradiados (No UV) e irradiados (UV-C) luego de 30 min, 3 y 12 h del tratamiento	127
Figura 36. Ensayos de unión al DNA <i>in vitro</i> para la proteína rEhRAD51	129
Figura 37. Ensayo de formación del D-loop catalizado por la proteína rEhRAD51	132
Figura 38. Modelo hipotético para el mecanismo de reparación de DSBs en <i>E. histolytica</i>	141

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Propiedades bioquímicas de las recombinasas RECA de <i>E.coli</i> y RAD51 y DMC1 de humano	pág 23
Tabla 2. Clasificación taxonómica completa de <i>E. histolytica</i>	41
Tabla 3. Oligonucleótidos específicos diseñados para el análisis de la expresión de los genes del grupo de epistasis <i>rad51</i> en <i>E. histolytica</i>	73
Tabla 4. Comparación entre las proteínas predichas para el grupo de epistasis RAD52 en <i>E. histolytica</i> con las proteínas ortólogas de <i>H.sapiens</i> y <i>S. cerevisiae</i>	101
Tabla 5. Valores arrojados por el análisis BLASTP de la secuencia de EhRAD51	106

RESUMEN

En células eucarióticas y procarióticas, la recombinación homóloga es un mecanismo que permite la generación de diversidad genética. Este mismo evento es también usado por las células para reparar de manera apropiada las rupturas en la doble cadena del DNA. El grupo de genes de epistasis *rad52* codifica para una serie de proteínas que participan en la reparación de este tipo de lesiones vía recombinación homóloga, que han sido ampliamente estudiadas en humanos y levaduras. Dentro de este grupo se distingue la recombinasa RAD51 (RECA en *E. coli*), cuya función radica en catalizar la transferencia entre cadenas de DNA promoviendo la búsqueda de homología y el apareamiento entre la cadena de DNA dañada y una hebra homóloga intacta que sirve como templado para reparar la lesión.

En parásitos protozoarios, la recombinación homóloga genera rearrreglos en el genoma que modifican la expresión de genes y ocasionan variación antigénica y multiresistencia a drogas. Ésto permite, a dichos patógenos, burlar tanto la respuesta inmune del huésped como la acción de fármacos usados para el tratamiento de la infección. Sin embargo, en *Entamoeba histolytica*, el protozoario causante de la amibiasis humana, se desconoce totalmente como operan los mecanismos de reparación del DNA y de recombinación homóloga.

En este trabajo, se inició el estudio del mecanismo de reparación del DNA por recombinación homóloga en el eucarionte primitivo *E. histolytica*, usando un modelo de daño al DNA inducido con luz UV-C (150 J/m²). La generación de rupturas en la doble cadena fue monitoreada con ensayos tipo TUNEL y Cometa y con la evaluación del estatus de fosforilación de la

histona EhH2AX. Además, en el genoma de *E. histolytica*, se identificaron los genes homólogos al grupo de epistasis *rad52* de levadura y humano, y se evaluó el perfil transcripcional de dicho grupo de genes en respuesta a la irradiación UV-C. Se evidenció que estos genes se expresan de manera diferencial antes y después del tratamiento genotóxico.

Posteriormente, se caracterizó a la recombinase putativa EhRAD51, la cual conserva la típica arquitectura de las proteínas de la familia RECA/RAD51. Usando anticuerpos policlonales específicos, se inmunodetectó a la proteína EhRAD51 en extractos citoplásmicos y nucleares preparados a partir de trofozoítos sometidos a tratamiento con luz UV-C. Además, con ensayos de microscopía confocal láser, convincentemente se mostró que EhRAD51 se relocaliza después del daño al DNA de manera dispersa en el núcleo de las células formando típicas estructuras conocidas como *foci* de reparación.

Se caracterizó bioquímicamente a la proteína recombinante EhRAD51, y se evidenció que ésta posee actividad de unión al DNA y de apareamiento entre cadenas homólogas *in vitro*.

Estos hallazgos constituyen los esfuerzos iniciales encaminados a comprender los mecanismos de reparación del daño al DNA en *E. histolytica*, contribuyendo así a entender los eventos que regulan la integridad y variabilidad del genoma de este protozoario patógeno.

I. INTRODUCCIÓN

1. Antecedentes generales del tema

1.1. Mantenimiento de la integridad del genoma

En 1953, Watson y Crick resolvieron, ante la mirada atónita del mundo, la estructura del DNA e inminentemente sugirieron un mecanismo para la replicación de esta biomolécula. Sin embargo, en esos tiempos, fue difícil imaginar los mecanismos por los cuales las células son capaces de resguardar la integridad de su genoma y de adaptarse a las condiciones ambientales adversas.

En la mayoría de las células, el DNA es dañado regularmente por mutágenos endógenos y exógenos. En el humano, tanto las reacciones metabólicas normales como factores ambientales pueden causar daños al DNA, alcanzando las 500 000 lesiones de moléculas por célula al día. Aun así, algunos factores causantes de daño pueden hacer que esta tasa sea incluso mayor. Estas cantidades constituyen sólo el 0,0002 % de las 3 mil millones de bases presentes en el genoma; no obstante, una simple lesión sin reparar en un gen relacionado con el cáncer (como un gen supresor tumoral) puede traer consecuencias catastróficas para el individuo. Si los daños en el DNA son reconocidos por las maquinarias celulares, generalmente se activan uno o varios de los puntos de control del ciclo celular, propiciando un paro en la progresión de las fases del mismo. Este evento evita que la célula se replique y se perpetúen las lesiones del DNA en las células hijas, mientras estimula la activación de mecanismos de reparación específicos y recluta proteínas que corrigen las lesiones,

restaurando así la integridad del genoma. Por otro lado, cuando el deterioro es excesivo e irreparable se induce muerte celular programada (apoptosis) o de lo contrario se produce un crecimiento no regulado (Longhese y cols., 2006).

1.2. Origen y tipos de daño al DNA

El daño en el DNA, también denominado daño genotóxico, puede clasificarse de acuerdo a su origen en:

Daño endógeno: Ocurre como resultado del metabolismo celular rutinario en las células; ejemplos son la generación de especies reactivas de oxígeno, el bloqueo de horquillas de replicación durante la fase S del ciclo celular y la división meiótica.

Daño exógeno: Originado por la acción de agentes externos como los rayos ultravioleta [UV de 200-300nm] del sol o radiaciones de otras frecuencias, incluyendo rayos X y rayos gamma. También puede ser generado por la acción de toxinas de plantas, productos mutagénicos sintetizados por el hombre, como los hidrocarburos, tratamientos de quimioterapia y drogas radiomiméticas.

Las lesiones en la molécula de DNA pueden afectar tanto la estructura primaria de la doble hélice, como su configuración espacial, alterando la información genética de las células. A continuación se enlistan los diferentes tipos de daño que pueden afectar al DNA.

- La *oxidación* de bases, por ejemplo: la formación de 8-oxo-7,8-dihidroguanina (8-oxoG) por radicales oxidantes del oxígeno,

- La *alquilación* de bases (normalmente metilación), como la formación de 7-metilguanina,
- La *hidrólisis* de bases, como la depurinación y depirimidinación,
- Los *errores* en el apareamiento entre bases, debido a la incorporación de una base errónea en la cadena de nueva formación durante la replicación del DNA,
- Las *rupturas de cadena sencilla* que ocurren cuando sólo una de las dos hebras de un cromosoma tiene una mella,
- Las *rupturas de cadena doble* formadas cuando las dos hebras del DNA sufren corte.

Todas estas alteraciones pueden ser detectadas y reparadas por mecanismos celulares especializados. Dependiendo del tipo de daño causado, se ejecutan diversas estrategias de reparación para recuperar la información perdida. Estos mecanismos de reparación del DNA son altamente conservados e involucran varias maquinarias moleculares que agrupan a cientos de genes asociados.

1.3. Reparación de las rupturas de la doble cadena del DNA

La lesión más severa que puede sufrir la doble hélice es el rompimiento en ambas cadenas (DSB, por sus siglas en inglés "*double strand break*"). Si este tipo de daño no es reparado, las consecuencias pueden ser letales, debido a la generación de aberraciones y mutaciones devastadoras que constituyen el preámbulo de numerosos síndromes de inestabilidad cromosómica y cánceres en los organismos multicelulares. En general, estos procesos no suceden debido, en parte, a que la integridad del genoma está

resguardada por mecanismos de reparación del DNA (Longhese y cols., 2006).

Las DSBs pueden ser generadas de manera directa por la acción de agentes genotóxicos exógenos como la hidroxiurea (HU) y la radiación ionizante (Krejci y cols., 2003); pero también se ha descrito que los dímeros de pirimidinas formados por la irradiación con luz ultravioleta potencian la formación de DSBs, al bloquear la maquinaria de replicación (Garinis y cols., 2005). Los rompimientos también ocurren de manera espontánea durante la recombinación meiótica para asegurar la segregación cromosomal generando diversidad genética.

Se conoce que en eucariontes, coexisten dos rutas principales de reparación de las DSBs: recombinación entre sitios de DNA homólogo, conocida como recombinación homóloga y la unión de los extremos no homólogos o recombinación no homóloga. La recombinación homóloga es la forma más conservativa de reparación de las rupturas de la doble cadena del DNA; mientras que en la segunda vía se pierden o ganan varios pares de bases en el lugar del corte. La primera es la manera más frecuente de reparación en eucariontes inferiores (ej. *Saccharomyces cerevisiae*) y la segunda en eucariontes superiores, incluyendo los mamíferos (Bhattacharyya y cols., 2004)

Los mecanismos de reparación y recombinación del DNA han sido bien estudiados en *Escherichia coli* y en organismos eucariontes tales como *S. cerevisiae* y *Homo sapiens*.

1.4. La recombinación homóloga

La recombinación homóloga es el proceso normal mediante el cual se reparan las rupturas de la doble cadena en el DNA generadas de manera deliberada como parte de la meiosis, para producir células haploides en los organismos con reproducción sexual. Este sistema de recombinación involucra el apareamiento y sinapsis de los cromosomas homólogos (división meiótica) o de cromátidas hermanas generadas durante el proceso de replicación del DNA (división mitótica). En términos generales, el mecanismo de recombinación homóloga se define como la búsqueda, apareamiento, intercambio y/o regeneración entre secuencias homólogas de DNA. Predomina sobre otros mecanismos de reparación, durante las fases S y G2 del ciclo celular (Delacote y Lopez, 2008)

De manera interesante, algunas de las enzimas que participan en este evento son las mismas que llevan a cabo la reparación del DNA en células somáticas de mamíferos; así como en bacterias. Estas observaciones nos hacen pensar en la cuestión de quien emergió primero: si la recombinación como un medio para generar diversidad genética o la reparación mediada por la recombinación como una manera para mantener la integridad del genoma.

El intercambio genético por recombinación se encuentra altamente conservado a lo largo de la escala evolutiva, se lleva a cabo tanto en animales y vegetales como en procariontes, virus, plásmidos e incluso en el DNA de organelos celulares como las mitocondrias. Por lo tanto, juega un papel central en el crecimiento, desarrollo y adaptación de los organismos (Tomblin y cols., 2002; Conway y cols., 2002).

En 1964, Robin Holliday propuso el primer modelo de recombinación homóloga del cual han surgido muchas variantes. La mayor parte de los indicios apunta a favor de que la recombinación se inicia por una ruptura en ambas cadenas de uno de los dúplex de DNA y el cromosoma homólogo intacto es utilizado como plantilla para reparar el corte por medio de una síntesis de DNA (Delacote y Lopez, 2008; Holliday, 1964). Se conoce que este modelo es aplicable a la recombinación homóloga en procariontes y en eucariontes (Fig. 1).

Los indicios de que los intermediarios de Holliday realmente existen provienen de la Microscopía electrónica de moléculas de DNA de virus y plásmidos, extraídas tanto de células bacterianas como de células animales. Las microfotografías electrónicas en proceso de recombinación muestran estructuras de Holliday isométricas y de cadenas cruzadas como las que aparecen en la figura 2.

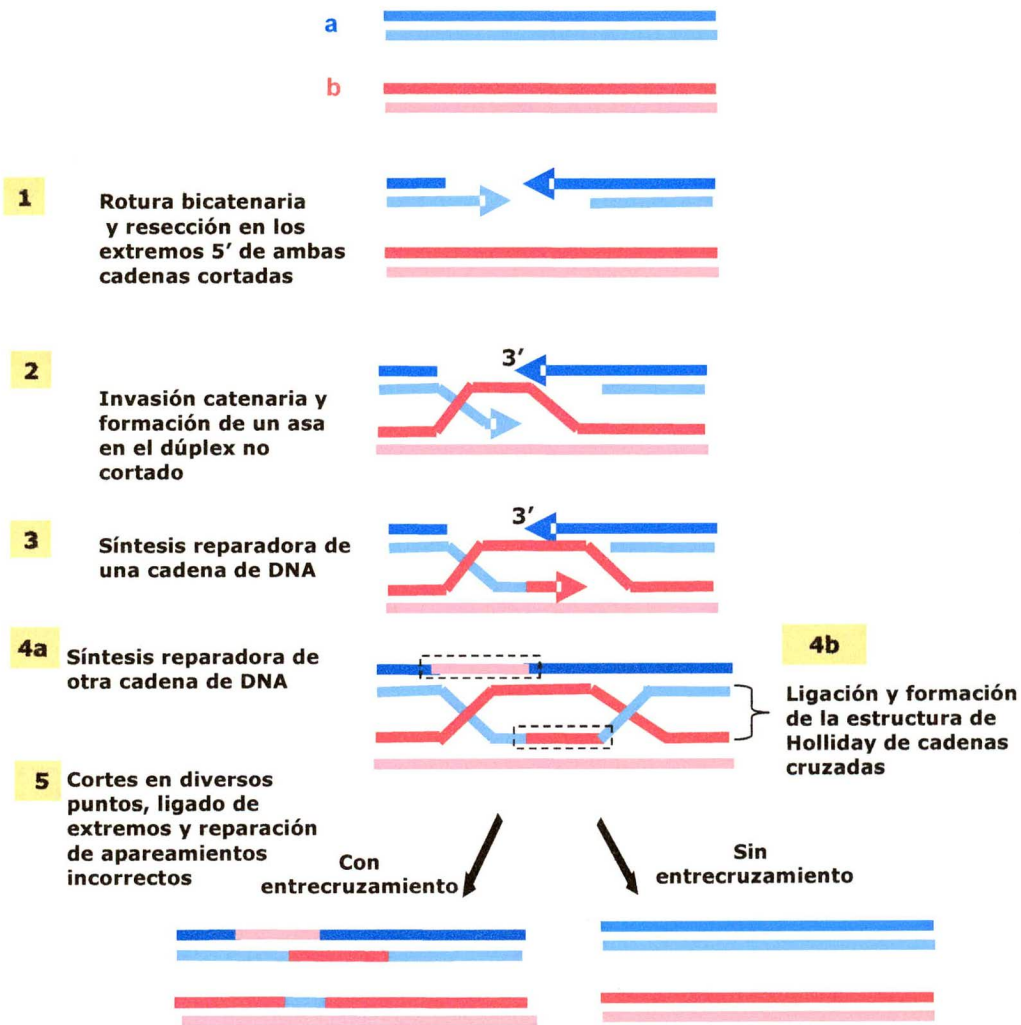


Figura 1. Modelo de rotura en la doble cadena para la recombinación homóloga, elaborado a partir de estudios en *S. cerevisiae*.

Una rotura de la doble cadena tiene lugar en una de un par de moléculas de DNA homólogas alineadas (DNA homólogo **a**); la ruptura se expande para formar una brecha por la acción de exonucleasas 5' 3', generando extremos 3' de cadena sencilla (paso 1). El extremo 3' de una cadena **a** invade entonces al DNA **b** homólogo (paso 2) y es alargado por la DNA polimerasa, que usa como plantilla la cadena complementaria de **b** (paso 3). Luego el extremo 3' de la otra cadena **a** cortada es alargado mediante el uso de la otra cadena **b** como molde (paso 4 a), lo cual produce una estructura intermedia que contiene dos regiones de DNA heterodúplex y dos estructuras de cadenas cruzadas definidas como intermediarios o uniones Holliday (paso 4b). Tras la rotación a la altura de los puntos de entrecruzamiento, cada una de las uniones de Holliday se separa mediante el corte de dos monocadenas y posterior ligación, lo que produce dos moléculas de DNA con o sin entrecruzamiento (paso 5).

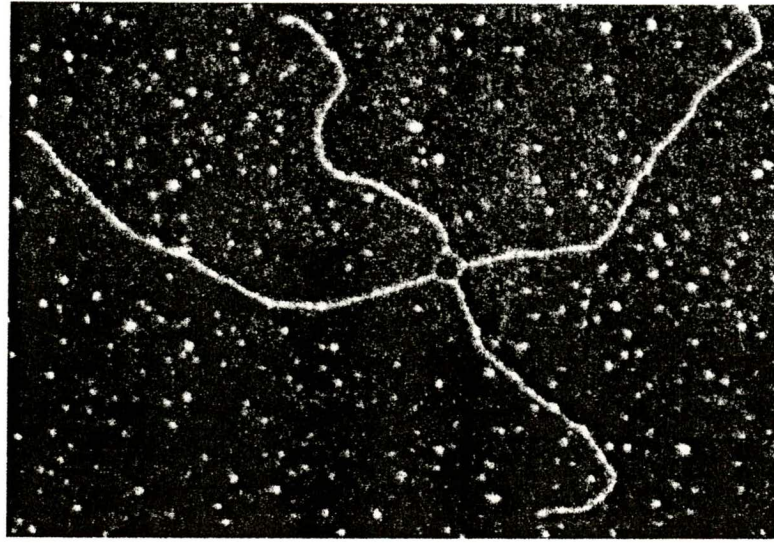


Figura 2. Micrografía electrónica de DNA de plásmido en proceso de recombinación. Se aprecia el anillo monocatenario en el centro de la estructura de Holliday isométrica.

1.4. Mecanismo molecular de recombinación homóloga en *E. coli*

El proceso de recombinación homóloga parece enigmático: crea diversidad genética, pero a la vez, provee una vía importante de reparar el daño en el DNA sin errores. Por más de 20 años, *E. coli* ha constituido un modelo valuable con el cual disertar las etapas moleculares de la recombinación y de la reparación de las roturas del DNA vía recombinación homóloga.

Para niveles normales de recombinación, alrededor de 20 productos génicos son requeridos, incluyendo los codificados por *recA*, *recB*, *recC*, *recD*, *recF*, *recG*, *recJ*, *recN*, *recO*, *recQ*, *recR*, *ruvA*, *ruvB*, *ruvC* y genes *ssb* (He y cols., 2006). Muchas de estas proteínas juegan papeles bien definidos en varias etapas de la recombinación.

Tres mecanismos enzimáticos diferentes, pero relacionados, efectúan la recombinación homóloga en la bacteria *E. coli*. Los tres incluyen el proceso básico de la ruptura de doble cadena ilustrado en la figura 4, para generar una estructura de tipo Holliday que sufre migración de cadenas, seguida por corte con endonucleasa y después la unión de los extremos para producir recombinantes. Nos referiremos ahora a las enzimas encargadas de estos mecanismos: RECBCD, RECA y a las enzimas RUV; para entender cómo se llevan a cabo las reacciones específicas durante el proceso de recombinación homóloga.

- Enzima RECBCD: Este complejo enzimático, compuesto por proteínas codificadas por los genes *recB*, *C* y *D*, participa en la iniciación de la recombinación ya que reconoce de manera específica roturas en la doble cadena del DNA. Estas roturas se producen en forma natural durante la conjugación bacteriana, un proceso en el que se transfiere DNA

cromosómico de una bacteria a otra a través del contacto celular directo, y durante la transducción mediada por bacteriófagos. También pueden producirse por exposición a los rayos X y a ciertos compuestos químicos. El complejo RECBCD posee múltiples funciones: se une a los extremos romos libres de DNA, actúa como helicasa, 3' 5' exonucleasa y 5' 3' exonucleasa. La Figura 3A detalla el mecanismo de inicio de la recombinación por la acción de RECBCD.

- Proteína RECA: Esta proteína codificada por el gen *recA* puede unirse a cualquier DNA de cadena sencilla. En presencia de un DNA dúplex homólogo blanco, el complejo RECA-ssDNA puede realizar dos funciones notables. Primero RECA alinea el ssDNA con su región de DNA homólogo blanco en una cadena dúplex y forma un complejo con ella. Segundo, RECA inserta el ssDNA en el DNA blanco, con lo que desaloja una de las cadenas preexistentes y forma una estructura de tipo Holliday en heterodúplex
- Estudios posteriores demostraron que RECA se unía a los extremos recombinogénicos de cadena sencilla generados por la acción de la enzima RECBCD. En realidad la capacidad de RECA de acoplarse a DNA de cadena sencilla es estimulada por RECBCD, una vez que ha sido activada al atravesar un sitio CHI del DNA. Además RECA tiene actividad enzimática e ATPasa pues en presencia de ATP recubre la región de cadena sencilla y se polimeriza, para formar un filamento que se enrolla a lo largo de todo el extremo recombinogénico que le permite la búsqueda de homología en un DNA homólogo de doble cadena (figura 3B).

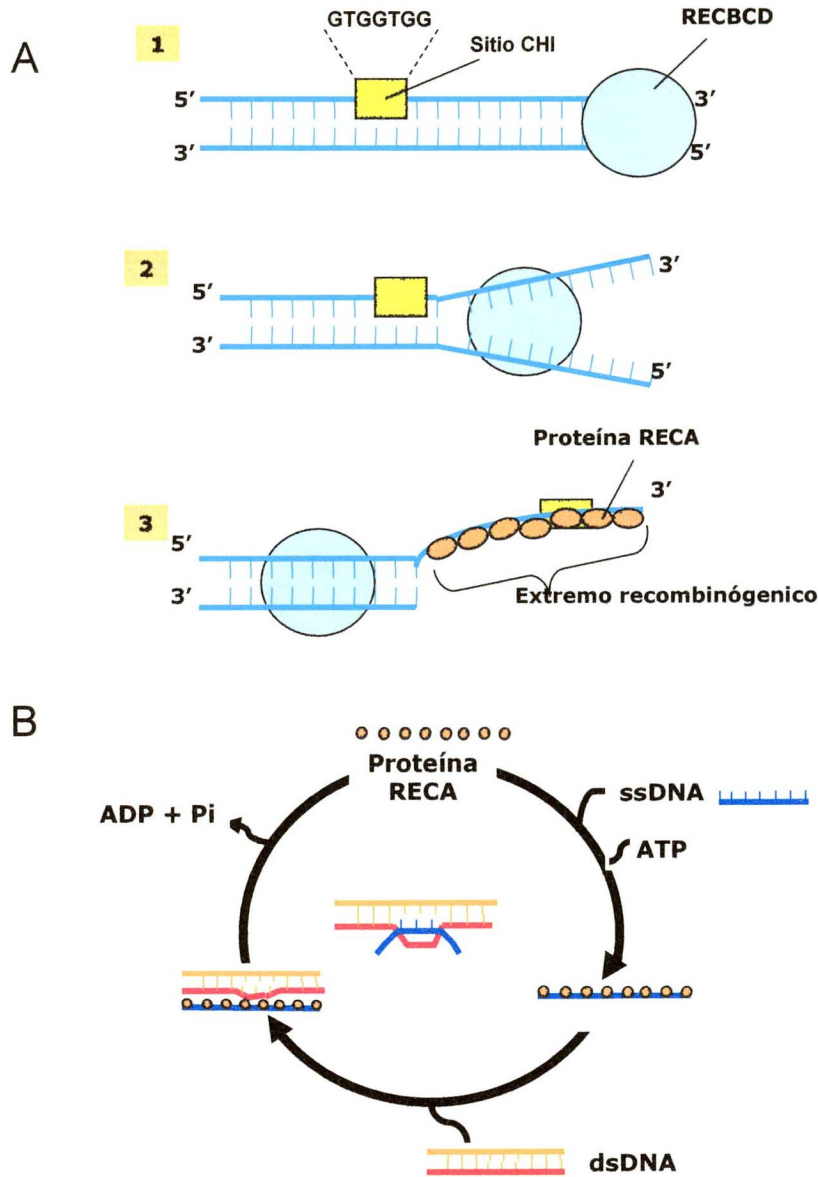


Figura 3. Papel de RECBCD y RECA en la recombinación homóloga de *E. Coli*.

A.

1 La actividad de helicasa de RecBCD desenrolla el DNA y su actividad de exonucleasa degrada ambas cadenas simples

2 En el sitio CHI (regiones del DNA que se recombinan con mayor frecuencia), la actividad de exonucleasa 3' 5' disminuye, la continuación del desenrollamiento y el aumento de la actividad de exonucleasa 5' 3' produce extremos 3' de cadena sencilla.

3 Este extremo 3' recombinógeno se cubre con múltiples monómeros de RECA.

B. Ciclo ATPasa de la proteína RECA necesario para la formación del nucleofilamento y heterodúplex entre secuencias de DNA homólogas.

RECA es una proteína trascendental. Primero, es esencial para la recombinación homóloga y la reparación, porque suscita las interacciones con el DNA, necesarias para el establecimiento de los contactos entre homólogos. Segundo, es el motor que promueve la transferencia de cadenas entre moléculas de DNA. Tercero, provee la unidad estructural: un filamento proteico, con el cual tiene lugar la interacción con el DNA. Finalmente, este filamento constituye el sitio de unión para represores LexA, resultando en su proteólisis y la subsiguiente inducción de más de 20 genes involucrados en la respuesta SOS al daño del DNA.

En los años 60, Jonh Clark probó por primera vez que mutantes de *recA* tenían defectos en la recombinación genética, y asimismo encontró que exhibían una sensibilidad extrema a las radiaciones UV y X. Sorpresivamente, no fue hasta 20 años después, luego que RECA fuera purificada y fueran realizados estudios bioquímicos, que se demostró su capacidad de unirse al DNA y de promover interacciones entre cadenas. Cuando la Microscopía electrónica fue usada para visualizar los complejos RECA-DNA, se observaron estructuras inusuales semejantes a cilindros delgados (figura 4A). El examen detallado de estas estructuras mostró que contienen cerca de 6 monómeros de RECA por vuelta de la hélice y que se extienden aproximadamente 1.5 veces la longitud de un dúplex normal de DNA (figura 4B).

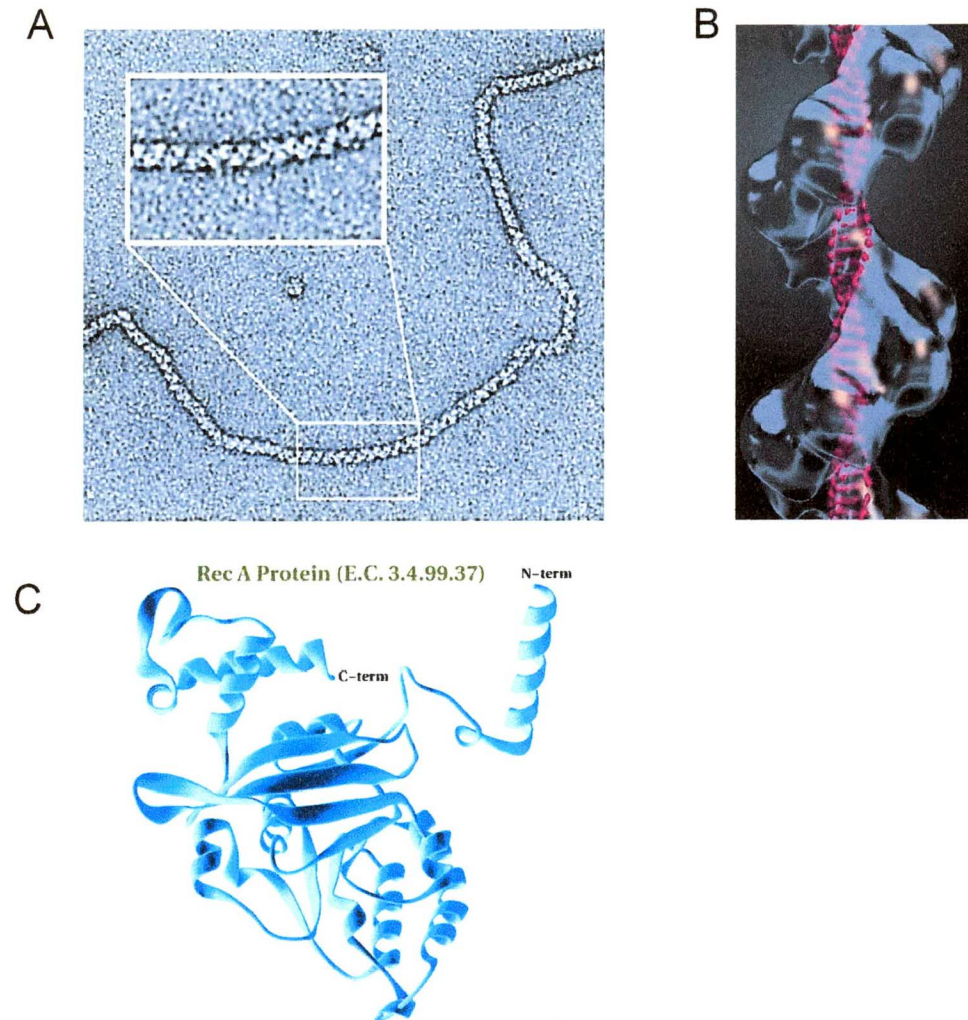


Figura 4. RECA se une al DNA de cadena sencilla para formar el nucleofilamento.

A. Micrografía electrónica del nucleofilamento DNA-RECA de *E. coli*.

B. Modelo tridimensional de interacción del nucleofilamento de DNA-RECA con el dsDNA (rojo), mostrándose los monómeros de RECA en color amarillo

C. Diagrama de la estructura terciaria de RECA resuelta por cristalografía de Rayos X.

Los estudios bioquímicos han revelado que RECA purificada tiene un peso de 37.8 kDa, se une preferentemente al DNA de cadena sencilla (ssDNA) y posee una actividad ATPasa dependiente de DNA con una constante catalítica (kcat) de 30 ATP x min⁻¹ en el ssDNA. También es una poderosa recombinasa, que cataliza apareamientos homólogos eficientes e intercambio de cadenas *in vitro*. La velocidad de intercambio de cadenas para la RECA ha sido estimada de 2 a 10 pb x segundo⁻¹, además ocurre con una polaridad 5' 3' y puede formar más de 6 kb de DNA heterodúplex. Las uniones Holliday formadas por RECA son reconocidas y procesadas por una familia de proteínas que mencionamos a continuación.

- Proteínas RUV: Familia de proteínas que catalizan la migración de ramas o cadenas (RUVA y RUVB) y que promueven el corte en las uniones de Holliday generando las moléculas de DNA resultantes (endonucleasas RUVB).

Estudios realizados demostraron que la RUVA reconoce de forma específica la unión Holliday y la despliega hacia una configuración plana perfecta, que mantiene separados los cuatro segmentos monocatenarios. Esto induce la unión de dos proteínas RUVB hexaméricas anulares con acción helicasa, que rodean al DNA bicatenario y salen por los lados opuestos del complejo de RUVA. Impulsados por la hidrólisis de ATP, los anillos de RUVB actúan como bombas moleculares que arrastran dos DNA de doble cadena hacia adentro del complejo RUVA, separan las cadenas y luego fuerzan los dos heterodúplex hacia fuera del complejo de RUVA. Tras la migración de cadenas, dos endonucleasas RUVB se unen al complejo RUVA/RUVB y luego cortan el intermediario de DNA en dos sitios separados por un ángulo de

180°; el sellado ulterior lo realiza una ligasa y genera moléculas con un segmento de DNA heterodúplex.

1.6. El grupo de epistasis RAD52

Aunque en un principio RECA, RECBCD y RUV A, B y C fueron identificadas en *E. coli*, todas las células eucarióticas producen proteínas de similar estructura y función. Por lo tanto, el mecanismo de acción de la recombinación homóloga se considera muy similar en todos los tipos celulares.

Al igual que en procariontes, en eucariontes existe toda una batería de genes involucrados en la reparación del DNA por recombinación homóloga. Entre los que destacan los genes del llamado grupo de epistasis *rad52* de levadura y humano. En el humano, estos genes codifican para proteínas claves de este proceso -MRE11, RAD50, NBS1, RAD51 y sus parálogos (RAD51B, RAD51C, RAD51D, XRCC2 y XRCC3), RAD52, RAD54 y RAD54B- (Symington, 2002).

El mecanismo de recombinación homóloga en humano consta de varias etapas. Al producirse una ruptura en la doble cadena del DNA, el complejo MRN (MRX en levadura) conformado por tres proteínas (MRE11, RAD50 y NBS1) se une al extremo 5' de los fragmentos rotos, actuando en primera instancia como sensor del daño (figura 5A). Se propone que el complejo MRN forma un anillo alrededor de la cadena de DNA rota, para proporcionarle cierta cohesión (Llorente y Symington, 2004).

Las proteínas RAD50 y MRE11 muestran homología con las proteínas SbcC y SbcD, de *E. coli*. En el humano tanto MRE11 y RAD50 interactúan con una tercera proteína llamada NBS1 (p95 o síndrome Nijmegen Breaks), esta

subunidad parece ser funcionalmente homóloga a la proteína XRS2 de levadura. Esto sugiere que el complejo MRN de eucariontes superiores es el homólogo funcional de RECBCD de bacterias.

La proteína RAD50, que es miembro de la familia de proteínas encargadas de mantener la estructura de los cromosomas o SMC (por las siglas en inglés, structural maintenance of chromosome) es una ATPasa dependiente de DNA. El homólogo RAD50 de humano se pliega sobre sí mismo formado un tallo de 600 Å y dos lóbulos que constituyen la parte funcional para la hidrólisis del ATP. Al ensamblarse en el complejo, RAD50 externa el dominio hook que funciona como un gancho y contiene un par de cisteínas, las cuales junto con un átomo de zinc se enlazan con otra RAD50 formando una estructura de dedos de zinc (Sung y cols., 2000). Por otra parte, la proteína MRE11 es una fosfodiesterasa que tiene dos motivos de unión a DNA y posee actividad endonucleasa y 3' 5' exonucleasa *in vitro*. MRE11 interactúa con sí misma y con RAD50 cerca del dominio de ATPasa formando un heterotetrámero estable. Es importante recalcar que si se pierde la interacción entre los dedos de zinc, se desestabiliza el complejo y la interacción con MRE11 se pierde (figura 5B).

Por otro lado, NBS1 interactúa con el N-terminal de MRE11 a través de su propio extremo C-terminal. Su función aún no es muy clara, parece estar implicada en mantener abierta la horquilla de DNA, además de tener actividad endonucleasa dependiente de ATP (Zhu y cols., 2000).

Otra proteína crucial en las etapas iniciales de la recombinación homóloga es RPA, conocida también como proteína de replicación A o SSB (single strand binding protein) que se une al extremo 3' de la hebra sencilla de DNA, para protegerlo y prevenir la formación de estructuras secundarias.

Esta proteína cede el extremo recombinogénico a la recombinasa central de eucariontes y homólogo de la RECA bacteriana: RAD51. La proteína RAD51 entonces se encarga de formar el nucleofilamento con la cadena sencilla de DNA y de promover la búsqueda de homología y la reacción de intercambio de cadenas con un DNA de doble cadena no dañado, dando origen al heterodúplex o estructura de Holliday, anteriormente descrito. Como RECA, las RAD51 eucarióticas catalizan la formación de filamentos nucleoproteicos y promueven apareamientos homólogos e intercambio entre cadenas (Baumann y West, 1998).

Estudios *in vitro* de caracterización de la actividad recombinasa de RAD51 han demostrado su capacidad de formar estructuras recombinantes, en las que, el filamento de cadena sencilla se une a la proteína RAD51 y se promueve la interacción con sitios homólogos presentes en un DNA de doble cadena intacto generando un híbrido conocido como D-loop (Petukhova y cols., 2000).

A ciencia cierta, los mecanismos de búsqueda de homología e intercambio entre cadenas de DNA homólogas todavía resultan confusos; se cree que esto ocurre a través de colisiones azarosas y que se requiere de un arreglo dinámico del nucleofilamento. La teoría del arreglo dinámico está basada en evidencias experimentales obtenidas mediante ensayos de unión de RAD51 al DNA en presencia de ATP y de ATPγS (un análogo de ATP no hidrolizable).

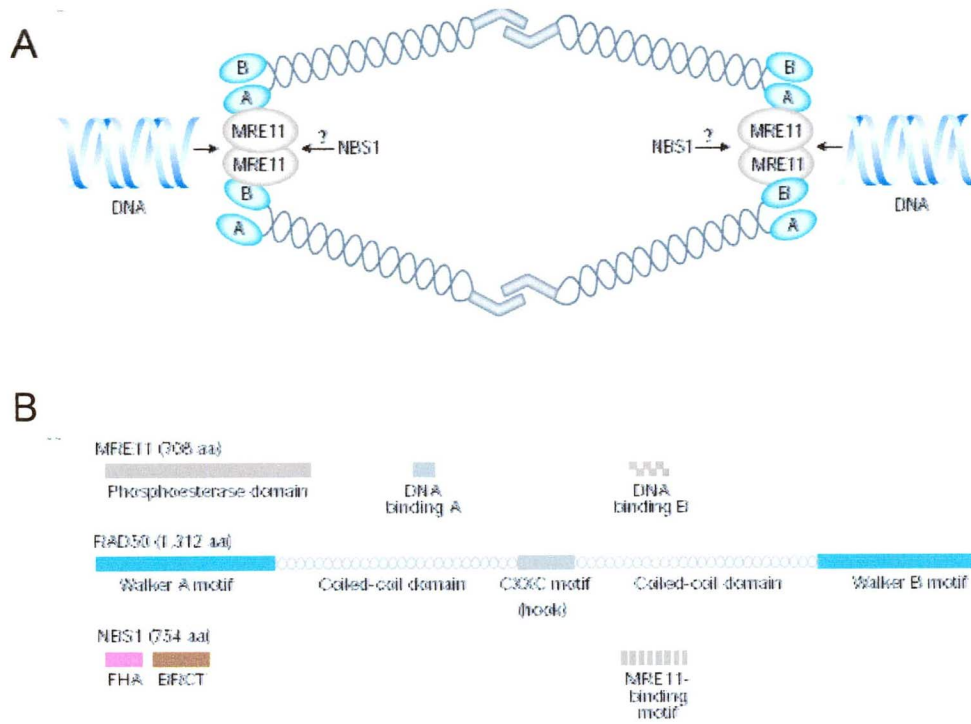


Figura 5. El complejo MRN de humano localiza, procesa y estabiliza la ruptura en la doble cadena del DNA
A. Representación esquemática del complejo MRN asociado a los extremos rotos del DNA.
B. Representación de los diferentes dominios funcionales de las proteínas del complejo MRN de humano.

En estos estudios, se observó un nucleofilamento activo extendido de 90-130 Å en presencia de ATP y uno comprimido e inactivo de menor longitud (65-85 Å) cuando se incubaba con el análogo de ATP no hidrolizable (Ariza y cols., 2005).

Las restantes proteínas del grupo de epistasis RAD52 colaboran en las distintas etapas del mecanismo de recombinación homóloga. RAD52 interactúa con RPA, la proteína de unión al DNA de cadena sencilla y facilita la asociación de RAD51 a la hebra de DNA carente de estructura secundaria contribuyendo así a la formación del nucleofilamento (Shinohara y cols., 1998). Las proteínas RAD51B y RAD51C son parálogos de RAD51 que existen como heterodímeros y parecen actuar como cofactores que ayudan a RAD51 en el reconocimiento de las secuencias con homología entre las cadenas de DNA (Sung, 1997). Numerosos estudios bioquímicos sugieren que los parálogos de RAD51 no tienen funciones redundantes, sino que juegan papeles distintivos en las diferentes etapas de la reparación por recombinación homóloga (Liu y cols., 2007). Por otro lado, RAD54 y su homólogo RAD54B están estructuralmente relacionados con una familia de DNA helicasas (Clever y cols., 1997) y su función precisa es ayudar a la formación de un DNA heterodúplex, que es el intermediario clave en el proceso de recombinación (Petukhova y cols., 2000). En este proceso pueden interactuar también con RAD51 y compensar su baja actividad ATPasa, estimulando así el intercambio entre las cadenas de DNA (Bhattacharyya y cols., 2004). Un diagrama representativo de las diferentes etapas del proceso de reparación por recombinación homóloga en humanos se muestra en la figura 6.

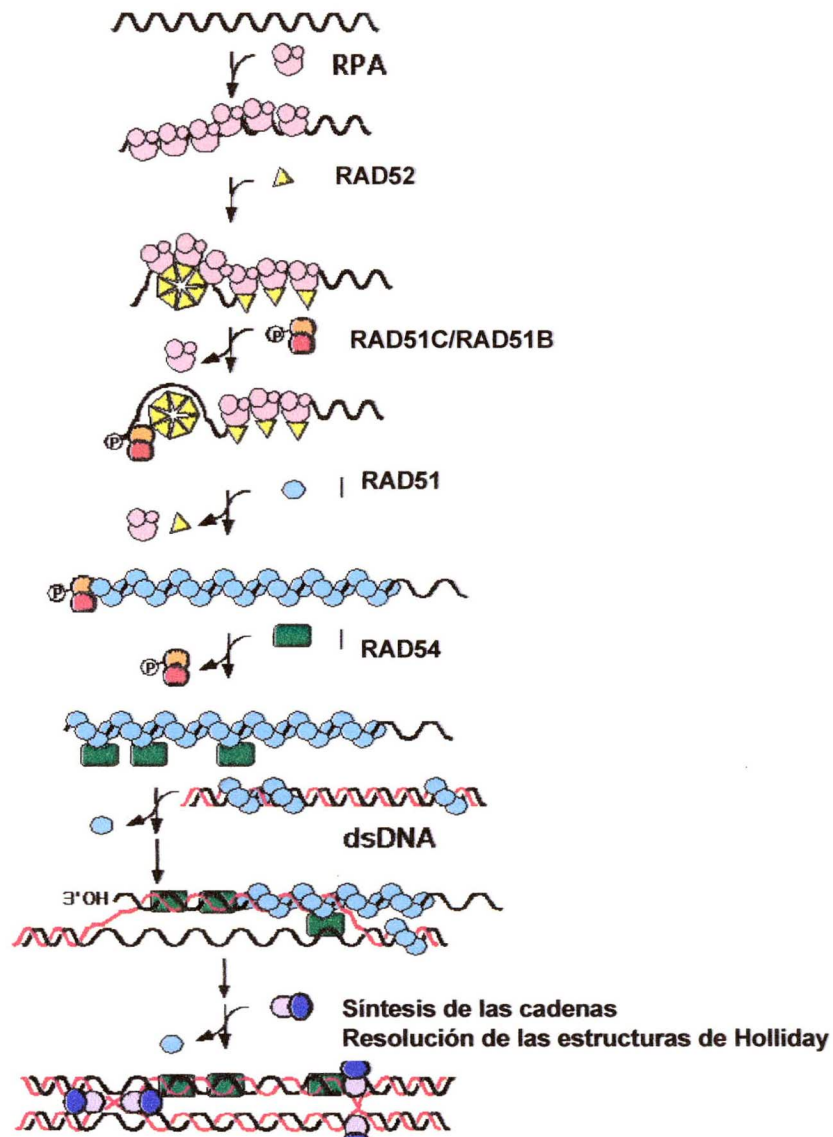


Figura 6. Representación esquemática de las principales etapas del mecanismo de reparación del DNA por recombinación homóloga en humano, enfatizando la participación de las proteínas del grupo de epistasia RAD52. Una vez procesados los extremos 3' por el complejo MRN, estos son protegidos por monómeros de RPA, una proteína de unión al DNA de cadena sencilla que a su vez favorece la unión de RAD52 y la formación de un nucleofilamento con la recombinasa central RAD51. Este complejo activo es capaz de localizar y promover la búsqueda de homología en una cadena complementaria intacta, iniciando el proceso de invasión de cadenas que se ve favorecido por RAD54. Posteriormente se lleva a cabo la síntesis de la cadena dañada y se resuelven las estructuras de Holliday.

1.7. La familia de recombinasas RECA/RAD51

Debido a la importancia de RECA en *E. coli*, la identificación de los homólogos en otros organismos ha sido por muchos años un importante reto en este campo. En arqueobacterias existen dos proteínas, RADA y RADB, que son homólogas a las recombinasas RECA/RAD51. En organismos hipertermofílicos como *Pyrococcus furiosus* y *Sulfolobus solfataricus*, RADA se expresa constitutivamente, contribuyendo así a la reparación del constante daño que sufre el DNA al ser expuesto a altas temperaturas (Qian y cols., 2005). RADA tiene mayor homología tanto en secuencia como en función con la proteína RAD51 que con RECA. Posee actividad ATPasa dependiente de DNA, promueve el apareamiento e intercambio entre cadenas homólogas de DNA y forma un nucleofilamento, similar al formado por RECA/RAD51 (Komori y cols., 2000a). RADB es una proteína pequeña, que sólo posee el dominio central de RECA/RAD51, y aunque es capaz de unirse tanto a cadena sencilla como a la doble de DNA, no tiene actividad de apareamiento o intercambio y posee una baja actividad e ATPasa (Komori y cols., 2000b).

En *S. cerevisiae*, RAD51 fue identificada como homólogo de RECA, inicialmente sobre las bases de la homología en las secuencias (Basile y cols., 1992). Prontamente, Bishop y sus colaboradores (Bishop y cols., 1992) encontraron un gen, definido como *dmc1* (por sus siglas en inglés: disrupted meiotic cDNA), cuyo producto resultó ser esencial para la recombinación meiótica. Asombrosamente, su secuencia fue similar a la de RAD51 y RECA. No obstante, se observó una divergencia considerable en la

secuencia de la región N-terminal, y una región C-terminal prolongada para RECA que está ausente en las otras proteínas.

Numerosos homólogos de ScRAD51 y HsRAD51 han sido identificados en una gran variedad de organismos. De igual manera, los miembros de la familia DMC1 han sido encontrados en *Candida albicans* (DLH1), *Schizosaccharomyces pombe*, *Lilium longiflorum*, *Arabidopsis thaliana*, *Mus musculus* y *H. sapiens*. Interesantemente, hasta la fecha no existe evidencia de la presencia de homólogos DMC1 en *Drosophila* o en *Caenorhabditis elegans* (Pittman y cols., 1998a).

DMC1 y RAD51 poseen características y papeles tanto distintivos como comunes. Por Microscopía electrónica, se ha visualizado que DMC1 aparece en su forma nativa como anillo octamérico con un diámetro de aproximadamente 140 Å y un agujero central de 25 Å (Passy y cols., 1999). A diferencia de RECA, sus homólogos eucarióticos son considerados menos eficientes. Por ejemplo, las proteínas de levadura y de humano muestran velocidades de hidrólisis de ATP casi 100 veces menores a las de RECA. Algunas características específicas de RECA y las RAD51 y DMC1 humanas se presentan con detalle en la tabla 1.

Existen evidencias de la participación de la familia RAD51 en diversos procesos en diferentes organismos. En *S. cerevisiae* ninguno de los miembros de la familia RECA/RAD51 es esencial para la viabilidad de la célula, pero los mutantes muestran extrema sensibilidad a agentes que causan severos daños al DNA, como la radiación ionizante y ultravioleta y el metil metasulfonato (MMS).

Tabla 1. Propiedades bioquímicas de las recombinasas RECA de *E.coli* y RAD51 y DMC1 de humano.

	RECA	HsRAD51	HsDMC1
Peso Molecular (Da)	37 842	36 966	37 707
Forma nativa	Anillo hexamérico	Anillo	Anillo octamérico
Preferencia de unión al DNA	ssDNA >> dsDNA	ssDNA > dsDNA	ssDNA > dsDNA
Unión a ssDNAs	Filamento helicoidal	Filamento helicoidal	Anillos
Unión a dsDNAs	Filamento helicoidal	Filamento helicoidal	Filamento de anillos apilados
Estequiometría	1 monómero: 3 nts	1 monómero: 3 nts	<i>n.d.</i> ^a
ATPasa sobre ssDNA	30 ATP min ⁻¹	0.16 ATP min ⁻¹	1.5 ATP min ⁻¹
Transferencia de cadenas	2-10 pb seg ⁻¹ , > 6 Kb	baja, < 1.5 Kb	Escasa
Polaridad de la transferencia	5' 3'	3' 5'	3' 5'
Estimulada por	SSB	RPA, RAD52	<i>n.d.</i> ^a

^a *n.d.* no determinado

Los mutantes de *rad51* muestran bajos niveles de replicación mitótica y meiótica, mientras los mutantes de *dmc1* muestran defectos en las funciones exclusivamente de la división meiótica, por lo que acumulan DSBs y reducen la formación de los complejos sinápticos (Game, 1993).

La generación de un transgen inducible de RAD51 en la línea celular DT40 de pollo (Sonoda y cols., 1998) permitió realizar una importante observación: la eliminación de RAD51 se acompaña de una acumulación de roturas cromosomales espontáneas. Entonces se habló de un posible papel de RAD51 en el mantenimiento y/o la reparación de las horquillas de replicación. Interesantemente, los knockouts *rad51*^{-/-} homocigotos en ratón exhiben un fenotipo embrionario letal, indicando un papel esencial de RAD51 en el desarrollo (Lim y Hasty, 1996); mientras que los mutantes knockouts *dmc1*^{-/-} son viables pero estériles, con órganos reproductores más pequeños que los normales (Pittman y cols., 1998b). En *Arabidopsis*, la inactivación de DMC1 también resulta en infertilidad (Yoshida y cols., 1998). En mamíferos los genes *rad51* y *dmc1* codifican proteínas de considerable similitud estructural a las de *S. cerevisiae* (Shinohara y cols., 1993). Sin embargo, los otros 5 integrantes de la familia RECA/RAD51 en humano (XRCC2, XRCC3, RAD51B, RAD51C y RAD51D) aumentan considerablemente la diversidad de funciones en esta estirpe de proteínas (Tambini y cols., 1997; Cartwright y cols., 1998).

Por lo demás, se ha reportado que existe una interacción directa entre las proteínas RAD51 y XRCC3 en humano (Liu y cols., 1998), probablemente vinculada con la formación de complejos reparadores nucleares.

1.8. Organización molecular de la familia RECA/RAD51

Las proteínas de la familia RECA/RAD51 presentan una organización molecular muy similar y altamente conservada a lo largo de la escala evolutiva. Todas ellas poseen un dominio ATPasa muy conservado. Este dominio ha sido encontrado en la F_0F_1 -ATP sintasa (proteína que se encarga de la síntesis de ATP) y en diversas helicasas, lo que sugiere que éstas divergen de un antecesor común (Shin y cols., 2003). En el dominio ATPasa, se ha identificado los motivos funcionales Walker A y Walker B, que son sitios de unión a ATP y a DNA, también los motivos de unión a DNA denominados Loop 1 y Loop 2, siendo este último importante para la formación del nucleofilamento y la polimerización de la proteína (Figura 7).

En el extremo N-terminal las proteínas RADA de arqueobacterias y RAD51 de eucariontes poseen un dominio muy conservado que tiene la función de unión al DNA. De manera interesante, en la proteína RECA de bacterias, este dominio se localiza en el extremo C-terminal. Aunque no existe una aparente homología de secuencia entre el dominio N-terminal de RADA y RAD51 y el dominio C-terminal de RECA, se ha reportado que contiene regiones específicas para la unión tanto a DNA de cadena sencilla como doble (Yang y cols., 2001) (Fig. 7).

En eucariontes unicelulares el estudio de las proteínas homólogas a RECA, se ha enfocado principalmente a levaduras. Pero se han descrito homólogos de RAD51 en *S. pombe*, en *Trypanosoma brucei*, parásito africano causante del mal del Sueño (Conway y cols., 2002) y en el protozooario ciliado *Tetrahymena thermophila* (Campbell y Romero, 1998). En *Entamoeba*

histolytica no se ha caracterizado ni se ha encontrado un homólogo de RAD51 hasta el presente trabajo.



Figura 7. Dominios funcionales de la familia RECA/RAD51. Representación esquemática de los dominios funcionales descritos para algunas proteínas de la familia de proteínas RECA/RAD51.

- ND: dominio del extremo N-terminal,
- AD: dominio de ATPasa,
- CD dominio del C- terminal de EcRECA,
- Motivo de Polimerización PM ●
- Walker ● A y ● B
- Loop 1 ● y Loop 2 ●

1.9. Interacciones y regulación de RAD51

La importancia de las interacciones de RAD51 en mamíferos se ha magnificado con los hallazgos de su colocalización con la proteína supresora de tumores p53 en humano, que juega un papel central en el control del ciclo celular y la apoptosis. Esto sugiere que RAD51 podría estar participando en el monitoreo del ciclo celular y la muerte celular programada. En ratones se ha observado las drásticas consecuencias de la mutación de *rad51*; de manera relevante, estos efectos son suprimidos por una mutación en el gen *p53* (Lim y Hasty, 1996). Más recientemente, se ha descrito que p53 controla la recombinación tanto *in vitro* como *in vivo*, y que su inactivación resulta en el incremento de la recombinación homóloga ya sea espontánea o inducida por estrés genotóxico (Susse y cols., 2000). Asimismo, este evento parece ser totalmente independiente de su actividad como factor de transcripción y su subsiguiente participación en el punto de control G1/S del ciclo celular. Estudios de mapeo *in vitro* indicaron que RAD51 puede unirse a dos regiones de p53, una que comprende entre los aminoácidos 94 y 160 y la segunda entre los aminoácidos 264 y 315 (Sengupta y cols., 2003). En este mismo contexto, p53 también interactúa físicamente con la proteína RAD54 a través de su extremo C-terminal. Se ha demostrado que p53 es capaz de controlar el proceso de recombinación homóloga vía la interacción directa e inhibición de la recombinasa central RAD51.

Por otro lado, los productos génicos supresores de tumores BRCA1 y BRCA2, relacionados con la susceptibilidad al cáncer de mama, también se asocian específicamente a RAD51 (Marmorstein y cols., 1998).

Es bien conocido que, como consecuencia de la acción de agentes que causan daño al DNA o inhibidores de la replicación, la proteína RAD51 se relocaliza en puntos focales dispersos dentro del núcleo, que se conocen como *foci* nucleares, los cuales representan las regiones del DNA donde se encuentra activa la maquinaria de reparación por recombinación homóloga (Slupianek y cols., 2001). En ausencia de estrés, RAD51 se encuentra tanto en el núcleo como en el citoplasma de la célula. Empero, estudios recientes revelan que dicha recombinasa es mayoritariamente citoplásmica en células deficientes en BRCA2, lo cual sugiere que RAD51 puede ser translocada al núcleo por la proteína BRCA2, luego de daño al DNA (Davies y cols., 2001). Además, se ha visto que RAD51 interactúa con BRCA1, probablemente vía la asociación con BRCA2 (Scully y cols., 1997). En fibroblastos de ratón, BRCA1 es necesaria para la formación de *foci* nucleares de reparación (Bhattacharyya y cols., 2000). Sin embargo, esto no sucede en la línea celular HCC1937 (Zhong y cols., 1999). Asimismo, se ha demostrado que la inactivación de los genes *brca1* y *brca2* afecta directamente la recombinación homóloga dependiente de la formación de DSBs; por lo tanto, a diferencia de p53, las proteínas BRCA1 y BRCA2 tienen un efecto pro-recombinogénico (Dabousi F y cols, 2002).

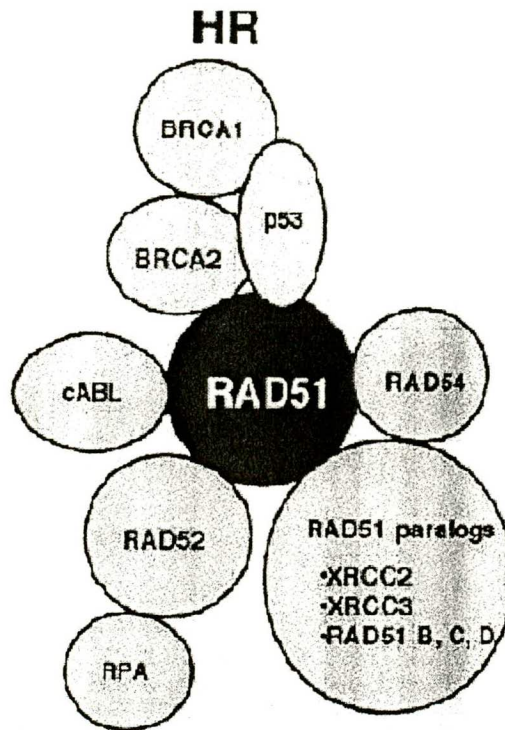


Figura 8. Interacciones descritas de RAD51 humana con otras proteínas. HsRAD51 interactúa con las proteínas mutadas en cáncer de mama BRCA1 y BRCA2, el supresor de tumores p53, la cinasa de tirosinas cABL y las proteínas de reparación por recombinación homóloga RAD54, RAD52, RPA, RAD51B, RAD51C, RAD51C, XRCC2 y XRCC3.

El Síndrome de Bloom (BS) es un desorden autosómico recesivo raro caracterizado por retraso en el crecimiento, inmunodeficiencia, inestabilidad genómica y desarrollo temprano de cáncer de muchos tipos. BLM, la proteína codificada por *blm*, el gen mutado en BS, se localiza normalmente en el núcleo y está ausente en las células con BS. La proteína RAD51 también ha sido relacionada con la helicasa BLM, de hecho ésta participa en el mecanismo de recombinación homóloga resolviendo las estructuras de Holliday. Se conoce que BLM forma un complejo con la recombinasa RAD51 para actuar sobre los intermediarios de DNA que se forman durante la recombinación homóloga incluyendo las uniones Holliday (Neff y cols., 1999). Posteriormente, Braybrooke y colaboradores reportaron que BLM, se asocia, también, directamente con RAD51D (también conocida como Rad51L3) y que esta interacción se efectúa a través del dominio N-terminal de BLM (Braybrooke y cols., 2003).

En estudios realizados en humano, se le ha atribuido un nuevo papel a BCL-2, el oncogen sobreexpresado en los linfomas de células B foliculares como resultado de la translocación (14:18) (Saintigny y cols., 2001). En células CHO de hámster y en linfocitos de ratón, BCL2 inhibe específicamente la vía de recombinación dependiente de RAD51 (Bakhshi y cols., 1985). Interesantemente, la sobreexpresión de BCL2 no modifica ni la cantidad de RAD51 intracelular ni su localización (Saintigny y cols., 2001) y pareciera que lo que se afecta es el patrón de cargas de las isoformas de RAD51 bajo estas condiciones experimentales.

RAD51 es blanco de diferentes regulaciones a nivel postraduccional en células eucarióticas. Usando el sistema de doble híbrido, se ha encontrado que RAD51 interactúa con UBC9/UBE2I, una proteína perteneciente a la

familia de las enzimas conjugadoras de ubiquitina (Kovalenko y cols., 1996). Por otra parte, RAD51 interactúa con UBL1 (ubiquitin-like protein 1) y con SUMO 1 (small ubiquitin-related modifier 1) (Shen y cols., 1996). Se ha visto que la sobreexpresión de UBL1 regula negativamente el proceso de reparación de DSBs por recombinación homóloga en células CHO y reduce la resistencia a la radiación ionizante en los cultivos celulares HT1080 (Li y cols., 2000).

Particularmente, durante la apoptosis, RAD51 puede ser degradada por la caspasa 3 siendo el producto de esta proteólisis incapaz de mostrar actividad recombinasa (Huang y cols., 1997).

La fosforilación es otra forma importante de regular a RAD51. La cinasa de tirosinas cABL es activada por diferentes tratamientos genotóxicos, incluyendo radiación ionizante y luz UV. Estas condiciones inducen la fosforilación de RAD51 por la acción de cABL (Chen y cols., 1999). La fosforilación de tirosinas en RAD51 conduce a una aparente paradoja. Por un lado, la fosforilación *in vitro* del residuo tirosina 54 de HsRAD51 o ScRAD51 inhibe su unión a la cadena sencilla del DNA y también inhibe la actividad de intercambio de cadenas de ScRAD51 (Yuan y cols., 1998). Mientras, por el contrario, la fosforilación dependiente de cABL de la tirosina 315 de RAD51 aumenta significativamente la interacción de RAD51 y RAD52, lo cual facilita y potencia la recombinación homóloga (Chen y cols., 1999). Ciertas hipótesis tratan de conciliar estos aparentes resultados contrastantes. Una de ellas plantea que, dependiendo del sitio de fosforilación de RAD51, la recombinación homóloga puede ser estimulada o inactivada. Otra hipótesis es que la inhibición de la actividad de unión al DNA podría ayudar al recambio de la proteína cuando el intercambio de

cadena ha sido completado (Kharbanda y cols., 1997; Shangary y cols., 2000). Finalmente, estudios recientes realizados en líneas celulares que no expresan la cinasa cABL, revelaron la presencia de altos niveles de RAD51 fosforilada. Interesantemente, las fosforilaciones no tenían lugar ni en la tirosina 315 ni en la 54, lo cual sugiere que otras proteínas cinasas pueden fosforilar en otros sitios a la RAD51 (Chen y cols., 1999).

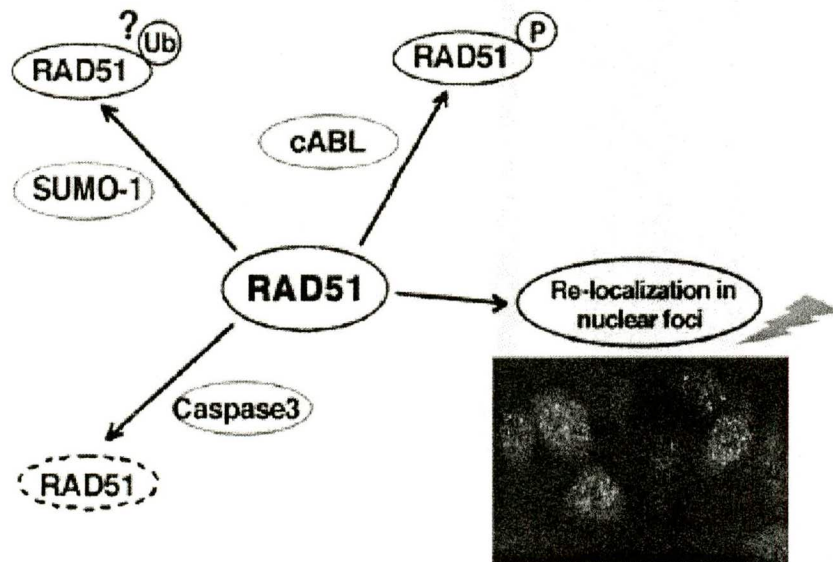


Figura 9. Modificaciones postraduccionales descritas para RAD51 humana. RAD51 es blanco de fosforilaciones por cABL, ubiquitinación vía SUMO-1 y degradación por la Caspasa 3.

2. Estado del arte

2.1. Generalidades de la amibiasis humana y de *Entamoeba histolytica*

Existen múltiples especies de protozoarios parásitos del género *Entamoeba* que infectan a los humanos; sin embargo, *E. histolytica* es la única especie conocida que causa enfermedad.

La amibiasis es considerada una enfermedad infecciosa que se manifiesta clínicamente como disentería intestinal y como amibiasis extraintestinal (Marion y Guillen, 2006). El período de incubación de la amibiasis intestinal puede variar desde pocos días hasta meses o años, siendo generalmente de 1 a 4 semanas. Cuando el parásito invade el epitelio intestinal causa una serie de alteraciones anatómicas, correspondientes a cuadros clínicos bien definidos que se conocen como colitis ulcerativa amibiana, ameboma o granuloma amibiano y apendicitis amibiana (Tanyuksel y Petri, Jr., 2003). Por otro lado, bajo ciertas condiciones, el parásito puede llegar a otros órganos, provocando la amibiasis extraintestinal. A su vez, la amibiasis hepática es la segunda manifestación clínica más importante y se caracteriza por la presencia de abscesos en una o más áreas grandes de necrosis.

2.2. Epidemiología de la amibiasis

E. histolytica es el parásito protozoario entérico responsable de la amibiasis humana. Está presente en el tracto gastrointestinal del 10 al 20% de la población mundial y constituye la segunda causa de muerte por

enfermedades parasitarias en el mundo, puesto que produce el deceso de más de 500 000 personas al año. Según las cifras actuales, reportadas por la Organización Mundial de la Salud (OMS), la incidencia de esta enfermedad es superior en países subdesarrollados y en aquellos en vías de desarrollo (WHO, 1997). A nivel mundial, se ha identificado áreas geográficas endémicas de alta incidencia para esta enfermedad, entre las que se encuentran el sur de África y Asia, el medio Oriente, el sur y centro de América y México (Ravdin, 2000). Ésto, básicamente, es debido a las condiciones de insalubridad en que subsisten los sectores marginados de la población; como carencia de agua potable, condiciones sanitarias inadecuadas, aunados a la falta de higiene y al manejo incorrecto de los alimentos. En países industrializados, como los Estados Unidos, se estima que el 3% de la población es portadora del parásito y principalmente se manifiesta la enfermedad en los inmigrantes, las personas con inmunodeficiencias, así como en los viajeros que visitaron zonas endémicas para la amibiasis (Tanyuksel y Petri, Jr., 2003).

En México, la amibiasis es considerada un severo problema de salud pública, ya que se encuentra entre las diez primeras causas de mortalidad infantil por problemas gastrointestinales. Un estudio realizado en mexicanos reveló que el 8.4% de la población resulta ser seropositiva para antígenos de *E. histolytica*, siendo estos índices mucho más elevados en las zonas rurales donde no existe drenaje ni agua potable (Conde-Bonfil y Mora-Zerpa, 1992; Caballero-Salcedo y cols., 1994). Además, la prevalencia es muy alta en niños en edad escolar debido, probablemente, a la transmisión del parásito en los centros escolares por la falta de adecuados hábitos de higiene (Cinfuentes y cols., 1994).

De acuerdo a los reportes del Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica (SINAVE) la amibiasis es la quinta causa de morbilidad en México. Tan sólo en el año 2005, se registraron unos 762 937 casos en hombres y mujeres. Cuando estas estadísticas se fraccionaron por grupos de edades se observó que los niños de 1 a 4 años y los adultos de entre 25 y 44 años de edad son los más afectados con 150 372 y 146 102 casos, respectivamente (Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica, 2005). Asimismo, existe una proporción de un paciente con amibiasis invasiva por cada cuatro o cinco portadores asintomáticos (Caballero-Salcedo y cols., 1994) y se estima que de la población mexicana total, el 20 % es portador, el 2% se encuentra enfermo y entre el 0.1 a 0.2 % de los enfermos muere. Ésto equivale a 16 millones de portadores, 1.3 millones de enfermos y de 10 a 30 mil muertes (Conde-Bonfil y Mora-Zerpa, 1992); de igual modo, estas cifras indican que, a pesar de los esfuerzos gubernamentales para difundir una cultura de la salud, la amibiasis sigue siendo un padecimiento con gran impacto en nuestro país.

La Secretaría de Salud reveló en su Boletín epidemiológico (<http://www.ssa.gob.mx>) los casos acumulados de amibiasis intestinal y abscesos hepáticos amibianos por entidad federativa hasta el año 2005, los cuales se muestran en la figura 1 A y B. En el Distrito Federal, las poblaciones de zonas marginales son más propensas a infecciones por amibiasis debido a las precarias condiciones de salubridad. Los asentamientos irregulares carentes de agua potable y servicios de drenaje constituyen focos que conjuntamente con el expendio informal de alimentos preparados contribuyen a la propagación del parásito.

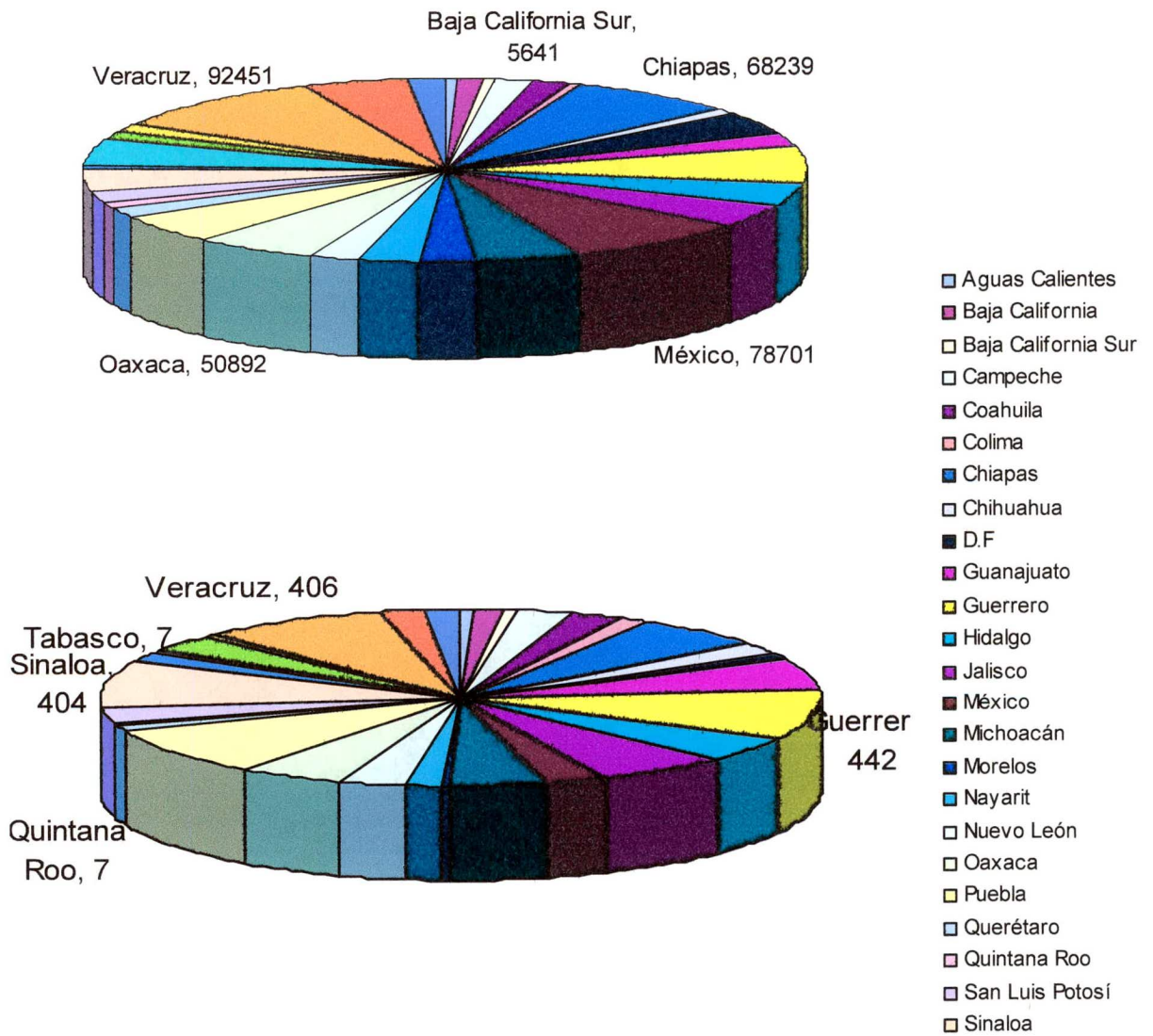


Figura 10. Casos acumulados por notificación semanal por entidad federativa hasta 2005.

- A.** Amibiasis intestinal
- B.** Absceso hepático

2.3. Clasificación taxonómica y evolutiva de *E. histolytica*

Los seres vivos han sido clasificados principalmente en seis grandes reinos: *Eubacteria*, *Archaeobacteria*, (procariontes) y *Protista*, *Plantae*, *Fungi* y *Animalia*, que constituyen los organismos eucariontes. *Entamoeba histolytica* se ubica en el Reino *Protista* en el Subreino *Protozoa*, el cual incluye cerca de 65 000 especies, de las cuales más de la mitad son fósiles y aproximadamente 10 000 son parásitos (Levine y cols., 1980).

De este subreino se han definido siete *phyla* diferentes, los cuales incluyen: *sarcomastigophora*, *labyrinthomorpha*, *apicomplexa*, *microspora*, *ascetospora*, *myxospora* y *ciliophora*. En la clasificación taxonómica de *E. histolytica*, varios autores concuerdan en que pertenece al reino *Protista*, subreino *Protozoa*, *phyla Rhizopoda*, pues presenta pseudópodos por lo menos en uno de los estadios de su ciclo de vida (Petri, Jr., 2000) y al género *Entamoeba*, cuyos miembros son todos parásitos. La clasificación completa de este protozoario se muestra con detalle en la Tabla 2.

Algunos reportes señalan que *E. histolytica* es una reliquia viviente de la fase temprana de la evolución de los organismos eucariontes, la cual ocurrió antes que la simbiosis de la promitocondria emergiera (Esteve y Gaju, 1999). No obstante, la existencia o ausencia de mitocondrias en este parásito sigue siendo un tema de debate. Mediante análisis filogenético y estructural, Clark y Rogers (Clark y Roger, 1995) sugieren que *E. histolytica* carece de mitocondrias y que esta ausencia es reflejo de una pérdida secundaria del organelo más que a un estado primitivo del microorganismo. Las características estructurales tales como ausencia de mitocondrias, peroxisomas y dictiosomas típicos y de un aparato de Golgi son comunes en

los eucariontes primitivos. No obstante, los avances más recientes en la secuenciación del genoma de *E. histolytica* han permitido la identificación de genes que codifican proteínas putativas típicas de la mitocondria y de manera experimental la detección de proteínas y DNA en organelos subcelulares diferentes del núcleo, indicando que este organismo puede tener un compartimiento similar (Muñoz y cols., 1991; Mendoza y cols., 2003).

Con base en el análisis de los datos que emergen de los diversos proyectos de secuenciación de genomas completos y apoyándose de manera conjunta en las características morfológicas, fisiológicas y genéticas sería conveniente reevaluar y establecer de manera más precisa la posición taxonómica y filogenética de *E. histolytica*.

Tabla 2. Clasificación taxonómica completa de *E. histolytica*

REINO:	<i>Protista</i>
SUBREINO:	<i>Protozoa</i>
PHYLUM:	<i>Rhizopoda</i>
CLASE:	<i>Loposea</i>
SUBCLASE:	<i>Gymnamoebida</i>
ORDEN:	<i>Amoebida</i>
SUBORDEN:	<i>Tubulina</i>
FAMILIA:	<i>Entamoebidae</i>
GÉNERO:	<i>Entamoeba</i>
ESPECIE:	<i>histolytica</i>

2.4. Morfología de *E. histolytica*

E. histolytica es un organismo eucarionte que puede llegar a contener varios núcleos, también tiene un citoplasma con numerosas vacuolas (Ravdin, 2000) y posee un genoma complejo (Loftus y cols., 2005). La división nuclear se da sin que desaparezca la membrana nuclear. Su interior contiene al cariosoma o endosoma que es una masa esférica de aproximadamente 0.5 μm de diámetro, compuesta de material fibrogranular y DNA condensado (Ravdin, 2000).

Durante su ciclo de vida, el parásito presenta dos estadios morfológicos fácilmente distinguibles: el quiste y el trofozoíto. El quiste presenta una forma ligeramente ovalada con un diámetro de 8 a 20 μm , cuatro núcleos y una pared celular de unos 125 a 150 nm aproximados de espesor. Gracias a la protección conferida por sus paredes, los quistes pueden sobrevivir de días a semanas en el ambiente externo y son responsables de la transmisión de la enfermedad, por lo cual constituyen la fase infectiva del parásito. El trofozoíto constituye la fase activa del protozoario; tiene un diámetro que oscila entre los 20 y 40 μm ; posee una intensa actividad motora y un pleomorfismo característico y se desplaza por medio de la formación de pseudópodos y filópodos; además, presenta un uroide en la parte posterior (Ravdin, 2000). El trofozoíto carece de estructuras intracelulares fácilmente reconocibles en la mayoría de los eucariontes, por esto se considera un organismo simple. Empero, contiene varias vacuolas citoplásmicas y se le ha detectado estructuras subcelulares que podrían corresponder al retículo endoplásmico y al aparato de Golgi (Chavez-Munguía y cols., 2000; Ghosh y cols., 1999).

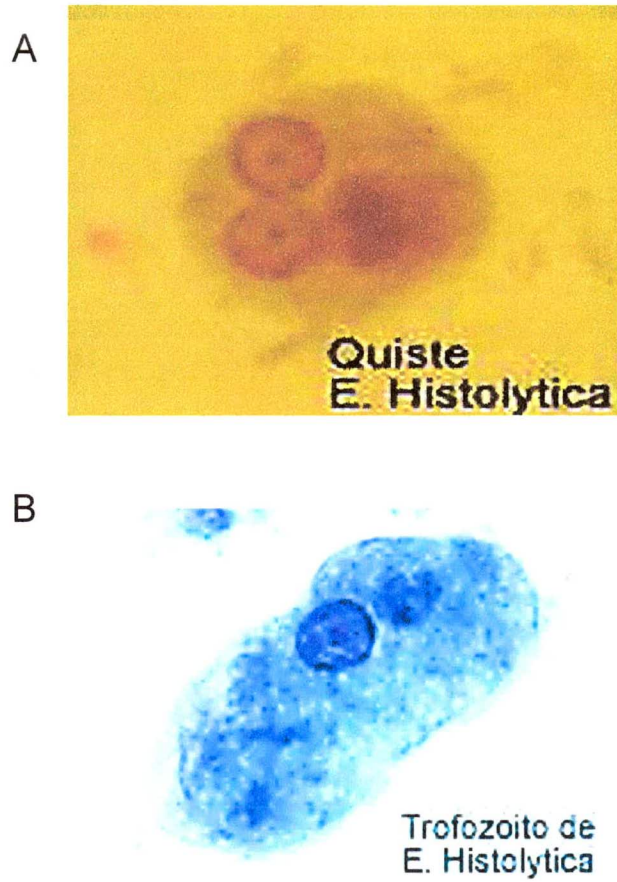


Figura 11. Morfología de *E. histolytica*.
A Quiste
B Trofozoíto

2.5. Ciclo de vida de *E. histolytica*

El ciclo de vida de *E. histolytica* involucra las dos fases, la quística y la de trofozoíto (Fig. 12). La ingestión de quistes maduros, habitualmente a partir de agua y alimentos o del consumo de los mismos con las manos contaminadas por heces fecales, introduce al parásito al organismo. El quiste ingerido viaja a través del estómago y del intestino delgado, tolerando tanto el pH ácido del estómago como el alcalino del duodeno. Los trofozoítos motiles emergen entonces en el íleon terminal (Ravdin, 2000) y se dividen por fisión binaria actuando como comensales inofensivos de bacterias o de detritus celulares en el intestino grueso (colon) del hombre. Estos individuos se convierten en portadores asintomáticos que no sufren la enfermedad y constituyen aproximadamente el 75% de los casos que presentan el parásito al examen coprológico. En algún momento los trofozoítos se diferencian en quistes, para lo cual se desprenden de la mucosa y de la luz del intestino grueso iniciando el proceso de enquistamiento (Espinosa-Cantellano y Martínez-Palomo, 2000). Primeramente, las células se deshidratan excretando parte de sus reservas alimenticias de las vacuolas digestivas, tomando forma esférica y perdiendo su movilidad, estadio conocido como prequiste. Posteriormente, producen una pared de quitina y forman pilas de ribosomas que a su vez constituyen los cuerpos cromidiales y se transforman en quistes uninucleados inmaduros recubiertos.

Los quistes uninucleados sufren sucesivas divisiones nucleares dando lugar a los quistes maduros tetranucleados que son excretados con las heces fecales, saliendo así del huésped y cerrando el ciclo de vida del protozooario. En otros casos, los trofozoítos logran invadir la mucosa intestinal produciendo úlceras y colitis sintomática, pudiendo afectar a otros órganos como el hígado, el pulmón o el cerebro a través del torrente sanguíneo (www.dpd.cdc.gov, 2006). Esta invasión tisular se facilita por enzimas proteolíticas.

Se ha reportado que aproximadamente el 75% de las infecciones con *E. histolytica* son asintomáticas y el 25% restante manifiesta un espectro de síndromes clínicos que son mencionados a continuación.

Cuando los trofozoítos penetran la pared intestinal se logra visualizar microscópicamente una alteración microscópica de la mucosa y submucosa. Una vez que las amibas se han multiplicado suficientemente, se produce entonces una lesión puntiforme que se observa como una pequeña prominencia, en el centro de la cual hay una solución de continuidad que es el origen de la laceración. Los trofozoítos se multiplican en la parte más profunda de la lesión, con tendencia a destruir los tejidos de manera horizontal, por debajo de la mucosa intestinal. Cuando esto ha sucedido, se origina una lesión característica llamada "*botón de camisa*", la cual consiste en una pápula con una pequeña laceración central, que se prolonga de manera más amplia en la base. Luego de dos a seis semanas después de la ingestión de quistes infecciosos, se puede presentar una colitis amibiana sintomática. Gradualmente, aparece un malestar abdominal inferior y una ligera diarrea, que van seguidos por molestia, pérdida de peso, así como dolor abdominal inferior y de espalda difusos. Cuando la multiplicación de

las amibas ha sido suficientemente grande para destruir una mayor cantidad de mucosa intestinal, se producen ulceraciones con fondo rugoso y abundante moco. Las ulceraciones confluyen, abarcan mayor extensión y dan origen a formas necróticas graves.

El estudio histológico de las lesiones amibianas en el colon se caracteriza inicialmente por el escaso infiltrado inflamatorio. Posteriormente, cuando hay destrucción del tejido, se observa necrosis e invasión bacteriana secundaria. En estas circunstancias es frecuente encontrar hemorragia, trombosis y presencia de células inflamatorias. En el estudio microscópico se observan abundantes trofozoítos de *E. histolytica*, lo que constituye la comprobación definitiva de la etiología de esta forma de amebiasis.

2.6. Virulencia y patogenia de E. histolytica

La virulencia de *E. histolytica* se define como el grado en que se expresa la patogenia de este parásito. La patogenia es, entonces, la capacidad del parásito para producir daño al huésped, o sea, su capacidad invasiva. Los términos "patogenia" y "virulencia", frecuentemente son utilizados de forma indistinta (Pérez-Tamayo, 1989).

La virulencia en *E. histolytica* es un evento multifactorial influenciado por factores del huésped, factores intrínsecos del parásito y factores del microambiente (Cook, 1990). Los parámetros usados rutinariamente para la caracterización de la virulencia *in vitro* e *in vivo* de los trofozoítos en cultivo, están basados en las propiedades bioquímicas y biológicas de los mismos.

Entre las propiedades bioquímicas están:

- La movilidad electroforética de isoenzimas

- La actividad de enzimas proteolíticas como la colagenasa y la gelatinasa
- Entre las propiedades biológicas, se usan:
- La aglutinación de los trofozoítos en presencia de concanavalina A
 - El efecto citopático sobre monocapas de células epiteliales en cultivo.
 - La capacidad de adherir y fagocitar eritrocitos humanos
 - La capacidad de producir lesiones en animales de laboratorio: por inoculación de trofozoítos en el hígado de hámsteres o en el ciego de ratas albinas

El hecho que algunas cepas amebianas sean capaces de invadir los tejidos del huésped, mientras otras se mantienen a la luz del intestino sin producir daño aparente, podría ser explicado por la existencia de dos especies distintas de amebas: *E. histolytica* (invasora o patógena) y *E. dispar* (no invasora o no patógena). Además, tales variaciones no dependen exclusivamente del parásito, pues una misma cepa invasora puede producir diferentes grados de daño en huéspedes distintos tanto *in vitro* como *in vivo* (Pérez-Tamayo, 1989).

Experimentos poco éticos e inescrupulosos realizados en 1913, durante los cuales se indujo la ingestión de quistes en veinte individuos presidiarios filipinos, mostraron que dieciocho de ellos se infectaron y eliminaron quistes en las heces fecales; mientras cuatro de ellos (22%) presentaron un cuadro clínico de disentería de 20 a 95 días después (Mirelman D, 1981).

Estas variaciones no dependen sólo del huésped, pues en las diferentes cepas existentes de *E. histolytica*, se ha observado diversos grados de virulencia tanto en las pruebas *in vitro* como en las inoculaciones experimentales (Diamond y cols., 1978).

Los factores del hospedero que se han visto involucrados en la patogenia de la *E. histolytica* pueden ser principalmente fisiológicos, dietéticos e inmunológicos.

Es importante señalar que la virulencia de los trofozoítos en cultivo disminuye después del mantenimiento prolongado en medio axénico. Pero puede ser aumentada después de varios pases sucesivos por el hígado de hámster (Bracha R, 1984), o a través de la asociación de éstos con determinadas especies de bacterias. Por otro lado, se conoce que, durante el ciclo de vida de *E. histolytica*, los trofozoítos pueden duplicar su genoma varias veces, incluso antes que la citocinesis ocurra, generando de esta manera poblaciones de trofozoítos multiploides. Esto propicia que los cultivos de *E. histolytica*, obtenidos a partir de quistes o trofozoítos de las heces, sean generalmente heterogéneos y estén constituidos por subpoblaciones de trofozoítos que pueden ser genéticamente diferentes, pudiendo presentar un comportamiento variable con relación a la virulencia (Orozco y cols., 1985a). Este mismo hecho explica también las diferencias en el contenido de DNA observadas previamente en algunas cepas de *E. histolytica* (Lopez-Revilla y Baez-Camargo, 1992).

Aún en poblaciones clonadas derivadas de una misma cepa, ha sido reportado un notable polimorfismo genético y una diferencia en los patrones de virulencia de estas poblaciones "hermanas", lo que demuestra una alta variabilidad en las características fenotípicas y genotípicas expresadas por los trofozoítos en cultivo (Orozco y cols., 1985b).

2.7. El genoma de *E. histolytica*

Uno de los primeros genomas de protistas en ser secuenciado fue el de *E. histolytica*. El proyecto inició en el año 2000 y culminó en el 2005 cuando se publicó el primer borrador del genoma completo de este protozoario (Loftus y cols, 2005). La secuenciación se realizó a partir de la cepa HM-1:IMSS usando el método Shotgun. El cultivo de la cepa HM-1:IMSS se estableció en el año 1967 a partir de tejido proveniente de la biopsia rectal de un paciente mexicano con disentería humana y desde entonces, ha sido ampliamente empleada para estudios de virulencia, inmunología, biología celular y molecular, y genética. Hasta la fecha, coexisten dos bancos de datos del genoma de *E. histolytica*: TIGR y Pathema, siendo esta última la base más actualizada y novedosa.

Los cultivos de *E. histolytica* presentan alta heterogeneidad genómica por lo que su genoma resulta bastante complejo. A diferencia de otros eucariontes, las trofozoítos de *E. histolytica* pueden duplicar su genoma varias veces antes que la división celular ocurra. Como consecuencia, aproximadamente entre el 5 y el 20% de las células crecidas en cultivos axénicos son multinucleadas. Por otro lado, también puede presentarse duplicación del genoma en ausencia de división nuclear, lo que ocasiona que un único núcleo pueda poseer hasta 6 veces el contenido de DNA.

E. histolytica posee 14 cromosomas lineales de tamaño variable que oscila entre los 0.3 y los 2.2 millones de pares de bases. Además, este protozoario patógeno contiene moléculas de DNA circular tipo plásmido conocidas como episomas (Bhattacharya y cols, 2000). Se estima que el genoma completo está constituido aproximadamente por unos 23.7

millones de pares de bases con una ploidía de 4, y que presenta un bajo contenido de GC (24.1%).

La anotación de las regiones codificantes para proteínas fue inferida mediante las aproximaciones de GlimmerHMM y Pat y se estimó que existen alrededor de 9 938 genes, lo que implica que el 49.2% del DNA es codificante. Ésto representa dos veces más la relación reportada para *P.falciparum* y *S. cerevisiae*, y a su vez, resulta equivalente a la observada en el protista de vida libre *Dictiostelium discoideum*. Las funciones de los genes se generaron automáticamente por búsqueda de homología entre secuencias. A pesar de que el número de genes de *E. histolytica* es relativamente alto respecto a otros parásitos, se ha demostrado que existe un patrón de pérdida de genes, principalmente de rutas metabólicas, lo cual deriva en la pérdida de la capacidad sintética de este microorganismo como consecuencia de su vida parasitaria en un ambiente rico en nutrimentos (C.G. Clark y cols, 2007).

Otra característica distintiva radica en que sólo el 25.2% de los genes presenta intrones, es decir, la gran mayoría está constituida por un exón. Además, la longitud promedio de los genes resulta considerablemente pequeña (~1167 pb), cuando se compara con los promedios reportados para las proteínas de *D. discoideum* y *P.falciparum*.

Por otro lado, los proyectos de secuenciación de los genomas de otras especies de *Entamoeba* como *E. dispar* y *E. invadens* se hayan en proceso. Debido a que *E. dispar* es una especie muy relacionada a *E. histolytica*, capaz de infectar al ser humano sin causar enfermedad, la información que emane de la lectura de su genoma resultará de gran utilidad en la identificación de factores asociados a los fenómenos de virulencia y

INTRODUCCIÓN

López-Casamichana M.

Posgrado en Ciencias Genómicas de la UACM

patogenicidad, facilitando la comprensión de los procesos relacionados con la infección y persistencia de este patógeno en el huésped.

3. Antecedentes particulares del proyecto

3.1. Eventos de recombinación genética en parásitos protozoarios

El mantenimiento de la estabilidad del genoma es de crucial importancia para todos los organismos vivos. La importancia de los eventos de reparación de los daños en el DNA por recombinación homóloga se hace evidente, pues los defectos en algunos de los componentes involucrados en este mecanismo conducen a anomalías en el desarrollo, degeneración, e incluso, a la no viabilidad de las células u organismos que los portan.

La lesión más grave del DNA es la ruptura de la doble cadena (DBS), la cual, como mencionamos anteriormente, puede generarse por la acción de diversos agentes genotóxicos además de aparecer normalmente durante los procesos habituales de división celular. Las DBSs son particularmente tóxicas porque, aparte de potenciar la generación de posibles mutaciones en el sitio de ruptura, la reparación incorrecta puede conducir a translocaciones cromosómicas.

Los parásitos requieren cierto grado de flexibilidad genética para adaptarse a los cambios y agresiones de su medio ambiente (falta de nutrientes, patógenos, presión selectiva por fármacos o las defensas del huésped). La adaptación requiere la activación de rutas moleculares específicas así como de cambios en su material genético (variabilidad genética). La variabilidad genética puede llevarse a cabo mediante recombinación o por transferencia horizontal de genes. En *P. falciparum*, se ha reportado eventos de recombinación homóloga entre secuencias repetitivas que flanquean los genes de multiresistencia a drogas (MDR), los cuales generan los

amplicones que dan como resultado el fenotipo de resistencia a múltiples fármacos en este parásito (Triglia y cols., 1991). Por otro lado, en el *Trypanosoma* africano, la evasión de la respuesta inmune al huésped ha sido asociada a la expresión diferencial y periódica de genes que codifican para glicoproteínas de la superficie del parásito VSG (variant surface glycoproteins), en el proceso conocido como variación antigénica (McCulloch y Barry, 1999). También, se ha demostrado que mutantes para *rad51* en este protozoario presentan frecuencias de cambio de VSGs considerablemente disminuidas con relación a la cepa silvestre, por lo que la vía de reparación dependiente de RAD51 cataliza o regula de manera directa la evasión de la respuesta inmune vía variación antigénica (Fig. 13) (Conway y cols., 2002).

Eventos de naturaleza similar han sido estudiados también en *Babesia bovis*, el agente causante de la babesiosis severa en el ganado vacuno. En este parásito la variación antigénica se lleva a cabo a través de modificaciones en su antígeno de superficie primario, la proteína llamada VESA1. Los reportes al respecto muestran evidencias de conversión génica progresiva para la generación de las diversas variantes de esta proteína de superficie (Dzikowski y Deitsch, 2006).

Table 2. Effect of RAD51 mutation on the frequency of VSG switching in the 3174 trypanosome strain

Strain	No. of injected tryps	No. of wells growing ^a	Estimated VSG switching frequency ($\times 10^{-6}$) ^b
<i>RAD51</i>	5×10^7	75/96	0.95
wild type	5×10^7	56/96	0.70
	4.5×10^7	76.5/96	1.1
	4.5×10^7	72/96	1.0
	5×10^7	67/96	0.83
<i>RAD51</i> ^{+/-} 1.1	5×10^7	76/96	0.95
	5×10^7	53.5/96	0.66
<i>RAD51</i> ^{-/-} 1.1	5×10^7	1.5/96	0.02
	5×10^7	1.5/96	0.02
	1.6×10^8	41/96	0.18
<i>RAD51</i> ^{-/-} 2.1	5×10^7	0.5/96	0.007
	5×10^7	6.5/96	0.09
	1×10^8	2/96	0.01
	1×10^8	19/96	0.13
<i>RAD51</i> ^{-/-} 3.1	7.5×10^7	8.5/96	0.08
	7.5×10^7	43.5/96	0.41
<i>RAD51</i> ^{-/-} 2.1	5×10^7	88/96	1.1
<i>tub::RAD51-BSR</i>	5×10^7	82/96	1.0
	5×10^7	24/96	0.3
	5×10^7	25/96	0.31

^aCounted 7 days after cloning for wild-type and +/- cells, and up to 10 days after cloning for -/- cells.

^bEvents/cell/generation: determined as described in McCulloch et al. (1997), and as discussed in Materials and Methods.

Figura 13. Tabla 2 tomada del artículo de Conway y cols., 2002. Se representa el efecto de la mutación del gen *rad51* en la cepa 3174 de *T. brucei* sobre la frecuencia de intercambio del antígeno VSG.

3.2. Importancia del estudio de la recombinación homóloga en *E. histolytica*.

Los trofozoítos de *E. histolytica* presentan una gran variabilidad fenotípica con diversos grados de virulencia, probablemente debido a la existencia de mecanismos de recombinación y amplificación génica muy activos (Baez-Camargo y cols., 1996). La virulencia puede ser modulada por diversos factores, entre ellos las proteínas que actúan en los procesos de recombinación genética. Asimismo, este parásito presenta amplificación de DNA no programada y poliploidía heterogénea (Orozco y cols., 1985b). Es probable que estos eventos se deban a diferencias en los mecanismos de control de la síntesis y recombinación del DNA así como del ciclo celular. Sin embargo, nada se sabe sobre los mecanismos involucrados en la regulación de la estabilidad genómica y recombinación en este parásito. Es por ello que el estudio de los elementos que participan en los procesos de recombinación permitirá entender los mecanismos que generan la diversidad genética y los cambios genotípicos-fenotípicos en este parásito. En *E. histolytica* se ha identificado el producto del gen *p53* y se ha encontrado que los niveles de la proteína Ehp53 aumentan en trofozoítos irradiados con luz ultravioleta (Mendoza y cols., 2003). El estudio de los factores que participan en la recombinación en este organismo, así como la caracterización molecular de la proteína EhRAD51 constituyen el primer paso para lograr entender los mecanismos que mantienen la integridad genómica y la supervivencia en *E. histolytica*. Ésto tal vez nos ayude a responder interrogantes claves como, si este parásito es capaz de recombinar su material genético para que una cepa no dañina modifique su grado de virulencia y llegue a ser patógena al hombre, o para expresar

diferencialmente moléculas de superficie que le permitan burlar al sistema inmune del huésped o para evadir la acción de fármacos y drogas específicos.

II. OBJETIVOS

1. Objetivo general:

Identificar los factores de la maquinaria de reparación por recombinación homóloga en *Entamoeba histolytica* y clonar, expresar, así como caracterizar funcionalmente a la recombinasa EhRAD51.

2. Objetivos particulares:

1. Establecer un modelo de daño al DNA en *E. histolytica*.
2. Búsqueda de los genes que codifican para las proteínas ortólogas que participan en la reparación del DNA por recombinación homóloga.
3. Análisis de los niveles de expresión del mRNA de los genes identificados que participan en la reparación del DNA por recombinación homóloga.
4. Clonación del gen *Ehrad51* en el vector pRSETA.
5. Análisis *in silico* de la secuencia de la proteína EhRAD51.
6. Análisis de los niveles de expresión del mRNA de *Ehrad51* en trofozoítos sincronizados en el ciclo celular.
7. Análisis de la expresión de la proteína EhRAD51.
 - 7.1. Expresión y purificación de la proteína EhRAD51 recombinante.
 - 7.2. Obtención de anticuerpos policlonales anti-EhRAD51 recombinante
 - 7.3. Inmunodetección e inmunolocalización de la proteína EhRAD51 en *E.histolytica*.
8. Ensayos funcionales *in vitro* para la proteína EhRAD51 recombinante.
 - 8.1. Evaluar la capacidad de unión al DNA de cadena sencilla.
 - 8.2. Evaluar la capacidad de unión al DNA de doble cadena.
 - 8.3. Evaluar la capacidad para promover el apareamiento entre cadenas de DNA homólogas.

III. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

1. Análisis *in silico*

La identificación de la maquinaria de reparación de las rupturas de la doble cadena del DNA por recombinación homóloga se realizó mediante una búsqueda en el banco de datos del Proyecto de Secuenciación del Genoma de *E. histolytica* Pathema (http://pathema.tigr.org/tigr-scripts/Entamoeba/Pathema_HomePage.cgi), usando como sonda las secuencias de las proteínas del grupo de epistasis RAD52 reportadas en *S. cerevisiae* y *H. sapiens*. De igual manera se realizó la identificación *in silico* de genes codificantes para las histonas H2AX en *E. histolytica*. Las proteínas ortólogas putativas en este protozoario fueron seleccionadas usando el análisis BLAST de acuerdo a los siguientes criterios:

- (i) al menos el 20% de identidad y el 35% de homología con la secuencia sonda;
- (ii) un valor de e menor a 0.002; y
- (iii) ausencia de codones de paro en la secuencia codificante.

Las secuencias aminoacídicas predichas fueron alineadas en el programa ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>) y sus dominios funcionales predichos con el programa Prosite (http://www.expasy.org/tools/_scanprosite/). La relación filogenética de las proteínas de la familia RECA/RAD51 se realizó mediante el método Neighbor-joining (Saitou y Nei, 1987) usando el programa Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA version 3.1) (<http://www.megasoftware.net>). La confiabilidad del árbol obtenido está basada en la prueba bootstrapping, la cual fue realizada con 500 réplicas.

Las estructuras secundaria y terciaria de la proteína EhRAD51 fueron predichas por modelaje de homología usando el programa Swiss Model (<http://www.expasy.org/swissmod/SWISS-MODEL.html>) y usando la estructura cristalizada reportada para la proteína ScRAD51 como templatado (PDB 1szp). Los modelos fueron desarrollados en el visor y editor de archivos PDB Pymol PBD viewer (<http://pymol.sourceforge.net/>).

2. Cultivo de trofozoítos de *E. histolytica*

Los trofozoítos de las clonas A (cepa HM1:IMSS) y L6 (Orozco E, 1981) se cultivaron axénicamente a 37°C en tubos de 16 x 25 mm en medio TYI-S-33 (Diamond y cols., 1978) suplementado con suero bovino 16.6% (Biofluids, EUA), previamente inactivado por calor a 56°C durante 30 min, mezcla de vitaminas de Diamond 3% (Special Diamond Vitamin Mixture, NorthAmerican Biologicals), penicilina 0.25 µl/ml (Lakeside, México) y estreptomycin 35 µg/ml (Lakeside, México). Para realizar los experimentos, los trofozoítos, en fase logarítmica de crecimiento, fueron incubados en un baño de agua-hielo durante 10-15 min y se agitaron suavemente hasta ser despegados de las paredes del recipiente. Las células se cosecharon por centrifugación a 500 x *g* durante 5 min a 4°C.

3. Irradiación de los trofozoítos con luz ultravioleta (UV-C)

Los trofozoítos de la clona A fueron incubados durante 15 min en cajas petri de vidrio, posterior a lo cual se les retiró el medio. Las células pegadas al fondo de las cajas fueron sometidas a irradiación con una dosis de 150 J/m² de luz de UV-C, durante 8 seg en un equipo Stratalinker 1800 (Stratagene). Posteriormente, se les añadió medio completo previamente calentado a

37°C y se dejaron a esa misma temperatura durante 10 min, 30 min, 3, 6 y 12 h, tiempos a los cuales se llevaron a cabo los diversos protocolos.

4. Ensayo de TUNEL por citometría de Flujo (FACS)

Los trofozoítos de la clona A (2×10^6) fueron cosechados a diferentes tiempos antes y después de ser sometidos a irradiación con luz UV-C. Posteriormente, fueron lavados con solución PBS 1X y fijados con paraformaldehído (PFA) al 1%. Luego de permeabilizar las células con etanol al 70%, el daño al DNA fue cuantificado usando el kit APO-BrdUTP TUNEL de Molecular Probes, que permite la detección de extremos hidroxilo 3' liberados luego que ocurrieron rupturas en el DNA. Posteriormente, los trofozoítos fueron incubados a 37°C durante 1 h en la solución de marcaje de DNA, que contiene la enzima deoxonucleotil terminal transferasa (TdT) y deoxitimidina 5 bromo 2 deoxiuridina 5 trifosfato (BrdUTP). Luego las células fueron lavadas dos veces y resuspendidas en la solución de tinción, que contiene el anticuerpo anti BrdU acoplado a la sonda fluorescente Alexa Fluor 488, a temperatura ambiente (T/A) durante 1 h. Finalmente, las células fueron incubadas en solución de ioduro de propidio a T/A durante 30 min y fueron analizadas por citometría de flujo en un sistema BD FACS Calibur. Los datos de fluorescencia obtenidos fueron graficados usando el programa FloJo.

5. Ensayo Cometa

El ensayo cometa (electroforesis en una única célula) es una técnica sencilla y útil para estudiar el daño al DNA y los procesos de reparación relacionados. Para ésto, los trofozoítos (5×10^4) cosechados a diferentes

tiempos luego de irradiación con luz UV-C fueron resuspendidos en agarosa de bajo punto de fusión que se dejó solidificar a 4°C sobre portaobjetos previamente cubiertos con una delgada capa de agarosa de punto de fusión normal. Posteriormente, los portaobjetos fueron sumergidos en solución de lisis fresca fría (2.5 M NaCl, 100 mM EDTA, 10 mM Tris, pH 7) durante toda la noche (O/N) a 4°C. Al siguiente día, los portaobjetos se incubaron durante 20 min en solución de corrida fría (300 mM NaOH y 1mM EDTA, pH 7); se corrió una electroforesis a 25 V y se ajustó la corriente a 300 mA (aproximadamente 1.5 V/cm) durante 20 min a 4°C y en la oscuridad. Por último, los portaobjetos fueron extraídos cuidadosamente de la cámara de electroforesis, enjuagados con agua destilada y secados completamente. Para visualizar el DNA, se añadió 30 µl de solución de bromuro de etidio 2 µg/ml, a cada laminilla o portaobjetos se le colocó un cubreobjetos que fue posteriormente sellado. La señal del bromuro de etidio se observó inmediatamente después de este procedimiento en el microscopio confocal, haciendo ampliaciones de hasta 400X.

Un esquema abreviado de esta metodología se muestra en la figura 14

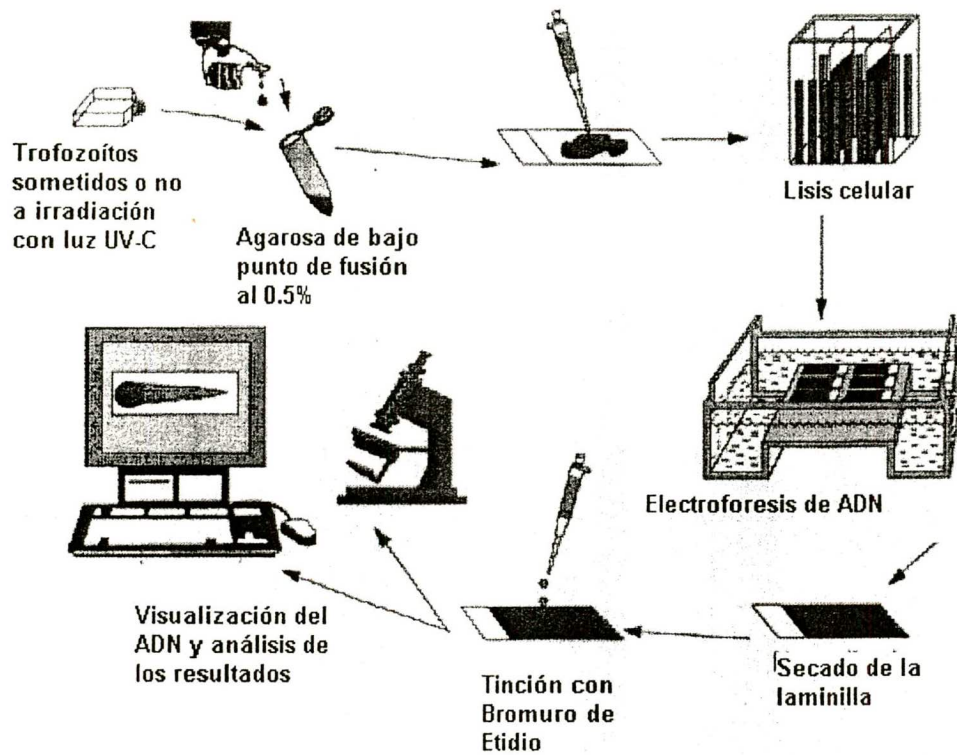


Figura 14. Representación esquemática de los pasos más importantes en el protocolo para el ensayo Cometa o electroforesis en una única célula. Los trofozoítos cosechados fueron resuspendidos en agarosa de bajo punto de fusión sobre portaobjetos previamente cubiertos con una delgada capa de agarosa de punto de fusión normal, luego, fueron sumergidos en solución de lisis fresca fría y al siguiente día, los portaobjetos fueron sometidos a la electroforesis. Posteriormente, se dejaron secar y se visualizó el DNA en el microscopio confocal, previa incubación con bromuro de etidio.

6. Preparación de extractos proteicos citoplásmicos y nucleares

Para obtener las proteínas citoplásmicas y nucleares de *E. histolytica*, los trofozoítos (1×10^6) en fase de crecimiento logarítmica sometidos o no a irradiación con luz UV-C, fueron incubados en un baño de agua-hielo durante 10-15 min, agitándose suavemente hasta ser despegados de las paredes de la caja de cultivo. Luego, fueron cosechados por centrifugación a 2000 rpm durante 5 min a 4° C. La pastilla fue resuspendida en 1 ml de PBS 1X (pH 6.8) y se hicieron alícuotas a tubos eppendorf de 1.5 ml. Posteriormente, los tubos fueron centrifugados a 14 000 rpm durante 15 seg, se decantó el PBS y las pastillas se resuspendieron en 400 μ l de buffer A frío, pipeteando suavemente. Luego de 5 a 10 min, cuando las células se hincharon, se añadieron 25 μ l de Nonidet N P-40 al 10 % y 2 μ l de cocktail inhibidor de proteasas a cada tubo. Éstos fueron agitados vigorosamente en el vórtex y fueron centrifugados a 14 000 rpm durante 30 seg. El sobrenadante, conteniendo el RNA y las proteínas citoplásmicas se transfirió a tubos nuevos, mientras que la pastilla nuclear se resuspendió en 50 μ l de buffer C frío agregando además 1 μ l de cocktail de inhibidores de proteasas. Para romper los núcleos, los tubos fueron agitados enérgicamente en el vórtex a 4°C durante 15 min. Finalmente, fueron centrifugados durante 5 min a 4°C y los sobrenadantes, conteniendo las proteínas nucleares, fueron alicuotados en tubos eppendorf, congelados en nitrógeno líquido y almacenados a -70°C junto con los extractos citoplásmicos previamente obtenidos.

7. Determinación de la concentración de proteínas.

La concentración de proteínas se determinó por el método de Bradford (Bradford, 1976). Para elaborar una curva patrón se utilizó una solución estándar de albúmina sérica bovina (BSA, Sigma) a una concentración de 1 mg/ml. Las muestras se leyeron en un espectrofotómetro (Beckman DU 650 UV) a una longitud de onda de 595 nm. Brevemente, se realizó una curva patrón con 0, 2.5, 5, 7.5 y 10 μ g de BSA y a cada muestra se le agregó NaCl 150 mM de tal forma que diera un volumen final de 100 μ l. Se agregó 1 ml de reactivo de Bradford (100 mg de azul Coomassie, 50 ml de etanol al 95% y 100 ml de ácido fosfórico al 85%), se agitó vigorosamente y se incubó durante 2 min a T/A. Se determinó la absorbancia de las muestras y los datos obtenidos fueron graficados, realizando una regresión lineal. Para la concentración de proteína de las muestras de interés se tomaron alícuotas de 3 μ l de cada muestra y se siguió la misma técnica. Los datos obtenidos se interpolaron empleando los valores de la pendiente e intercepto al eje y de la ecuación de la regresión lineal y se obtuvo la concentración de proteína de cada muestra.

8. Electroforesis de proteínas en condiciones desnaturalizantes

La separación de proteínas por electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE) se realizó de la siguiente manera: el gel separador se preparó con acrilamida al 10 %, Bis-acrilamida 0.9%, Tris-HCl 0.375 M (pH 8.8) y SDS al 0.1%. El gel se polimerizó agregando 0.05% de persulfato de amonio (PSA) y 0.003% de TEMED. El gel concentrador se preparó con acrilamida al 5%, Bis-acrilamida 0.36%, Tris-HCl 0.125 M (pH 6.8), SDS al 0.1%, PSA 0.05% y TEMED 0.005%. Para correr el gel, se utilizó una

solución amortiguadora de Tris 0.25 M, glicina 1.92 M, 0.1 % de SDS (pH 8.3) y se llevó a cabo manteniendo un voltaje constante de 100 V durante 1.5 h.

9. Transferencia de proteínas a membranas de nitrocelulosa

Las proteínas separadas por SDS-PAGE se transfirieron a membranas de nitrocelulosa (Supported nitrocelulose-1, Gibco, BRL). Para esto, los geles, las membranas de nitrocelulosa y los papeles Whatman fueron incubados por 5 min en solución de transferencia de proteínas (20% metanol, 10% Tris-Glicina). Posteriormente, se armó y conectó la cámara de transferencia para permitir a las proteínas migrar del polo negativo al positivo, de esta manera pasan del gel de poliacrilamida a la membrana de nitrocelulosa. Primero se colocó una fibra, papel Whatman y la matriz de poliacrilamida, a continuación la membrana de nitrocelulosa, otro papel Whatman y por último otra fibra. Una vez armado el dispositivo se sumergió en solución de transferencia de proteínas y se corrió entre 300 y 400 mA a 4°C por 1.5 h. Por último, la presencia de las proteínas en la membrana se confirmó por tinción con rojo Ponceau 100 mg rojo (Ponceau Sigma-Aldrich) por 3 min. Después las membranas fueron lavadas con agua bidestilada para retirar el colorante y realizar los ensayos de inmunodetección de proteínas por Western blot.

10. Ensayos de Western blot

Una vez transferidas las proteínas a las membranas, éstas fueron incubados O/N en una solución bloqueadora, que contiene 5% de leche descremada en PBS 1X. Posteriormente, se agregó el anticuerpo primario diluido en una solución que contiene 2.5% de leche descremada en PBS 1X por 2 h a T/A o

O/N a 4°C, en agitación constante. Después las membranas fueron lavadas tres veces con PBS-Tween 20 al 0.05% y se les adicionó el anticuerpo secundario acoplado a peroxidasa (anti-IgG de conejo o ratón, según sea el caso) diluído en solución PBS 1X y leche descremada al 2.5 % por 1 h a T/A o O/N a 4°C, en agitación. Por último, las membranas fueron lavadas tres veces con PBS-Tween 20 al 0.05% y fueron reveladas por quimioluminiscencia con el reactivo ECL plus (Amersham Pharmacia Biotech, USA), incubando la membrana 5 min. Para detectar la proteína, las membranas fueron expuestas a placas de autoradiografía y la señal se hizo evidente luego de sumergir las radiografías en solución reveladora.

En este trabajo, fueron realizados ensayos de Western Blot usando como anticuerpo primario un anti- γ H2AX policlonal comercial, dirigido contra el extremo C- terminal de la forma fosforilada de la histona H2AX de humano - (phospho Ser 140, Sigma Laboratories) producido en conejo. En este ensayo, la dilución usada fue 1:7000. De igual manera, fueron ejecutados experimentos utilizando el anticuerpo monoclonal comercial dirigido contra la etiqueta de histidinas fusionada a la proteína recombinante (anti-6xHis) en una dilución 1:5000 y los anticuerpos policlonales anti-EhRAD51 producidos en conejo (como parte de esta tesis experimental), en una dilución 1:1000.

11. Extracción de RNA total

El RNA total amibiano se extrajo con una mezcla de fenol -isotiocianato de guanidina, utilizando el reactivo TRIzol (Gibco BRL), conforme al protocolo sugerido por el proveedor. Brevemente, la pastilla celular de 1×10^7 trofozoítos se lisó con 1 ml de TRIzol, se incubó a T/A durante 5 min y se le

agregó 2 ml de cloroformo. Después de mezclar vigorosamente para homogenizar, los tubos fueron incubados durante 3 min a T/A y centrifugados a 12,000 xg durante 15 min para obtener la fase acuosa que contiene el RNA. Luego, éste fue precipitado con 5 ml de isopropanol e incubado 10 min a T/A. Se centrifugó a 12,000 xg durante 10 min para eliminar el sobrenadante y la pastilla de RNA se lavó con etanol al 75%, nuevamente se centrifugó y se eliminó el sobrenadante. Finalmente, la pastilla de RNA se secó durante 5 a 10 min a T/A y se resuspendió en agua libre de ribonucleasas (tratada con DEPC al 0.1%). El RNA se disolvió durante 10 min a 60 °C, se cuantificó en un espectrofotómetro (Beckman DU 650 UV) y se visualizó en un gel desnaturizante de agarosa-formaldehído al 1%. El RNA en forma pura exhibe una relación lineal entre la concentración y la absorbancia a 260 nm. Dado que una unidad de absorbancia a 260 nm corresponde a 44 µg/ml de RNA de cadena sencilla, la concentración de RNA pudo estimarse de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$[\text{RNA } \mu\text{g/ml}] = A_{260 \text{ nm}} \times 44.19 \times \text{factor de dilución}$$

El agua utilizada para manipular el RNA se trató con DEPC al 0.1%. La solución se preparó en agitación constante O/N a T/A, en un matraz cubierto con aluminio y al día siguiente se esterilizó por autoclave.

12. Electroforesis en geles desnaturizantes de agarosa para RNA

Una muestra de RNA total se desnaturizó a 60 °C durante 10 min en presencia de formamida desionizada al 64% y formaldehído 2.78 M. La muestra se dejó enfriar durante 5 min en hielo y se mezcló con 0.1 volúmenes de buffer de carga para RNA (glicerol al 50%, EDTA-DEPC 1 mM (pH 8.0), azul de bromofenol al 0.25 % y cianol xileno al 0.25%) y 0.5 µg

de bromuro de etidio por muestra. El RNA se corrió en un gel de agarosa al 1% con formaldehído 2.2 M en buffer MOPS pH 7.0 (MOPS 40 mM pH 7.0, NaOAc 10 mM, EDTA-DEPC 1 mM pH 8.0) y se visualizó con luz U.V.

13. Obtención del cDNA

Para sintetizar el cDNA total de los trofozoítos, se incubó 2 µg de RNA total con 10 unidades de DNasa libre de RNAsas (Roche), durante 15 min a 37°C. Posteriormente, se agregó 1 µl de EDTA-DEPC 25 µM y se incubó durante 10 min a 65 °C para desnaturalizar el RNA. A continuación, se le añadió 2 µl de mezcla de dNTPs 2 mM (c/u), 2 µl de oligonucleótido dT₁₈ 100 ng (previamente desnaturalizado a 65 °C durante 10 min), 4 µl de buffer de la enzima (Tris-HCl 50 mM pH 8.3, KCl 75 mM, MgCl₂ 3 mM), 2 µl de DTT 100 mM y 40 unidades del inhibidor de RNAsas SUPERase-in (Ambion) y se incubó secuencialmente a 37 °C durante 15 min y a 42 °C por 2 min. Finalmente, fueron añadidas 200 unidades de la enzima Transcriptasa Reversa Superscript II (Invitrogen) y la mezcla se incubó durante 1 h a 42 °C. Los cDNAs obtenidos se almacenaron a -20 °C hasta su uso. El control negativo consistió en una mezcla de reacción carente de la enzima Superscript II.

14. Ensayos de RT-PCR

Para las reacciones en cadena de la polimerasa o PCR, se tomó 1/6 del volumen de la reacción anterior (que contiene el cDNA) y se añadieron dNTPs a una concentración final de 0.5 mM, 1 unidad de *Taq* DNA polimerasa (Invitrogen), 20 picomoles de cada oligonucleótido y una cantidad variable de MgCl₂ según el par de oligonucleótidos utilizados.

Se llevó a cabo el diseño de oligonucleótidos específicos para amplificar regiones internas de los genes relacionados al grupo de epistasis EhRAD52 involucrados en la reparación del daño al DNA por recombinación homóloga y para genes constitutivos usados como control de carga y expresión (tabla 3).

Para cada gen se estandarizó la reacción de RT-PCR bajo condiciones específicas que permitieron la detección de los respectivos transcritos en la fase logarítmica de la reacción.

Tabla 3. Oligonucleótidos específicos diseñados para el análisis de la expresión de los genes del grupo de epistasis *rad51* en *Entamoeba histolytica*.

Gen	Oligonucleótido sentido	Oligonucleótido antisentido	Producto (pb)	Tm (°C)
<i>Ehmre11</i>	5'-CGAGAAGAAGAGCAGCTCAA-3'	5'-CTTTCCTTTTTCTTCAGCCA-3'	391	49.5
<i>Ehrad50</i>	5'-CAGCCCAAGACATTCAAACA-3'	5'-CTGCATAATTGTTGTGCCAA-3'	277	49.5
<i>Ehnbs1</i>	5'-CACCTCCCACACCACAGTAT-3'	5'-CTCCACCAATGAATGACCAT-3'	549	49.0
<i>Ehrad51</i>	5'-ATTGCTTTTACACCAAAG-3'	5'-TTCTTCTGAATTTA ATCC-3'	400	49.5
<i>Ehrad51C</i>	5'-CCACATGACATTGTGAGTCT-3'	5'-GAATTATCCGATGAAGTGCT-3'	155	45.0
<i>Ehrad52</i>	5'-ATGACTGAAATAGATACCTC-3'	5'-AATTTGATTGTTTTAAGAAT-3'	730	37.5
<i>Ehrad54</i>	5'-GGGCAAAAAATTACCTAAA-3'	5'- GTCGTGATCCTCCAAGTGCT-3'	876	50.0
<i>Ehrad54B</i>	5'-GTCATGCCATTGACCAATTA-3'	5'-TCACACTCTTCCTCAGTTGG-3'	499	47.5
<i>Ehrad52/22</i>	5'-ATGTCTCATGAAATAAAACCAC-3'	5'-TCATTTCTTACGTCTAACTATTACT-3'	516	44.5
<i>25S rRNA</i>	5'-TATCAAATCAAAGGACCCGCT-3'	5'-AAAAGA AAAACTAAGCGGTAA-3'	631	51.0
<i>Ehactina</i>	5'-AGCTGTTCTTTCATT ATATGC-3'	5'-TTCTCTTTCAGCA GTAGTGGT-3'	220	48.0

15. Cuantificación de la expresión de los genes

Los productos amplificados se mezclaron con 0.1 volúmenes de buffer de carga para DNA (Ficoll 400 al 25%, azul de bromofenol al 0.25 % y cianol xileno al 0.25%) y se corrieron en geles de poliacrilamida al 12 % para DNA, en TBE 1X. La electroforesis se realizó a 100 V. El DNA se tiñó con bromuro de etidio (0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) y se visualizó bajo luz U.V. a 310 nm. La imagen obtenida se registró en el equipo de cómputo GelDoc 1000 utilizando el programa Molecular Analyst (BioRad). La expresión fue semicuantificada por densitometría usando el programa Quantity One.

16. Preparación de bacterias competentes congeladas.

Se tomó una colonia de bacterias *Escherichia coli* DH5 α ó BL21 (DE3) pLysS y se creció en medio LB a 37°C, con agitación vigorosa O/N. En un matraz estéril con 100 ml de medio LB se inoculó 500 μl de cultivo y se incubó a 37 °C con agitación moderada, hasta que las células alcanzaron una Densidad óptica (DO) de 0.4 a 0.5, a 595 nm. El cultivo se colectó en tubos de centrífuga de 50 ml y se mantuvo en hielo por 10 a 15 min. Las células fueron empastilladas a 2,000 rpm por 15 min a 4 °C y la pastilla fue resuspendida en 1/3 del volumen inicial colectado de solución RF1 (RbCl 100 mM, MnCl₂ 50 mM, acetato de potasio 30 mM, CaCl₂ 10 mM y 15 % de glicerol, pH 5.8). Las células fueron incubadas nuevamente en hielo durante 15 min y empastilladas a 2,000 rpm. La pastilla se resuspendió en 1/12 del volumen original de solución RF2 (RbCl 10 mM, MOPS 10 mM, CaCl₂ 75 mM y 15% de glicerol, pH 6.8), incubando otros 15 min en hielo. Alrededor de 200 μl de bacterias competentes fueron distribuidas en tubos eppendorf de

0.5 ml estériles que fueron colocados en nitrógeno líquido y mantenidos hasta su uso a -70 °C.

17. Obtención de DNA de trofozoítos de *E. histolytica*.

Para obtener el DNA de los trofozoítos se utilizó el método de extracción de DNA por medio de gradientes de CsCl. Las preparaciones congeladas de 1×10^8 células se lisaron en 1 ml de una solución consistente en sacarosa (100 mg/ml) y EDTA 0.5 M. A esta solución se le agregó sarcosil al 2% y 2 mg/ml de proteinasa K. El lisado se incubó a 60 °C por 2 h. En el lisado se disolvieron 1.4 g de CsCl por cada 5 ml de lisado y 20 mg/ml de colorante Hoechst 33258 para obtener un lisado con un índice de refracción de 1.3838. Para formar el gradiente, se preparó una solución que contenía 1.86 g de CsCl por ml de Tris 0.02 M, pH 8.5, con un índice de refracción aproximado de 1.4190. Otra solución de CsCl de menor densidad, con un índice de refracción aproximado de 1.3640, se preparó a partir de la solución concentrada de CsCl. El gradiente se formó por pasos, colocando cuidadosa y continuamente 4 ml de CsCl concentrado en el fondo de un tubo de propileno para rotor 50 ti, 5 ml de solución de DNA y de 3 a 4 ml de CsCl de menor densidad. Los tubos se centrifugaron a 183 000 xg por 18 h a 20 °C en una ultracentrífuga Beckman L8-55. La banda de DNA, visible con luz UV, se colectó en un tubo córex estéril, insertando una aguja hipodérmica, directamente bajo la banda de DNA. El colorante Hoechst 333258 se extrajo mediante 3 lavados con un volumen igual de isopropanol. El DNA se recuperó con la adición de 3 volúmenes de etanol al 70% a T/A y se centrifugó a 13 000 xg en el rotor HB4, Sorvall, a 20 °C. Posteriormente, el DNA se disolvió en 2 ml de agua desionizada estéril y se dializó contra

una solución de Tris-HCl 10 mM, pH 7.5 y EDTA 1 mM, pH 8, a 4 °C durante 24 h. El DNA se precipitó adicionando 1/10 del volumen total de acetato de sodio (NaOAc) 3M, pH 5.2 y 3 volúmenes de etanol absoluto. Se dejó 10 min en nitrógeno líquido y se centrifugó a 12,000 xg.

El DNA fue cuantificado por espectrometría midiendo la absorbancia a 260 nm y aplicando la fórmula:

$$[\text{DNA } \mu\text{g/ml}] = A_{260 \text{ nm}} \times 50 \times \text{factor de dilución}$$

18. Amplificación por PCR del gen *Ehrad51*

Por análisis *in silico*, se obtuvo una secuencia que contiene un marco de lectura abierto (ORF) con homología al gen *Ehrad51*. Con base en la secuencia encontrada, se diseñaron los oligonucleótidos en sentido *Ehrad51-S* (5'-CGGGATCCAAAGTAATGAGTGCCAAGCA-3') y antisentido *Ehrad51-AS* (5'-CCAAGCTTGCCATTCTCCGTATTATGGC-3') que contienen los respectivos sitios de restricción para las enzimas *Bam*HI y *Hind*III (subrayados en las secuencias) y que flanquean el gen *Ehrad51* completo de 1098 pb. Mediante PCR se amplificó el fragmento usando como molde 50 ng de DNA genómico, una mezcla de dNTPs 400 μ M (c/u), MgCl₂ 2.5 mM, oligonucleótidos 0.3 μ M y 2 unidades de la enzima *Taq* DNA polimerasa (Invitrogen). Se utilizó un programa de 30 ciclos: desnaturalización a 94 °C durante 35 seg, alineamiento de los oligonucleótidos a 48 °C por 35 seg, extensión a 72 °C por 1 minuto y finalmente una extensión a 72 °C por 7 min. Como control positivo de PCR, se amplificó un fragmento de 220 pb del gen de actina, usando el oligonucleótido en sentido (5'-AGCTGTTCTTTCATTATATGC-3') y antisentido (5'-TTCTCTTTCAGCAGTAGTGT-3') y como DNA molde el plásmido pGEM[®]-4Z-actina que contiene

clonado ORF del gen de actina amibiano (Edman, 1987). El control negativo consistió en una mezcla de reacción carente de DNA molde.

19. Separación del DNA en geles de agarosa.

La muestra de DNA se mezcló con 0.1 volúmenes de buffer de carga para DNA (Ficoll 400 al 25%, azul de bromofenol al 0.25 % y cianol xileno al 0.25%) y se resolvió mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1 o 2% en TAE 1X (Tris-acetato 0.04 M y EDTA 0.001 M pH 8). La electroforesis se realizó a 100 V. El DNA se tiñó con bromuro de etidio (0.5 µg/µl) y se visualizó bajo luz U.V. a 310 nm. La imagen obtenida se registró en el equipo de cómputo GelDoc 1000 utilizando el programa Molecular Analyst (BioRad).

20. Clonación del gen *Ehrad51* en el vector de expresión pRSET-A.

El gen *Ehrad51* se clonó en el vector de expresión pRSET-A (Invitrogen). Este vector tiene la característica de tener el gen de resistencia a la ampicilina y de agregar una etiqueta de seis histidinas al extremo amino de la proteína recombinante (Fig.15).

El producto de PCR de 1098 pb se corrió en un gel y se limpió utilizando el kit Gene Clean. El fragmento de PCR puro y el vector pRSET-A se digirieron paralelamente con las enzimas *BamH I* y *Hind III* (New England, BioLabs) usando 5 unidades de cada enzima en el buffer NaCl 150 mM, Tris-HCl 10 mM, MgCl₂ 10 mM, DTT 1 mM, pH 7.9 O/N a 37 °C y su digestión se analizó en un gel de agarosa. Tanto el inserto como el vector fueron purificados usando el kit QIAEX II Gel Extraction (Qiagen) y nuevamente fueron analizados en un gel de agarosa al 2% para su cuantificación. La reacción

de ligación se hizo en proporción molar fragmento/vector 1:1 con 10 ng de fragmento digerido, 80 ng de plásmido pRSET-A digerido, buffer de la enzima (Tris-HCl 50 mM pH 7.6, MgCl₂ 10 mM, ATP 1 mM, DTT 1 mM, 5% polietilen glicol) y 1 unidad de enzima T4 DNA ligasa (Gibco) O/N a 16 °C. Se transformaron bacterias *E. coli* DH5 α , se obtuvo el DNA plasmídico (ver miniprep) y por doble digestión enzimática con las enzimas BamH I y Hind III se comprobó que liberara el inserto de 1.34 Kb. El plásmido recombinante (pRSET-*Ehrad51*) se cuantificó y se confirmó que el inserto estuviera en marco de lectura con el vector, mediante secuenciación automática.

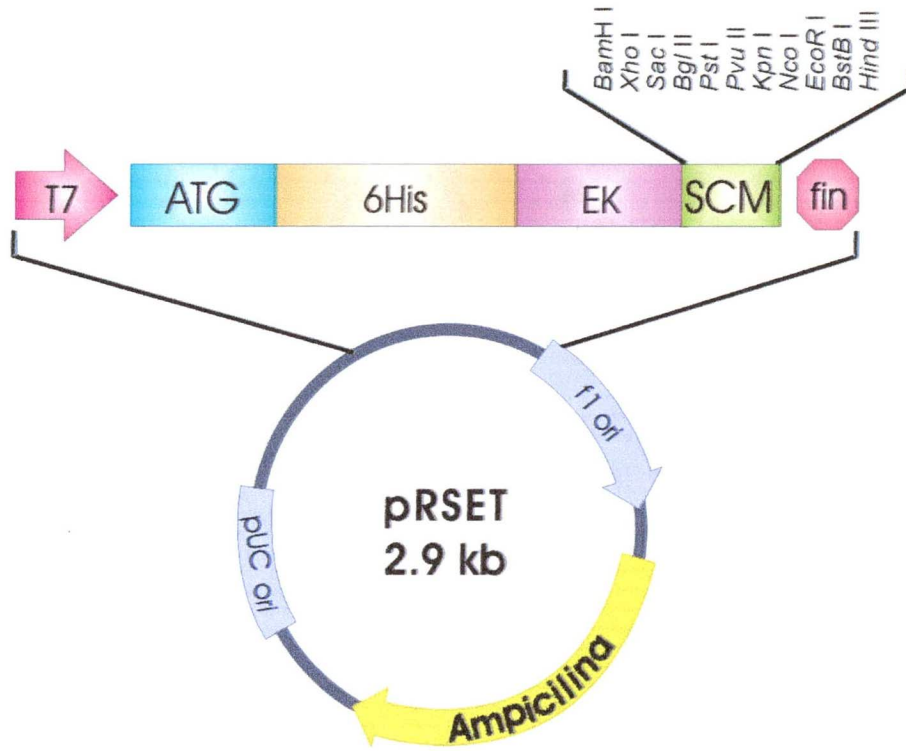


Figura 15. Mapa del plásmido pRSET.

El vector de expresión pRSET permite un alto nivel de expresión de proteína recombinante. La ligación de un inserto de DNA se ubica en marco de lectura río abajo de una etiqueta de histidinas y del ATG del inicio de la traducción. La expresión del inserto está controlada por el promotor T7. El DNA ligado se transcribe cuando la RNA polimerasa T7 se une al promotor T7. Para que la RNA polimerasa T7 se exprese, es necesario agregar IPTG al medio de cultivo.

El vector tiene un tamaño de 2,897 pb, sitios de clonación múltiple (SCM) y el gen de resistencia a ampicilina (β -lactamasa), pero su característica más importante es la presencia de una etiqueta de seis histidinas consecutivas (6His) que presentan gran afinidad por cationes divalentes como el níquel. La etiqueta no repercute con la funcionalidad de las proteínas generadas y se puede eliminar con enterocinasa (EK).

21. Obtención del DNA plasmídico mediante el método de lisis alcalina (Miniprep).

Para obtener el DNA plasmídico, se propició el crecimiento de bacterias *E. coli* DH5 α en 5 ml de medio LB, suplementado con ampicilina 100 μ g/ml, O/N a 37 °C y en agitación constante (225 rpm). Se cosechó 1.5 ml de cultivo de bacterias y se centrifugó a 12,000 xg durante 30 seg en una centrífuga eppendorf 5415 C. Se decantó el sobrenadante y, a la pastilla, se le extrajo el plásmido por lisis alcalina, según el método descrito en Sambrook (Sambrook, 1989). Brevemente, la pastilla se resuspendió en 100 μ l de solución I fría (glucosa 50 mM, Tris-HCl 25 mM pH 8.0, EDTA 10 mM) y se agitó fuertemente en un vórtex. Después fueron añadidos 200 μ l de solución II (NaOH 0.2 N, SDS al 1%), se mezcló por inversión y se incubó en hielo durante 5 min para lisar las bacterias. Posteriormente, se agregó 150 μ l de solución III fría (acetato de potasio 3 M, pH 5.2) y 5 μ l de Cl₃CH (cloroformo), se mezcló por inversión y se incubó en hielo durante 10 min. Los restos celulares fueron eliminaron por centrifugación a 14,000 xg durante 10 min a 4 °C. La fase acuosa se recuperó y se agregó dos volúmenes de etanol absoluto, se centrifugó a 12,000 xg durante 5 min, se eliminó los sobrenadantes y las pastillas (DNA plasmídico y RNA), se secaron a T/A aproximadamente unos 15 min. Los DNAs fueron resuspendos en 100 μ l de agua estéril y el RNA se degradó con 10 μ g de RNAsa A durante 30 min a 37°C. Se añadió un volumen de la mezcla fenol: cloroformo: alcohol isoamílico (proporción v:v:v 25:24:1) y se agitó fuertemente en un vórtex para homogeneizar. Los tubos fueron centrifugados para recuperar las fase acuosa (DNA plasmídico) y el contenido se homogeneizó con un volumen de cloroformo. Nuevamente las

muestras fueron centrifugadas para recuperar el sobrenadante y el DNA se precipitó con acetato de sodio (NaOAc) 0.3 M pH 5.2, en dos volúmenes de etanol y se incubó en hielo durante 5 min. Se centrifugó otra vez, se eliminó el sobrenadante y la pastilla se lavó con 1 ml de etanol al 70%. Luego de una última centrifugación, la pastilla de DNA plasmídico se secó y se resuspendió en TE (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM pH 8.0).

22. Condiciones de la digestión con *BamH I* y *Hind III* de la construcción *pRSET-Ehrad51*

Se digirió 1 µg del DNA plasmídico con 10 unidades de las enzimas *BamH I* y *Hind III* durante 2 h a 37 °C. El producto de la digestión se analizó en un gel de agarosa.

23. Secuenciación automática del plásmido *pRSET-Ehrad51*

Una de las clonas con el inserto de 1098 pb (*pRSET-Ehrad51*) se seleccionó para secuenciar el gen, utilizando el kit de ABI Prism Big Dye Terminator, v. 2. 0 y un secuenciador automático de DNA (310 Genetic analyzer, Applied Biosystem). La reacción de secuenciación de DNA se hace por el método enzimático de Sanger, el cual se basa en la síntesis de DNA *in vitro* en presencia de terminadores de cadena dideoxinucleósidos trifosfatados (ddNTPs). Cada terminador de cadena está marcado con una sonda fluorescente que es detectada por el equipo: la adenina contiene dicloro R6G (verde), la citosina está teñida con dROX (rojo), la guanina con dR110 (azul) y la timina con dTAMRA (amarillo). La reacción se lleva a cabo en presencia del DNA molde, un oligonucleótido complementario al DNA que se

va a secuenciar y una mezcla del kit que contiene la enzima AmpliTaq DNA polimerasa, terminadores (ddNTPs), dNTPs y MgCl₂. La DNA polimerasa al sintetizar la cadena complementaria no hace distinción entre los dNTPs y ddNTPS, pero cada vez que un ddNTP se incorpora, la síntesis de la cadena se detiene por la falta del grupo hidroxilo. Debido a que en la reacción existen millones de moléculas de DNA molde, las cadenas de DNA sintetizadas van a terminar en diferentes puntos en la secuencia. Estos fragmentos sintetizados se pueden separar por su tamaño en una electroforesis, con un láser se excita el fluorocromo del ddNTP. y las fluorescencias son registradas. Los datos son interpretados en la computadora y el resultado se arroja como una secuencia nucleotídica o gráficamente en un electroferograma.

24. Expresión de la proteína recombinante EhRAD51

Para la expresión de la proteína recombinante se transformaron bacterias *E. coli* BL21 (DE3) pLysS con la construcción pRSET-Ehrad51 y la mezcla se añadió en placas de LB con ampicilina 100 µg/ml y cloranfenicol 34 µg/ml O/N a 37 °C. Esta cepa se utiliza para la expresión de genes regulados por el promotor T7 porque contiene un plásmido con el gen de la RNA polimerasa T7 y su marcador de selección es el gen de resistencia al cloranfenicol.

Al día siguiente se inoculó una colonia en 100 ml de medio LB (en presencia de los antibióticos ya mencionados) a 37 °C en agitación constante (225 rpm) hasta alcanzar una DO (DO) a 600 nm de 0.8. Inmediatamente, se agregó IPTG a una concentración final de 1 mM y se permitió la expresión de la proteína recombinante a 37 °C durante 1 h, 3 h y O/N. Se cosecharon

las bacterias a 4,000 xg durante 10 min y la pastilla se guardó a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su uso.

25. Purificación de la proteína recombinante en condiciones desnaturizantes y nativas por cromatografía de afinidad en columna de Ni NTA.

La proteína recombinante se purificó siguiendo el protocolo sugerido en el manual *The QIAexpressionist* (Qiagen), dado que las resinas de ácido níquel-nitrilotriacético (Ni-NTA) unen grupos imidazol. El residuo de histidina contiene un grupo imidazol que se une a los iones níquel (Ni^{2+}) de la resina a pH neutro y se disocia del metal en pH ácido o cuando las concentraciones de imidazol en el buffer son elevadas (Fig.16).

Los extractos totales de bacterias con proteína recombinante se obtuvieron por sonicación en buffer de lisis desnaturizante a pH 7.8 (HCl de guanidina 6 M, NaH_2PO_4 20 mM, NaCl 500 mM). La interacción de los extractos bacterianos con la columna de cromatografía de Ni-NTA agarosa (Qiagen) se dejó a T/A durante 30 min. Las proteínas bacterianas fueron eliminadas al lavar la columna con amortiguadores con pH de 7.8, 6 y 5.3 (Urea 8 M, NaH_2PO_4 20 mM, NaCl 500 mM) y, finalmente, la proteína recombinante se eluyó a pH 4.

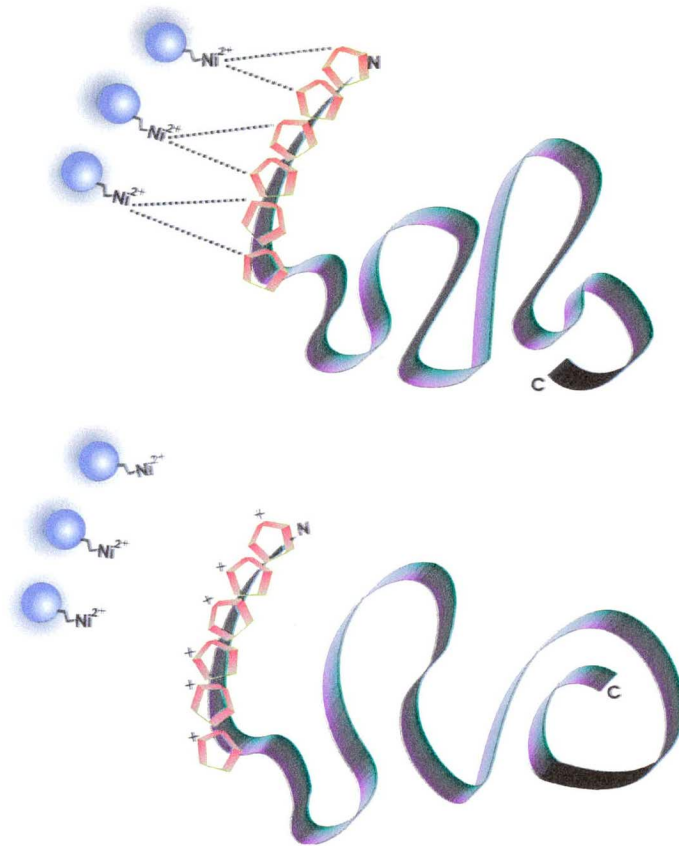


Figura 16. Cromatografía de afinidad a metales en resina de Ni-NTA.

La proteína EhrAD51 se generó como un polipéptido de fusión que posee una etiqueta de seis histidinas en el extremo amino, lo que facilita su purificación por cromatografía de afinidad. A pH neutro el grupo imidazol de las histidinas se une al níquel (Ni^{2+}) de la resina. Dos residuos de histidina pueden interactuar con un ión de Ni^{2+} . Las proteínas bacterianas que llegan a interactuar con el níquel se desprenden de la resina al lavarla con amortiguadores con pH de 6 a 8 (condiciones desnaturalizantes) o con un amortiguador conteniendo 20 mM de imidazol (condiciones nativas). Al disminuir el pH (4 a 5.9) o aumentar a 250 mM la concentración de imidazol, este grupo se protona y por tanto la proteína recombinante se disocia del Ni^{2+} , esta propiedad se aprovecha para eluir a la proteína recombinante pura.

A. Se muestra la interacción entre los iones de Ni^{2+} y el imidazol de las histidinas.

B. Se muestra como se libera el imidazol de la resina Ni-NTA. N, extremo amino de la proteína recombinante. C, extremo C-.

Pentágonos, anillos de imidazol. +, imidazol protonado.

La proteína recombinante nativa se purificó de igual manera, pero usando las siguientes soluciones: buffer de lisis (50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 10 mM Imidazol, pH 8); buffer de lavado (50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 20 mM Imidazol, pH 8) y buffer de elución (50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 250 mM Imidazol, pH 8).

Posteriormente, se analizó el contenido proteico de cada fracción en un SDS-PAGE al 15%.

26. Electroelución de la proteína EhRAD51.

Para obtener la proteína recombinante pura, fueron seleccionadas las fracciones de elución donde se observaba mayor concentración de la recombinante. Estas fracciones fueron resueltas en un gel preparativo SDS-PAGE al 15%, se cortó la orilla del gel para visualizar las proteínas con Coomassie y ubicar a la proteína recombinante. Este pedazo de gel se alineó con el resto y se escindió la banda correspondiente a la proteína EhRAD51. La banda se electro-eluyó en un sistema de electroelución (Modelo 422, BioRad) en buffer de electroforesis (Tris 25 mM, glicina 250 mM y SDS al 0.1 %) a 100 V durante 1 h. Finalmente, la proteína pura se recuperó y se cuantificó por el método de Bradford (Bradford, 1976).

27. Producción de anticuerpos policlonales contra la proteína EhRAD51.

Un conejo macho Nueva Zelanda de 2.5 Kg de peso fue sangrado a través de la vena de la oreja para obtener el suero preinmune. Posteriormente, fue inmunizado con 200 µg de proteína recombinante pura (EhRAD51) cada 10 días en tres ocasiones; la primera inmunización se administró con 100 µl del

adyuvante completo de Freund y, las subsecuentes, con 100 μ l del adyuvante incompleto de Freund. Transcurrido un mes de inmunización, se obtuvo la sangre y se colectó en tubos Eppendorf. Los tubos fueron incubados durante 30 min a 37 °C (para permitir la retracción del coágulo) y fueron centrifugados durante 5 min a 2,000 rpm. Finalmente se retiró el suero y se almacenó a -20 °C. Las inmunoglobulinas IgG fueron purificadas por cromatografía de afinidad usando columnas de proteína G.

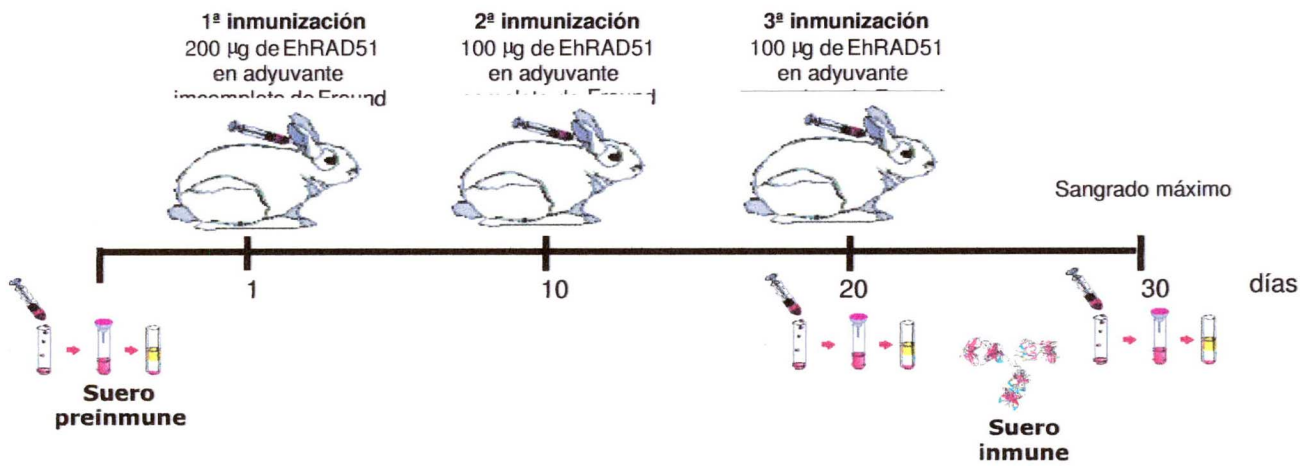


Figura 17. Esquema de inmunización para la obtención de anticuerpos policlonales anti-EhRAD51 en conejo. Un conejo fue sangrado a través de la vena de la oreja para obtener el suero preinmune e inmunizado con rEhRAD51 cada 10 días en tres ocasiones. Al día 30 se obtuvo la sangre y se obtuvo el suero inmune.

28. Inmunolocalización de la proteína EhRAD51 en *Entamoeba histolytica*

La microscopía de inmunofluorescencia indirecta fue llevada a cabo de acuerdo a la técnica descrita por Ausubel (Ausubel y cols., 1994). Los trofozoítos sometidos o no a irradiación con luz UV-C fueron cosechados por centrifugación a 500 xg durante 5 min a 4°C, y se añadió la cantidad de 1×10^6 trofozoítos a los pozos de una placa de (Corning), dentro de los cuales previamente habían sido colocados cubreobjetos estériles. Las placas fueron incubadas durante 2 h a 37°C hasta que las células se adhirieron. Enseguida, se les retiró el medio y las muestras fueron fijadas con paraformaldehído (PFA) al 4% en PBS pH 7.4 a 37°C, durante 45 min y lavadas con PBS. Posteriormente, las células fueron permeabilizadas con acetona fría durante 5 seg. Cada pozo se lavó nuevamente con PBS y con la finalidad de evitar uniones inespecíficas de los anticuerpos, las preparaciones se bloquearon con una solución de BSA al 1% a 37°C durante 40 min. Una vez bloqueadas, las células fueron incubaron 37°C por 1 h o a 4°C O/N con el anticuerpo policlonal primario anti-EhRAD51, hecho en conejo, usando una dilución 1:200. Como anticuerpo secundario se utilizó anti-IgG de conejo acoplado a fluoresceína FITC (Zymed) en una dilución 1:100; éste se incubó por 2 h a T/A. Después, las células fueron lavadas con PBS e incubadas con una solución de yoduro de propidio (10 µg/ml) por 5 min, se realizó un nuevo lavado con PBS y por último otro con agua estéril. Después del último lavado, los cubreobjetos con las células fueron montados en un portaobjetos con vectashield al 50 %. El control negativo consistió en trofozoítos incubados sólo con el anticuerpo anti-IgG de conejo conjugado a FITC. La fluorescencia de los planos ópticos seriales de los

trofozoítos se observó en un microscopio confocal Leica (SP2) y se analizó usando el programa Image J (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>).

29. Ensayos de unión de la proteína EhRAD51 al DNA.

Para realizar los ensayos de retardo de la movilidad electroforética en presencia de la proteína recombinante EhRAD51 nativa, fueron usadas dos sondas de DNA marcadas radioactivamente:

- i. Un oligonucleótido de cadena sencilla de 50 bases -ssDNA (*adh50*)- que contiene un segmento del extremo N-terminal del gen de la adhesina de 112 KDa (Banuelos y cols., 2005), marcado en el extremo 3' con [γ - 32 P]ATP (500 μ Ci/mmol) por la enzima polinucleótido cinasa T4 a 37°C durante 30 min
- ii. Un fragmento de doble cadena de 270 pares de bases -dsDNA (*pgp-270*)- correspondiente a la región 3'UTR del gen *EhPgp5* (Lopez-Camarillo y cols., 2003), que fue uniformemente marcado con [α - 32 P]ATP (200 μ Ci/mmol) a través de una reacción de PCR.

El ensayo se llevó a cabo en un volumen final de 25 μ l en un buffer de unión que contiene 50 mM Tris-HCl (pH 7.8), 1 mM DTT, 10 mM MgCl₂ y 1 mM ATP; en presencia de cantidades ascendentes de la proteína rEhRAD51 nativa (0, 2.5, 5 y 7.5 μ g). Las reacciones se iniciaron con la adición de las sondas radioactivas *adh50* o *pgp270* (10 000 cpm) a los tubos previamente preparados y su posterior incubación a 37°C durante 15 min. De manera simultánea, se realizó experimentos controles, sustituyendo la proteína rEhRAD51 por la fracción purificada obtenida de bacterias BL21 pLysS sin transformar. Finalmente, los complejos DNA-proteína fueron resueltos en

geles no desnaturizantes de poliacrilamida al 6% para DNA, los cuales posteriormente fueron secados en vacío y expuestos a una pantalla para detectar la radioactividad en el Phosphor Imager (BioRad).

30. Ensayo de formación de D-loop para la proteína EhRAD51

La actividad de transferencia entre cadenas de DNA homólogas mediada por rEhRAD51 fue evaluada mediante el ensayo de formación del D-loop de acuerdo al procedimiento descrito por Kinebuchi (Kinebuchi y cols., 2004). La figura 17 esquematiza el procedimiento para el ensayo D-loop realizado. De manera detallada, un fragmento de cadena sencilla de 200 bases - ssDNA (*pgp-200*)-, que es complementario a la región 3'UTR del gen *Ehpgp5* clonado en un plásmido dsDNA (Lopez-Camarillo y cols., 2003a), fue marcado radioactivamente con [γ -³²P]ATP (500 μ Ci/mmol) por la enzima polinucleótido cinasa a 37°C durante 30 min. Luego, cantidades crecientes de la proteína rEhRAD51 (0, 2.5, 5 and 7.5 μ g) fueron preincubadas en el buffer de reacción (50 mM Tris-HCl, 1 mM DTT, 10 mM MgCl₂ y 1 mM ATP a pH 7.8) con la sonda *pgp-200* (10 000 cpm) a 37 °C durante 15 min. Posteriormente, el plásmido homólogo dsDNA (1 μ M) se añadió a la mezcla de reacción y ésta se incubó a 37°C durante 30 min. Un plásmido no relacionado fue usado como dsDNA heterólogo control. Las reacciones fueron detenidas con la adición de SDS al 0.1% y, para evitar que la proteína EhRAD51 permaneciera unida a la sonda *sspgp-200*, las muestras fueron desproteinizadas con proteinasa K (1 mg/ml) a 37°C durante 10 min. Finalmente, éstas fueron corridas en geles de agarosa al 1% en buffer TAE 1X y transferidas a membranas de nylon (Amersham) en solución SSC 20X (NaCl 0.15 M, Citrato de Na 0.015M) O/N. La actividad de

transferencia entre cadenas de DNA homólogas para rEhRAD51 se evaluó mediante la visualización de los productos radioactivos en el Phosphor Imager (BioRad). Estos productos fueron cuantificados por densitometría usando el programa Quantity One (BioRad).

IV. RESULTADOS

1. La irradiación de los trofozoítos con luz UV-C (254 nm) 150 J/m² induce fragmentación del DNA

La activación de respuestas celulares específicas para reparar el daño al DNA ha sido demostrada en una amplia variedad de células expuestas a rayos X, radiación UV y agentes químicos (Woods y Dyll-Smith, 1997). Para iniciar el estudio de los mecanismos involucrados en reparación al DNA en *E. histolytica*, usamos irradiación con luz UV-C 254 nm a una dosis de 150 J/m². Nuestros experimentos evidenciaron que, al menos durante las primeras 12 h después de la irradiación, la sobrevivencia de las células no se afectó significativamente (Fig. 18).

Usando las mismas condiciones experimentales, analizamos la presencia de extremos hidroxilos 3' libres en el DNA mediante el ensayo de TUNEL. En los trofozoítos no irradiados la presencia de células positivas para el ensayo de TUNEL fue menor al 1%, mientras que un 57.4± 2.74% de las células sometidas a irradiación con UV-C a los 30 min presentaron rupturas en el DNA (Fig. 19). Interesantemente, la reducción en la fragmentación del DNA a las 3, 6 y 12 h después del tratamiento se hizo evidente (27.11± 4.84, 8.79± 3.36 y 0.77± 2.59%, respectivamente).

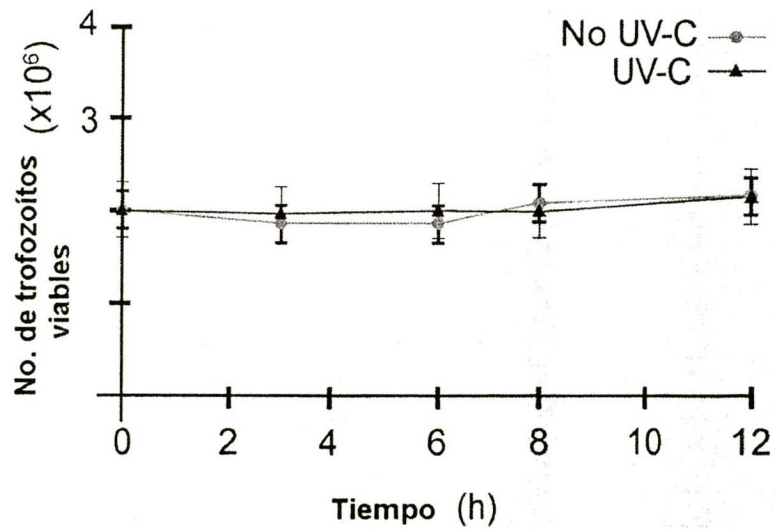


Figura 18. Efecto de la irradiación con luz UV-C en la viabilidad de las células. Curvas de crecimiento de los trofozoítos sometidos o no a irradiación con luz UV-C (dosis 150 J/m² durante 8 seg).

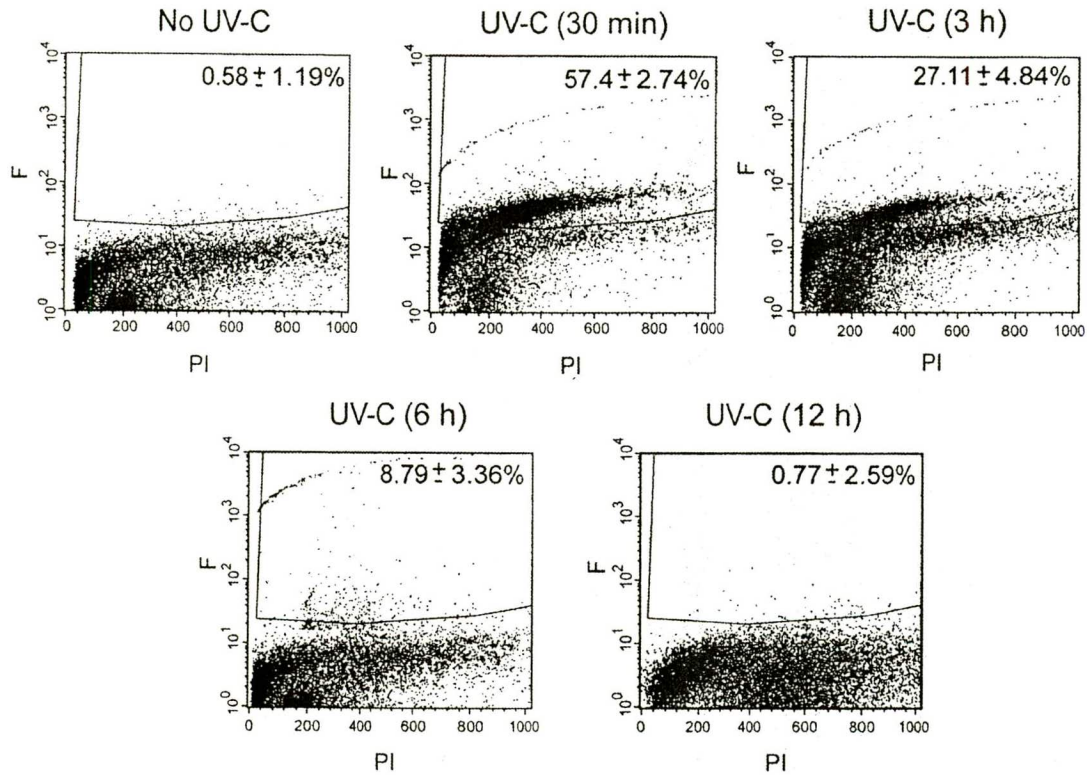


Figura 19. Ensayo de TUNEL por citometría de flujo en trofozoítos sometidos o no a irradiación con luz UV-C. Cada histograma denota el porcentaje de fragmentación del DNA en las células con fluorescencia positiva. La abscisa indica la fluorescencia del ioduro de propidio (PI) y la ordenada la fluorescencia del Alexa 488 unido a los extremos 3' liberados en el DNA (F). El número dentro de cada histograma refleja el porcentaje de las células positivas para fluorescencia arriba de la línea de corte.

El ensayo Cometa es un método simple y sencillo para estudiar el daño al DNA y la reparación. Con el objetivo de evidenciar el daño en células únicas luego de irradiar las células con luz UV-C, bajo las mismas condiciones de ensayo previamente evaluadas, se realizó un ensayo Cometa a pH neutro que permite detectar las rupturas de la doble cadena en el DNA. Los resultados obtenidos confirman la inducción de DSBs del DNA en los trofozoítos, luego del tratamiento genotóxico (figura 20). Se observó estructuras tipo cometa clásicas a los 30 min y las 3 h después de la inducción de daño, mientras que a las 6 h se visualizó una reducción evidente en los tallos del DNA. Como era de esperar, a las 12 h, la migración del DNA en los trofozoítos fue muy similar a la observada en las células control no irradiadas.

El análisis conjunto de estos datos indica que la irradiación de los trofozoítos con la dosis empleada de luz UV-C, indujo eficientemente daño genotóxico de tipo ruptura de doble cadena en el DNA y, como consecuencia, fueron activados mecanismos de reparación especializados que permiten restaurar la integridad del DNA y que garantizan la sobrevivencia de las células.

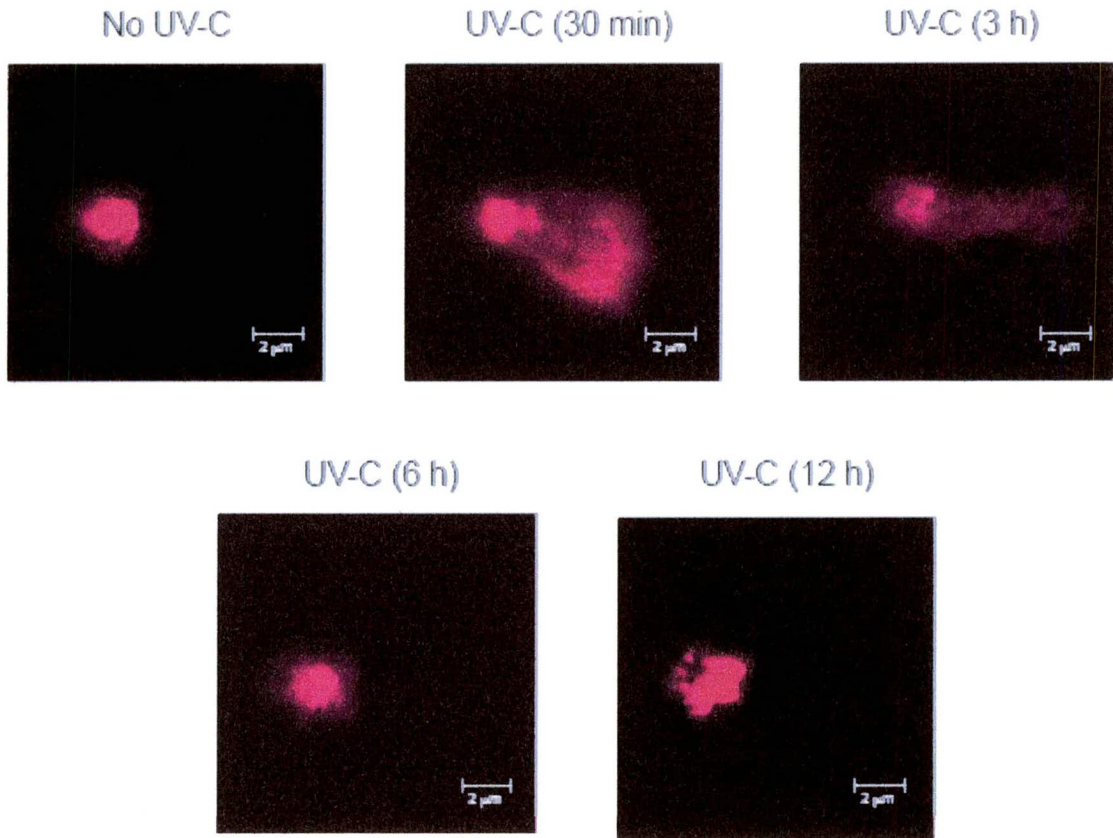


Figura 20. Ensayo Cometa o Electroforesis en una única célula realizado en trofozoítos sometidos o no a irradiación con luz UV-C. Cada panel refleja el patrón de corrida electroforética del DNA marcado con yoduro de propidio de las células lisadas para cada condición experimental.

2. La fosforilación temprana de la histona EhH2AX correlaciona con la presencia de daño al DNA.

Las DSBs inducen la fosforilación rápida de las histonas H2A yH2AX tanto en levadura como en humano, en un residuo de Ser altamente conservado localizado en un motif SQ cerca del extremo C-terminal, produciendo las formas fosforiladas γ H2A and γ H2AX, respectivamente. (Chen y cols., 2000). Se realizó una búsqueda en la base de datos Pathema del genoma de *E. histolytica* para identificar secuencias homólogas a H2AX y, como resultado, encontramos dos genes putativos (locus EHI_126210 y EHI_188960) con identidades de 55% y 57% (e-value 2e-27 y 2e-28) respecto a la proteínas SchH2A y HshH2AX. Estos genes fueron denotados en este trabajo como *Ehh2ax1* y *Ehh2ax2* y predicen dos proteínas parálogas conservadas que comparten un 93% de identidad. Ambos polipéptidos contienen el motif SQ con el residuo de serina conservado potencialmente fosforilable (Ser 156) (Fig. 21).

Debido a la alta conservación del C-terminal en *H. sapiens* y *E. histolytica*, fueron realizados ensayos de Western blot usando un anticuerpo humano anti- γ H2AX para detectar proteínas fosforiladas homólogas EhH2AX (γ EhH2AX) en extractos de proteínas citoplásmáticas (CE) y nucleares (NE) preparados a partir de trofozoítos no irradiados e irradiados, incubados 10 y 30 min. En las células no tratadas, identificamos una señal muy débil a la altura de los 17 kDa en NE, que corresponde al peso molecular (PM) esperado para las histonas γ EhH2AX (Fig. 22, línea 2). Por el contrario, esta banda no se observó en los CE (Fig. 22, línea 1). Interesantemente, a los 10 min después de irradiar, la banda de 17 kDa se hizo 5 veces más intensa en los NE, evidenciando un incremento en la cantidad de γ EhH2AX, mientras que no fue detectada en los CE (Fig.22B, panel superior, líneas 3 y 4).

Además, 30 min después, no se encontró señal ni en NE ni en CE (Fig. 22, panel superior, líneas 5 y 6). Como controles experimentales se usó el suero anti-EhPAP que reconoce la proteína EhPAP de 63 kDa (García Vivas y cols., 2005) tanto en los trofozoítos no tratados como los tratados con luz UV-C, lo cual confirmó la integridad de los extractos proteicos (Fig. 22, panel inferior). Estos resultados sugieren que *E. histolytica* posee dos proteínas parálogas EhH2AX que pueden ser fosforiladas como resultado de la exposición a la luz UV-C y el daño genotóxico. No obstante, estos experimentos no nos permiten distinguir cual de las dos proteínas EhH2AX fue modificada o si ambas se hallan fosforiladas. Estos datos muestran que la UV-C resultó ser un modelo útil para generar daño al DNA y estudiar los mecanismos de reparación en *E. histolytica*.

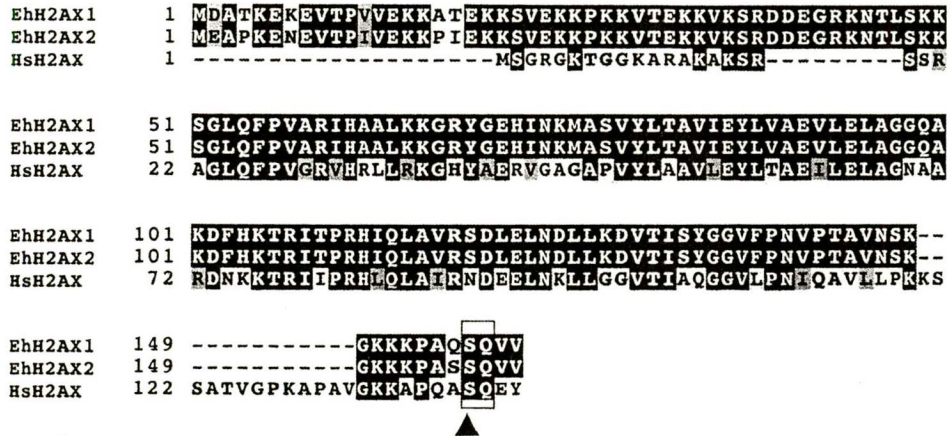


Figura 21. Identificación de las histonas H2AX de *E. histolytica*. Alineamiento múltiple de las secuencias de las proteínas H2AX de *E. histolytica* y *H. sapiens*. En las cajas negras aparecen los residuos de aa idénticos y en las grises los residuos de aa conservados; el motivo SQ del extremo C-terminal aparece encerrado en un rectángulo y la cabeza de flecha señala el residuo de serina potencialmente fosforilable (Ser 156). Los números a la izquierda de los alineamientos indican la posición relativa respecto a la metionina inicial para cada proteína.

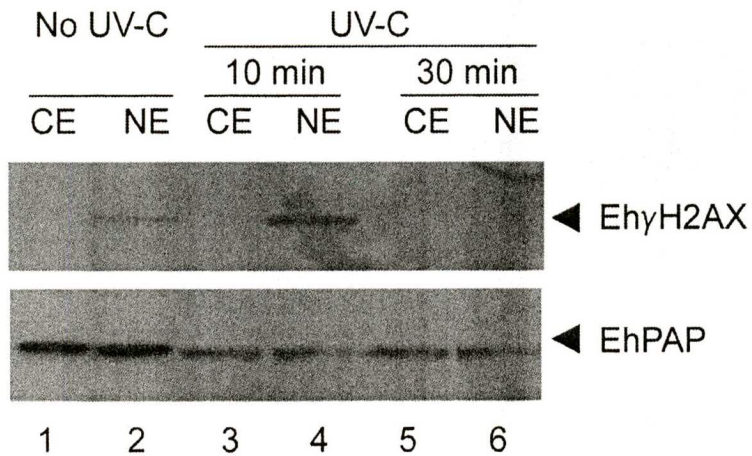


Figura 22. Inmunodetección de las histonas H2AX de *E. histolytica*.
 Ensayos de Western Blot para la inmunodetección de la forma fosforilada de las histonas EhH2AX (γ EhH2AX) usando un anticuerpo policlonal anti- γ H2AX fosfo-Ser140 de humano (panel superior).
CE, extractos de proteínas citoplásmicas de *E. histolytica*, **NE**, extractos de proteínas nucleares de *E. histolytica*
 Carriles 1 y 2 trofozoítos no irradiados
 Carriles 3 y 4 trofozoítos irradiados con luz UV C y cosechados 10 min después.
 Carriles 5 y 6 trofozoítos irradiados con luz UV C y cosechados 30 min después. En el panel inferior se muestra el ensayo de Western Blot control usando el suero anti-EhPAP.

3. El genoma de *E. histolytica* contiene genes homólogos al grupo de epistasis RAD52

Para investigar si los genes del grupo de epistasis se encuentran conservados en *E. histolytica*, se llevó a cabo una búsqueda en la base de datos de secuencias de *E. histolytica* (Tabla 5). Encontramos los genes *Ehmre1*, *Ehrad50* y *Ehnbs1* que podrían codificar para el complejo MRN, el cual funciona como sensor primario de las DSBs en otros organismos (Longhese M, 2006). Las proteínas predichas EhMRE11 y EhRAD50 exhibieron valores de identidad de 32 y 23% (valor de *e*: 3e-49 y 9e-36) con los ortólogos en *S. cerevisiae* y *H. sapiens*, respectivamente. Por otra parte, la secuencia de EhNBS1 parece ser más divergente (17 y 24% de identidad y valores de *e* de 0.003 y 0.002) (Tabla 4). Además, *E. histolytica* contiene genes que codifican para la recombinasa central EhRAD51 y una proteína paróloga EhRAD51C. Asimismo, fueron predichos genes para las proteínas EhRAD52, EhRAD54, EhRAD54B y EhRAD52/22 o EhRAD59 (Tabla 4). Tal y como ocurre en la levadura, algunos genes que participan en la recombinación homóloga en los vertebrados, como son los parálogos de *rad51*: *rad51b*, *rad51d*, *xrcc2* y *xrcc3*, parecen estar ausentes en este parásito. Como conclusión, podemos afirmar que el genoma de *E. histolytica* contiene una batería de genes implicados en la reparación del DNA por recombinación homóloga, lo cual sugiere que este protozoario está capacitado para llevar a cabo reparación del daño al DNA, de manera similar a como se ha reportado en otros organismos eucariontes.

Tabla 4. Comparación entre las proteínas predichas para el grupo de epistasis RAD52 en *E. histolytica* con las proteínas ortólogas de *H.sapiens* y *S. cerevisiae*

<i>Entamoeba histolytica</i>			<i>Homo sapiens</i>			<i>Saccharomyces cerevisiae</i>									
Proteína predicha	No. GeneBank	Locus ^a	No. de aa	Proteína	No. de acceso ^b	No. de aa	Valor de e	H (%)	I (%)	Proteína	No. de aa	No. de acceso ^b	Valor de e	H (%)	I (%)
EhMRE11	XM_651393	EHI_125910	596	MRE11	P49959	708	3e-49	51	32	MRE11	692	P32829	1e-33	45	26
EhMRE11-like	XM_644963	EHI_077650	223	MRE11	P49959	708	3e-23	51	25	MRE11	692	P32829	2e-20	49	27
EhRAD50	XM_647783	EHI_079960	1241	RAD50	Q92878	1312	2e-44	40	23	RAD50	1312	P12753	2e-43	46	27
EhNBS1	XM_647447	EHI_098770	764	NBS1	Q6IQ31	754	0.0022	40	24	XRS2	854	P33301	e+3	28	17
EhRAD51	XM_648984	EHI_031220	367	RAD51	Q06609	339	e-125	83	71	RAD51	400	P25454	2e-43	78	60
EhRAD51C	XM_619126	EHI_122860	284	RAD51C	Q433502	376	3e-17	51	28	RAD57	460	P25301	e-109	47	27
-	-	-	-	RAD51B	O15315	350	-	-	-	RAD55	406	P38953	-	-	-
-	-	-	-	RAD51D	O75771	289	-	-	-	-	-	-	-	-	-
-	-	-	-	XRCC2	O43543	280	-	-	-	-	-	-	-	-	-
-	-	-	-	XRCC3	O43542	346	-	-	-	-	-	-	-	-	-
EhRAD52	XM_648599	EHI_188230	243	RAD52	P43351	418	2e-35	71	48	RAD52	504	P06778	1e-23	57	38
EhRAD54	XM_648260	EHI_103840	885	RAD54	Q92698	747	e-115	58	41	RAD54	898	P32863	e-106	56	37
EhRAD54B	XM_645236	EHI_114930	765	RAD54B	Q9Y620	910	e-130	52	36	RDH54	920	P32863	e-114	55	39
EhRAD52/22	XM_651011	EHI_112840	190	-	-	-	-	-	-	RAD59	238	Q12223	2e-08	45	25

^a Base de datos de *E. histolytica* Pathema

^b Base de datos Swiss-Prot/TrEMBL

I, identidad; H, homología

4. Los genes ortólogos del grupo de epistasis RAD52 de *E. histolytica* se expresan diferencialmente en respuesta a la irradiación con luz UV-C

Con el objetivo de establecer el papel de los genes relacionados al grupo de epistasis RAD52 en *E. histolytica* durante la reparación del daño al DNA, fueron evaluados los perfiles de expresión de los RNA mensajeros de dichos genes por ensayos de RT PCR, usando el modelo de irradiación previamente establecido.

La mayoría de los genes mostró un patrón de expresión diferencial antes y después del tratamiento (Fig. 23). Los genes *Ehmre11*, *Ehrad51*, *Ehrad51c* y *Ehrad52* fueron transcritos a muy bajos niveles en los trofozoítos no irradiados, mientras la expresión de sus mensajeros se indujo a diferentes tiempos que oscilan entre los 30 min y las 12 h luego del daño genotóxico. Particularmente, luego de irradiación con luz UV-C, la expresión del RNAm para el gen *Ehrad51* se indujo 16 veces a los 30 min, 11 veces a las 3 h y 4 veces a las 12 h, en comparación con las células no tratadas. Por otro lado, los genes *Ehnbs1*, *Ehrad54* y *Ehrad52/22* expresaron transcritos abundantes en los trofozoítos no irradiados, no obstante, estos niveles disminuyeron luego de la irradiación. La expresión del gen *Ehrad50* mostró un comportamiento particular. Sus niveles de mensajero fueron elevados en los trofozoítos no irradiados, sin embargo, 30 min después del tratamiento genotóxico, estos niveles disminuyeron drásticamente, mientras que a las 3 h se encontraron nuevamente niveles de transcritos elevados que finalmente disminuyeron a las 12 h (Fig. 23). Asimismo, el gen *Ehrad54b* parece no estar expresándose

bajo las condiciones experimentales evaluadas. Como control se monitoreó la expresión del RNA ribosomal 25S (*rRNA25S*) cuyos niveles se mostraron prácticamente invariables. Estos datos muestran que los genes relacionados al grupo de epistasis RAD52 en *E. histolytica* se expresan diferencialmente en respuesta al daño genotóxico inducido con luz UV-C, por lo que la respuesta transcripcional de dichos genes pareciera no estar coordinada.

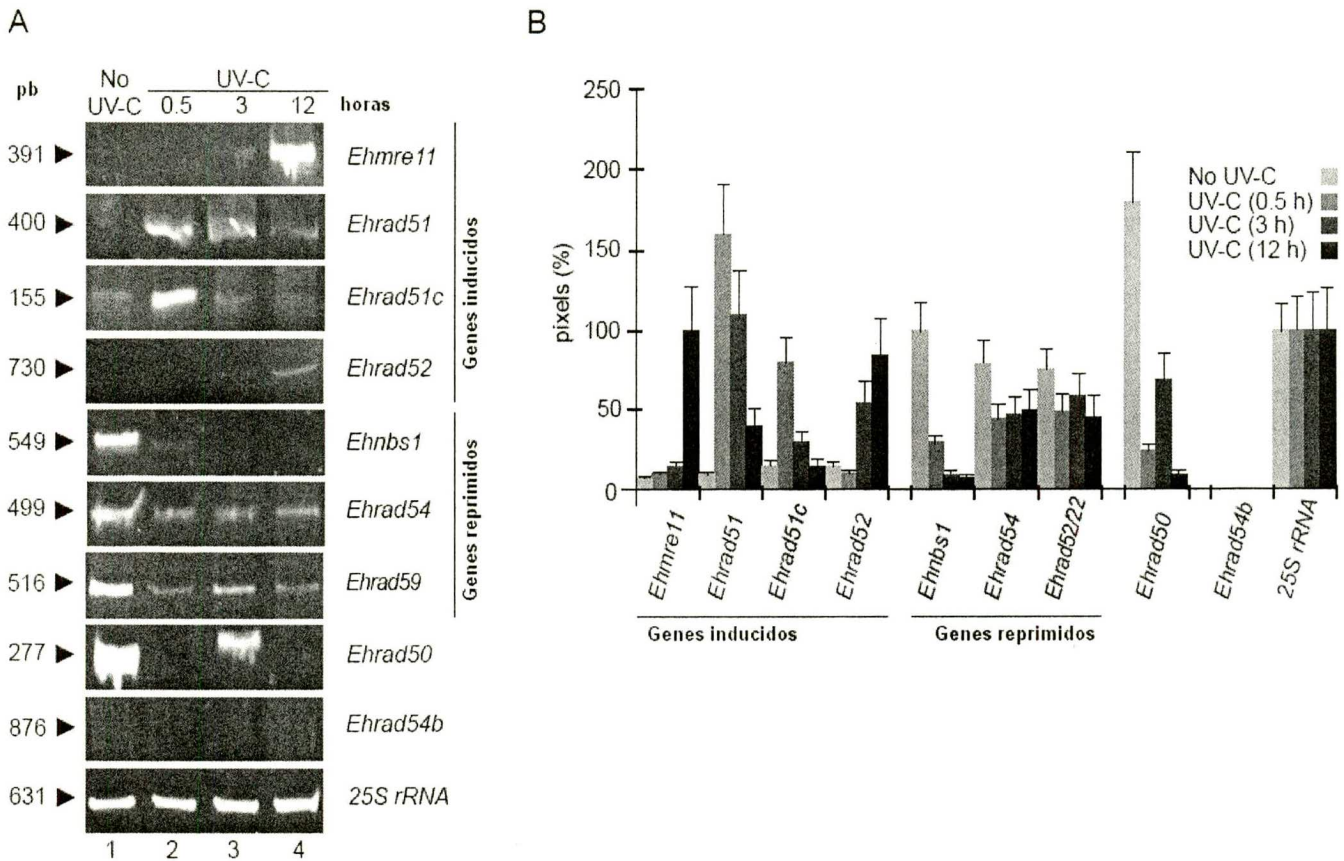


Figura 23. Perfiles de expresión de los RNAm para los genes relacionados al grupo de epistasis *rad52* en *E. histolytica*.

A. Electroforesis en geles de poliacrilamida al 6% teñidos con bromuro de etidio mostrando los productos de las RT-PCR amplificados de los trofozoítos no irradiados (carril 1) o de células irradiadas con luz UV-C y cosechadas a diferentes tiempos (carril 2, 0.5 h; carril 3, 3 h y carril 4, 12 h). Las cabezas de flecha señalan la longitud de los amplicones (pb)

B. Análisis densitométrico de los productos de las RT-PCR mostrados en el panel A. Los píxeles correspondientes al amplicón control 25S rRNA fueron tomados como 100%. Los datos grafican los valores promedio de tres experimentos independientes.

5. La proteína EhRAD51 predicha conserva la arquitectura típica de la familia RECA/RAD51

Debido a que las recombinasas de la familia RECA/RAD51 son enzimas claves en los procesos de reparación del DNA por HR (Bell, 2005), nos enfocamos en la caracterización de la proteína RAD51 de *E. histolytica*. El gen *Ehrad51* de 1098 pares de bases, no contiene intrones y predice un polipéptido de 367 aa con un PM teórico de 40.3 KDa. El análisis bioinformático realizado mediante BLAST, para comparar la secuencia predicha para EhRAD51 con proteínas ortólogas, arrojó valores bajos de e que oscilan desde $3e^{-29}$ hasta $2e^{-20}$ para RAD51 de diversos organismos eucariontes (Tabla 5). Conjuntamente, EhRAD51 mostró altos valores de identidad (desde 59% hasta 75%) con las proteínas RAD51 de *S. cerevisiae*, *Arabidopsis thaliana*, *L. major*, *T. brucei*, *Mus musculus* y *H. sapiens*. Por otro lado, la secuencia aminoacídica de EhRAD51 presentó una identidad de 51% con la proteína RADA de *Methanococcus voltae* y de 36% con la RECA de *E. coli* (Tabla 5).

El alineamiento de la secuencia de la proteína EhRAD51 con los ortólogos de otros organismos revela que éstos comparten altos grados de identidad y homología hacia el extremo C-terminal, siendo las regiones N-terminal mucho más divergentes (Fig. 24). De este modo, es posible predecir que la proteína EhRAD51 contiene un dominio de polimerización putativo (PM 110-116 aa), el cual ha sido descrito como necesario para el ensamblaje de los múltiples monómeros de RAD51 en el humano (Wu y cols., 2005). De igual manera se identificaron para EhRAD51 los motivos de ATPasa Walker A (152-159 aa) y

RESULTADOS

López-Casamichana M.
 Posgrado en Ciencias Genómicas de la UACM

Tabla 5. Valores arrojados por el análisis BLASTP de la secuencia de EhRAD51.

Proteína	Organismo	No. de acceso ^a	Residuos (aa)	Identidad (%)	Homología (%)	Valor de e
RAD51	<i>Homo sapiens</i>	Q06609	339	75	85	3e-29
RAD51	<i>Mus musculus</i>	Q08297	339	75	85	3e-29
RAD51	<i>Trypanosoma brucei</i>	Q9U6W1	373	68	78	3e-23
RAD51	<i>Leishmania major</i>	O61127	377	65	78	3e-22
RAD51	<i>Arabidopsis thaliana</i>	P94102	342	62	78	7e-22
RAD51	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	P25454	400	59	77	2e-20
RADA	<i>Methanococcus voltae</i>	O73948	322	51	74	9e-16
RECA	<i>Escherichia coli</i>	P0A7G9	352	36	45	0.0075

^a Base de datos Swiss-Prot/TrEMBL

Walker B (240-249 aa), el loop L1 de unión a DNA de cadena sencilla (255-264 aa), el loop L2 (293-313 aa), así como también un dominio en el extremo carboxilo que se ha denominado ATP cap (342-350 aa) ya que recubre a la molécula de ATP, este dominio parece ser esencial para el ensamblaje del nucleofilamento y la hidrólisis del ATP en las recombinasas de la familia RAD51/RECA (Wu y cols., 2005 ;Shin y cols., 2003). De manera contrastante, el extremo amino de la proteína EhRAD51 posee una región de baja complejidad de unos 33 residuos de aminoácidos, que se encuentra altamente enriquecida en glutamatos y que no se halla presente en ninguna otra recombinasa de esta familia (Fig. 25).

Además, como parte de este análisis, se infirió las relaciones filogenéticas de una serie de proteínas de la familia RAD51/RECA de diversos organismos con relación a EhRAD51 (Fig. 26). El árbol fue creado con el programa MEGA 3.1 usando el algoritmo Neighbor Joining partiendo de los alineamientos de las secuencias completas de las proteínas. Los números en cada nodo indican el porcentaje de veces que la rama fue obtenida en un total de 1000 réplicas de la prueba. La inferencia filogenética arrojada muestra una evolución progresiva de estas recombinasas desde eubacterias a eucariontes y relaciona a EhRAD51 más cercanamente con las proteínas de otros protozarios como *T. brucei* y *L. major*.

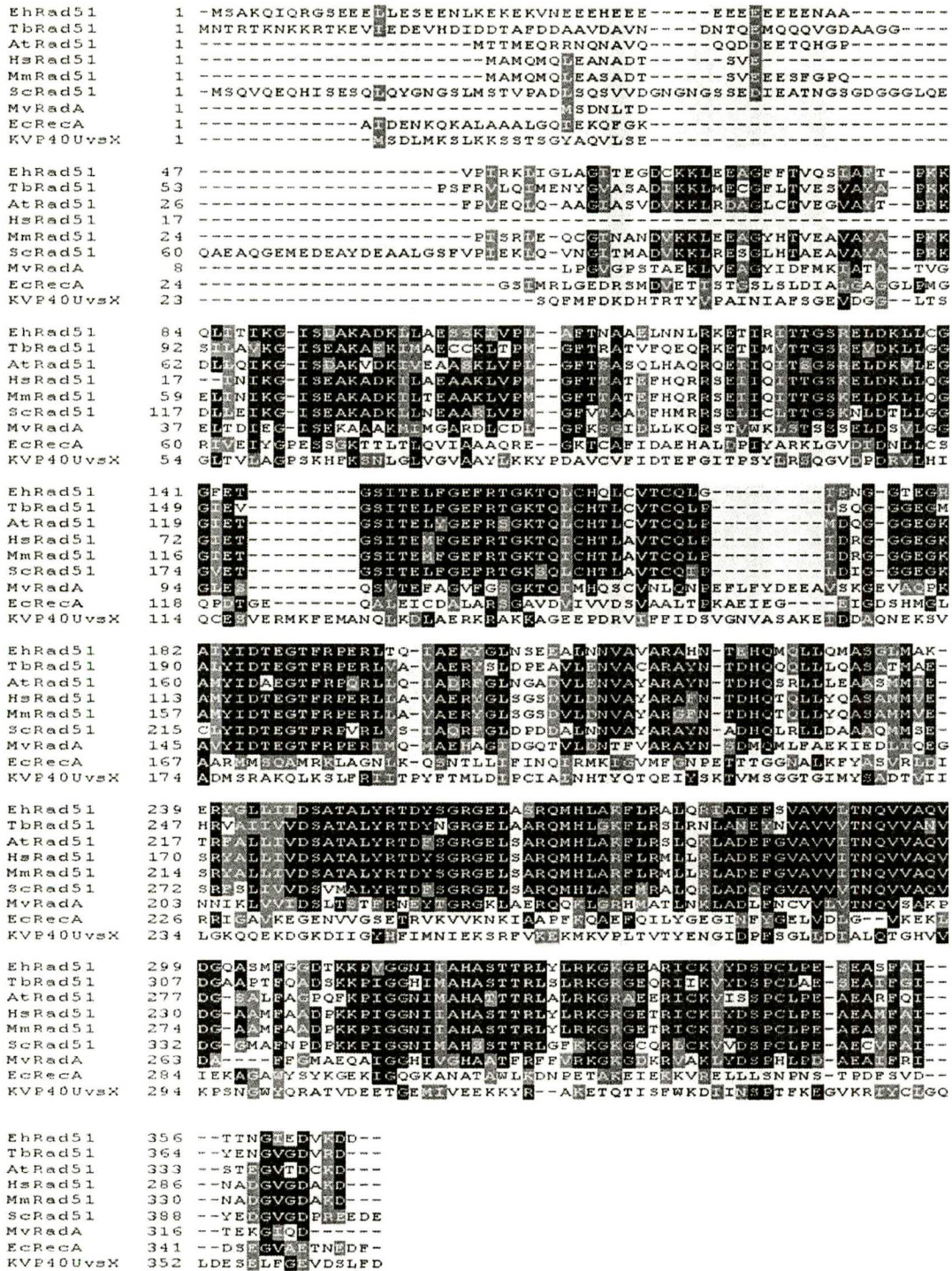


Figura 24. Alineamiento múltiple de la secuencias de proteínas de la familia RECA/RAD51 de *Tripanosoma brucei* (Tb), *Arabidopsis thaliana* (At), *Homo sapiens* (Hs), *Mus musculus* (Mm), *Saccharomyces cerevisiae* (Sc), *Methanococcus voltae* (Mv), *Escherichia coli* (Ec) y el bacteriófago KVP40.

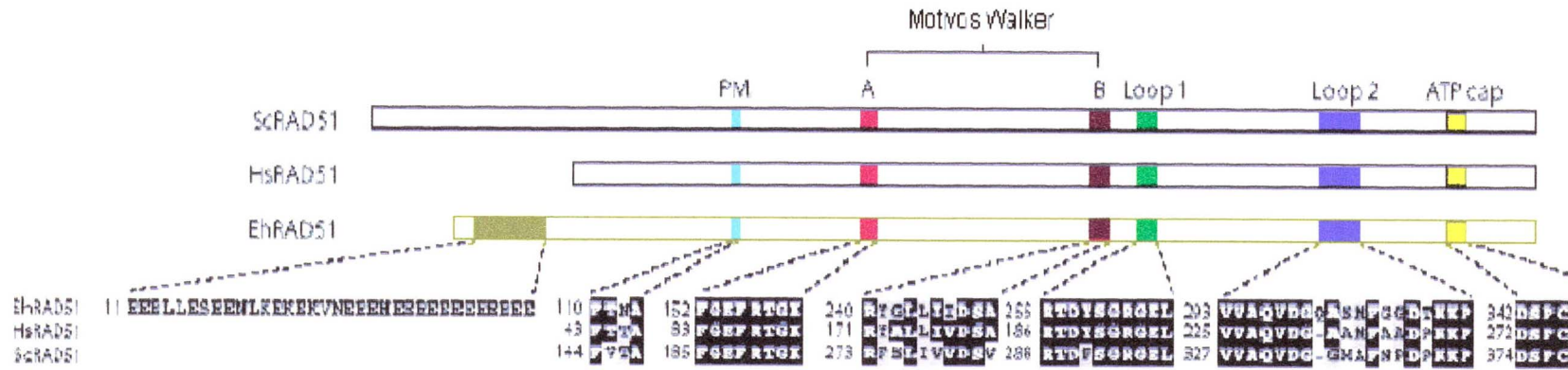


Figura 25. Comparación de la secuencia de EhRAD51 con otras proteínas RAD51. Representación esquemática del alineamiento múltiple de los dominios funcionales de RAD51 de *E. histolytica* (EhRAD51), *S. cerevisiae* (ScRAD51) y *H. sapiens* (HsRAD51). Las cajas negras indican los aminoácidos idénticos entre secuencias, las cajas grises los aminoácidos con sustituciones conservadas. En los rectángulos de colores se resaltan la región rica en glutamato, el motivo de polimerización (PM), los motivos Walker A y B, las regiones L1 y L2, así como el ATP cap. Los números a la izquierda de los alineamientos indican la posición de los aminoácidos respecto a la metionina inicial para cada proteína.

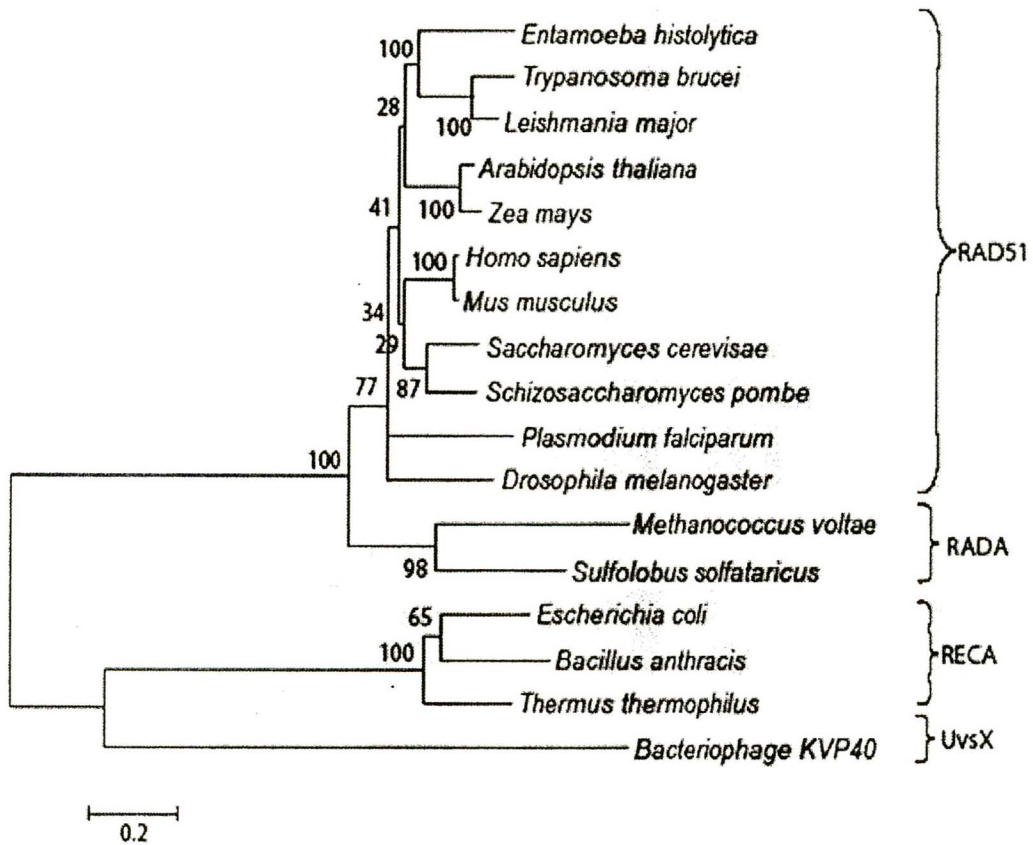


Figura 26. Relaciones filogenéticas entre EhRAD51 y otros miembros de la familia RECA/RAD51 de diferentes especies.

El árbol fue creado con el programa MEGA 3.1 usando el algoritmo Neighbor Joining partiendo de los alineamientos de las secuencias completas de las proteínas. Los números en cada nodo indican el porcentaje de veces que la rama fue obtenida en un total de 1000 réplicas de la prueba.

6. Predicción de la estructura secundaria y terciaria de EhRAD51

La estructura secundaria y terciaria de la proteína putativa EhRAD51 se predijo por modelado de homología, usando como templado la estructura cristalográfica resuelta para la recombinasa RAD51 de *S. cerevisiae*. Esta predicción excluye los primeros 46 aminoácidos de EhRAD51 correspondientes a la región rica en glutamatos. De acuerdo al modelo obtenido, usando el programa Pymol PBD, el dominio N-terminal (ND) está constituido por un agregado de 5 α hélices ($\alpha 1$ a $\alpha 5$) que va seguido por el dominio de polimerización (PM). Por su parte, el dominio ATPasa (AD) de esta proteína consiste de un núcleo que incluye 10 hojas β rodeadas por ambos lados de α hélices (Fig. 27). El motivo Walker A o sitio de unión a ATP (P-loop) se encuentra entre la hoja $\beta 1$ y la hélice $\alpha 8$ y conserva dos residuos catalíticos importantes (lisina 160 y treonina 160), que están asociados a la estabilización del ión Mg^{2+} y al contacto con el fosfato γ del ATP en la proteína RADA de *M. voltae*. (Wu y cols., 2005). El motivo Walker B se localiza en la hoja $\beta 4$ y está precedido por un loop que corresponde a la región de unión a DNA de cadena sencilla de la familia RECA/RAD51. Además el loop 2 de EhRAD51 está constituido por dos cadenas β interconectadas ($\beta 7$ y $\beta 8$) tal y como se presenta en la estructura del cristal de la RAD51 de levadura (Qian y cols., 2006) y el ATP cap se halla localizado justamente debajo del sitio de unión a ATP o P-loop. Esta predicción confirma que EhRAD51 posee las características estructurales y los dominios funcionales que distinguen a los

RESULTADOS

López-Casamichana M.

Posgrado en Ciencias Genómicas de la UACM

miembros de la familia RECA/RAD51, lo que, a su vez, sugiere que podría funcionar como una enzima recombinasa.



Figura 27. Predicción de la estructura terciaria de la proteína EhRAD51.

A. Modelo tridimensional teórico de la recombinasa EhRAD51 mostrando el dominio amino-terminal (ND) y el dominio ATPasa (AD), conectados por el motivo de polimerización (PM).

B. Acercamiento de los motivos Walker A y B motif, mostrando los residuos catalíticos conservados lisina (K160) y treonina (T160). El ATP cap también se representa en proximidad con una molécula de ATP.

C. Acercamiento del motivo de polimerización (PM) y de sus residuos conservados.

Los dominios han sido resaltados en diferentes colores: PM en violeta, Walker A en rojo, Walker B en verde, ATP cap en azul, Loop 1 en amarillo y Loop 2 en púrpura.

7. La expresión del mensajero del gen *Ehrad51* está regulada en las fases del ciclo celular

Con el objetivo de indagar acerca del posible papel de EhRAD51 en procesos relacionados con la replicación del DNA y el ciclo celular, por medio de ensayos de RT-PCR, se evaluó la expresión del gen *ehrad51* en trofozoítos de la clona L6 sincronizados en las diferentes fases del ciclo celular con colchicina (Orozco y cols, 1988). Los resultados obtenidos se reflejan en la figura 28 y muestran que *ehrad51* aparentemente no se transcribe en la fase M, aunque no podemos descartar que sus niveles sean demasiado bajos para ser detectados por esta metodología. Por otro lado, durante la fase S del ciclo celular la expresión del mensajero del gen fue 2 y 2.6 veces mayor con relación a las fases G1 y G2, respectivamente. Como control se amplificó el gen *actina* en todas las condiciones evaluadas y prácticamente no se observó cambios en sus niveles de transcritos durante el ciclo celular. Estos hallazgos muestran que la expresión del mensajero del gen *Ehrad51* está siendo regulada durante la progresión del ciclo celular.

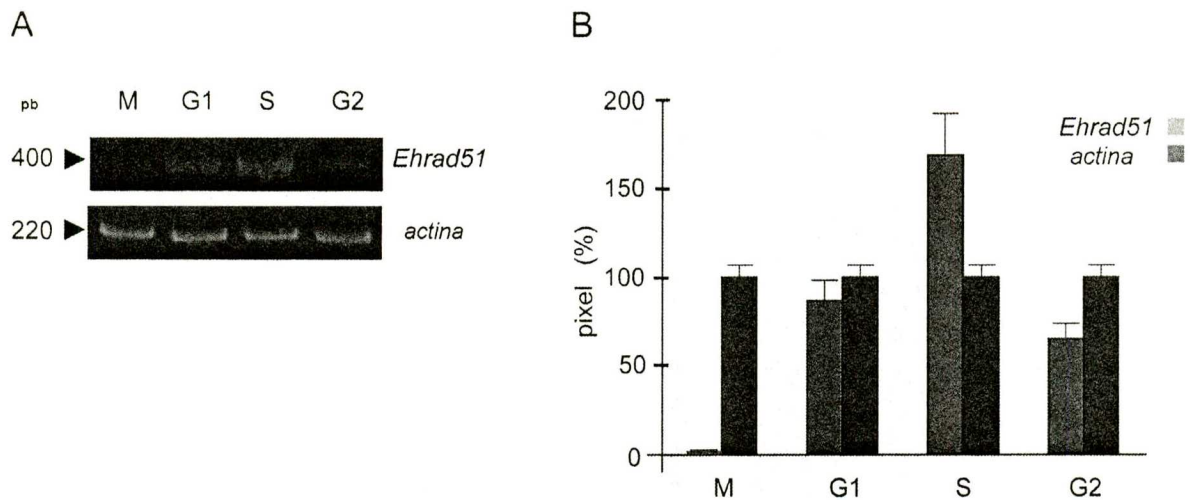


Figura 28. Perfil de expresión de los RNA mensajeros del gen *Ehrad51* en las diferentes fases del ciclo celular.

A. Electroforesis en gel de poliacrilamida al 6% teñido con bromuro de etidio mostrando los productos de RT-PCR para el gen *Ehrad51* amplificados a partir de cDNA preparado de trofozoítos sincronizados en las diferentes fases del ciclo celular. Como control de carga se amplificó *actina* bajo las mismas condiciones. Las cabezas de flecha señalan la longitud de los respectivos amplicones (pb)

B. Análisis densitométrico de los productos de las RT-PCR mostrados en el panel A. Los píxeles correspondientes al amplicón control *actina* fueron tomados como 100%. Los datos grafican los valores promedio de tres experimentos independientes.

8. Clonación del gen *Ehrad51* en el vector de expresión PRSET A

A partir de DNA total de trofozoítos y usando oligonucleótidos específicos con sitios de restricción para las enzimas BamHI y HindIII (ver estrategia experimental), se amplificó un fragmento que contiene el gen *Ehrad51* completo de 1098 pb así como 6 pb río arriba del sitio de inicio de la traducción (ATG) y 240 pb la región UTR (Fig. 29 A). El amplicón obtenido de 1.34 kb, conteniendo el marco de lectura abierto con homología a la recombinasa *EhRAD51*, se purificó y se ligó al plásmido pRSET-A previamente linearizado con las enzimas de restricción BamHI y HindIII. Con esta construcción se transformaron células competentes *E. coli* DH5 α y se seleccionaron 12 colonias como candidatas para la inserción del gen heterólogo. Se propició el crecimiento de las colonias en medio líquido y se les extrajo el DNA plasmídico, el cual se sometió a una doble digestión con las enzimas BamHI y HindIII. Los productos obtenidos fueron analizados en un gel de agarosa al 1% que se tiñó con bromuro de etidio (Fig. 29 B). Las 12 clonas candidatas contenían el plásmido recombinante ya que fueron capaces de liberar el fragmento esperado de 1.34 Kb. La construcción de la clona 1 se seleccionó para secuenciación automatizada usando oligonucleótidos específicos para el vector y siguiendo la metodología ya descrita. En la figura 30 se muestra una parte del electroferograma donde se localizó sobre la secuencia (flecha) el inicio del gen *Ehrad51* de 1,098 pb.

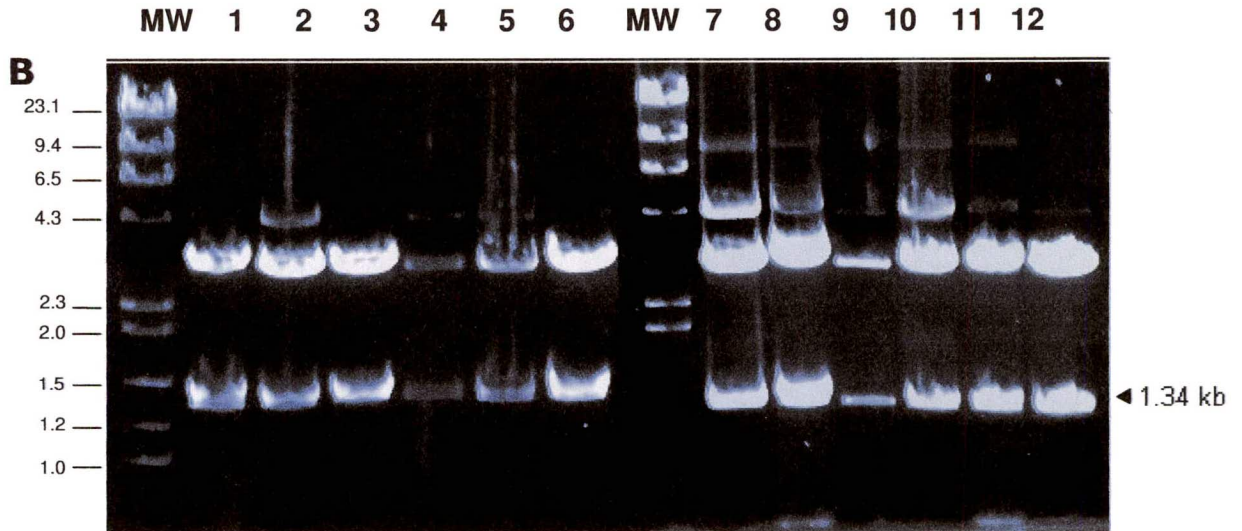
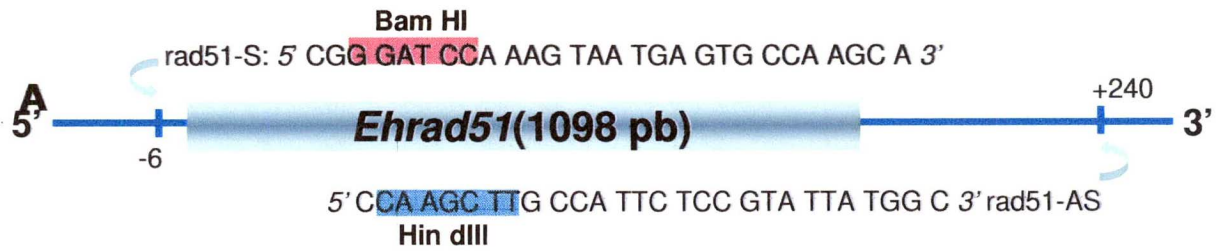


Figura 29. Clonación del gen *Ehrad51* en el plásmido PRSET-A.

A. Representación esquemática del fragmento clonado en el vector pRSET-A que contiene el gen *Ehrad51* completo de 1098 pb así como 6 pb río arriba del ATG y 240 pb de la región UTR.

B. Gel de agarosa al 1% mostrando los productos de digestión con las enzimas *BamHI* y *HindIII* del DNA plasmídico obtenido de las clonas candidatas. La cabeza de flecha señala el inserto liberado correspondiente al fragmento de 1.34 kb conteniendo al gen *Ehrad51* en todas las clonas analizadas.

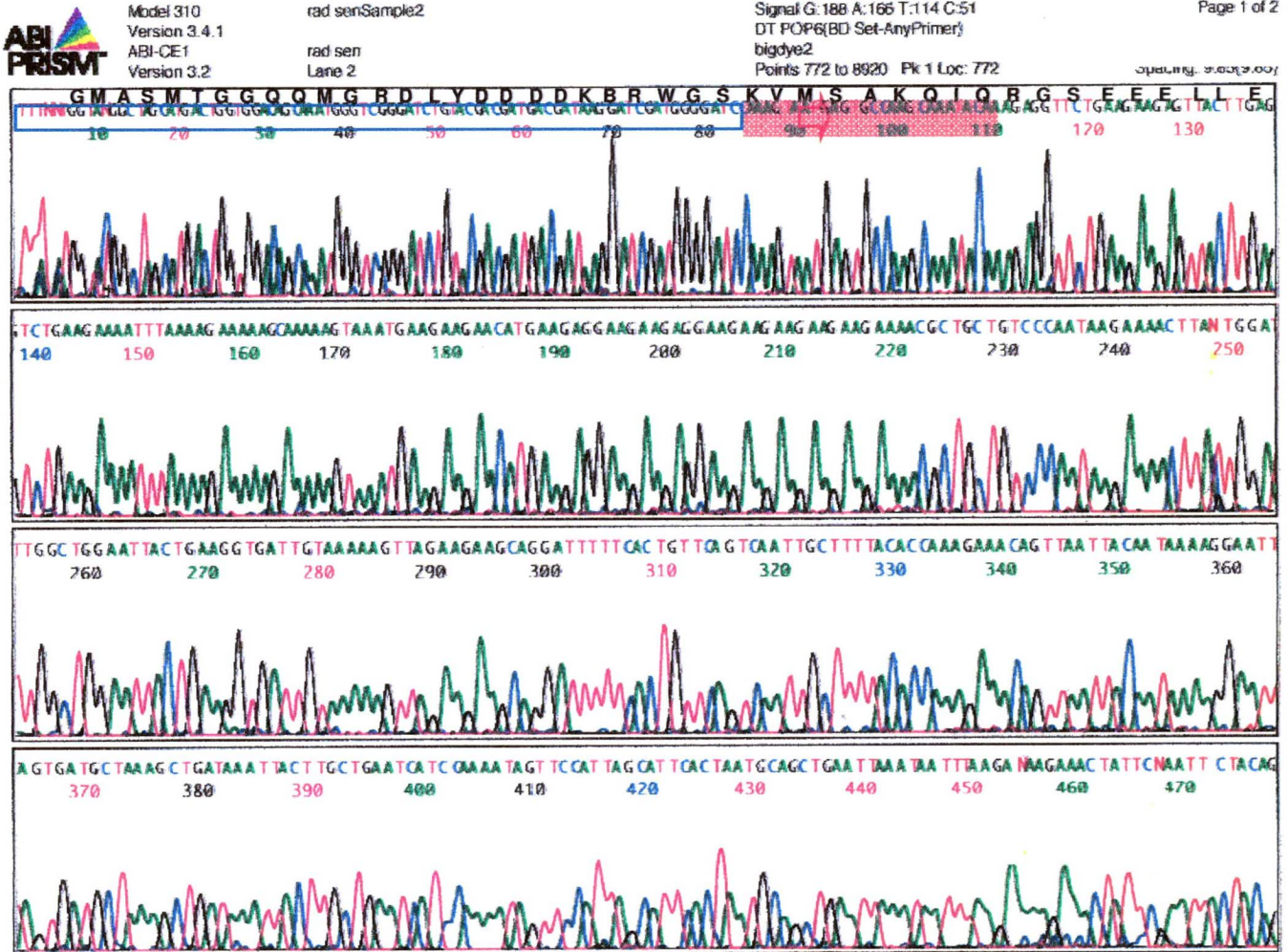


Figura 30. Electroferograma de la secuenciación del gen *Ehrad51*.

La construcción *pRSET-Ehrad51* de la clona 1 se secuenció por electroforesis capilar en un secuenciador automático ABI PRISM. La secuencia dentro del recuadro rojo alinea con el oligonucleótido *S-Ehrad51* que se utilizó para amplificar el inserto por PCR.

La flecha roja señala el codón ATG que codifica para la metionina inicial.

9. Inducción de la expresión de la proteína recombinante EhRAD51 en *E. coli*.

Para inducir la expresión de la proteína recombinante rEhRAD51-6xHis, se transformaron bacterias *E. coli* competentes de la cepa BL21(DE3)pLysS con el plásmido *pRSET-Ehrad51*. Una colonia seleccionada de las placas de LB ampicilina/cloranfenicol se cultivó en medio 2TYI líquido suplementado con ampicilina y cloranfenicol. Cuando el cultivo celular alcanzó una D.O entre 0.6 y 0.8 se añadió el inductor IPTG a una concentración final de 1mM, y se propició el crecimiento de las bacterias a tiempos de 1, 3 y O/N. Los extractos proteicos correspondientes a cada condición fueron corridos en geles de poliacrilamida al 10 % y las proteínas fueron visualizadas por tinción con azul de Coomasie (Fig. 31 A). En los carriles 2, 3 y 4 correspondientes a los tres diferentes tiempos de inducción se observa el enriquecimiento de una proteína de peso molecular 47 kDa, que corresponde al peso esperado para la proteína rEhRAD51 fusionada a la etiqueta de histidinas. La identidad de dicha proteína fue corroborada por ensayos de Western Blot, usando un anticuerpo monoclonal anti-6His, que fue capaz de reconocer a la proteína de 47 kDa sólo en los extractos inducidos (Fig. 31 B). La solubilidad de la proteína recombinante fue evaluada y se determinó que ésta se expresa mayoritariamente en la fracción soluble de las proteínas bacterianas. Para ensayos subsecuentes se reprodujo el protocolo realizando la inducción O/N, debido a que bajo estas condiciones se logró un mayor rendimiento.

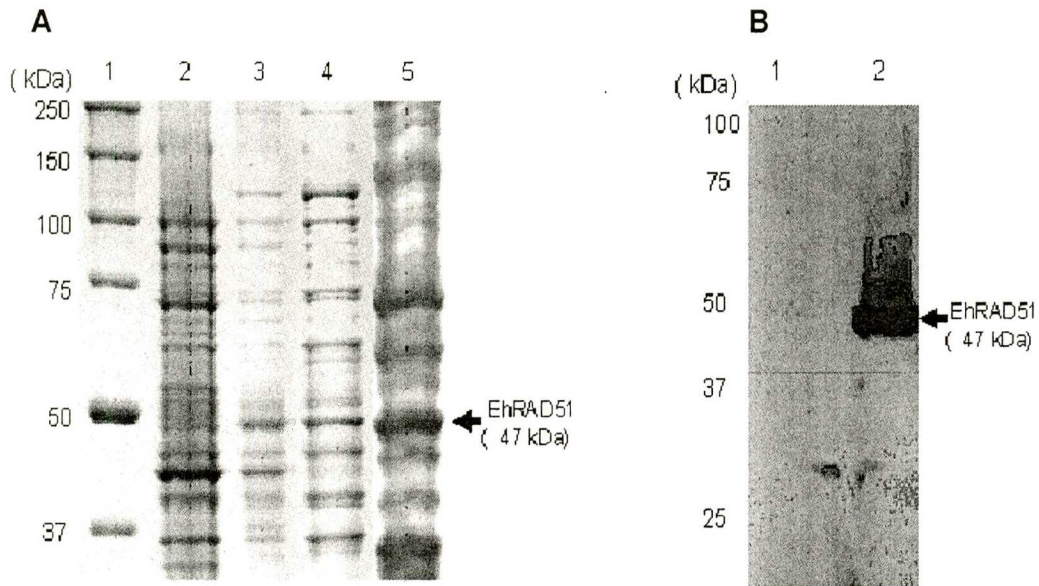


Figura 31. Inducción de la expresión de la proteína recombinante en bacterias BL21(DE3)pLysS.

A. Gel de SDS poliacrilamida al 10 % teñido con azul de Coomassie mostrando el corrimiento electroforético de:

carril 1, marcadores de peso molecular;

carril 2, extractos de bacterias no inducidas;

carril 3, extractos de bacterias inducidas con IPTG durante 1 hora;

carril 4, extractos de bacterias inducidas con IPTG durante 3 h y

carril 5, extractos de bacterias inducidas con IPTG O/N.

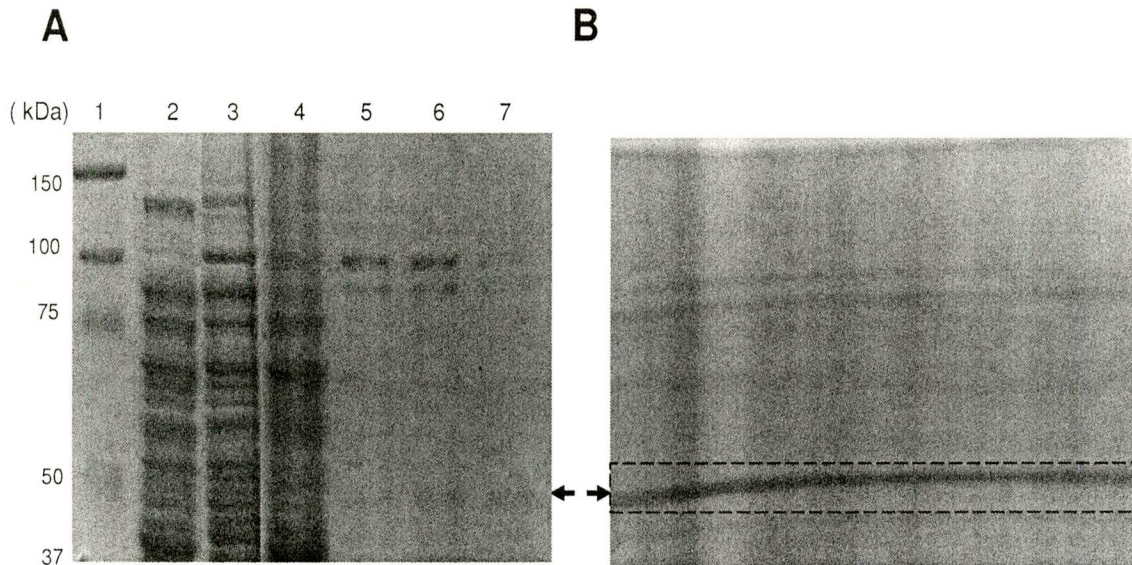
B. Ensayo de Western Blot usando un anticuerpo monoclonal anti-6His en extractos de bacterias no inducidos (carril 1) e inducidos O/N (carril 2).

10. Purificación de la proteína recombinante EhRAD51

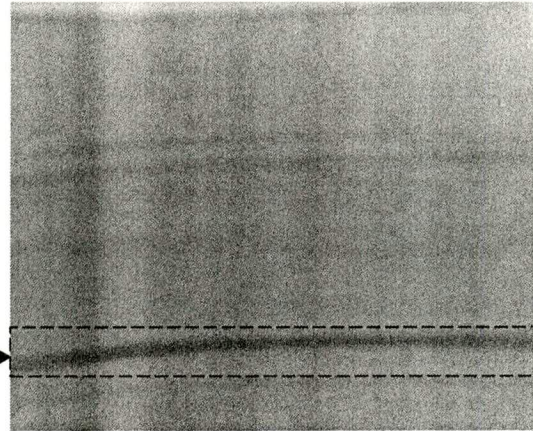
El polipéptido recombinante EhRAD51 expresado como proteína de fusión a la etiqueta de histidinas fue purificado por cromatografía de afinidad usando una resina de Níquel-NTA. Se emplearon tanto condiciones nativas como desnaturalizantes (Fig. 32 A). En las fracciones de elución, donde se recuperó a la proteína en cuestión, fueron encontradas, minoritariamente, proteínas bacterianas contaminantes que, probablemente, presentaron afinidad por la columna de Níquel-NTA.

La purificación bajo condiciones desnaturalizantes permitió obtener mayor rendimiento en cuanto a cantidad del polipéptido rEhRAD51. Las fracciones de elución bajo estas condiciones fueron purificadas cortando la banda de 47 kDa en un gel preparativo de SDS y poliacrilamida al 10 % (Fig. 31 B). La proteína de 47 kDa fue electroeluída de la matriz del gel, cuantificada y, su identidad fue corroborada mediante un ensayo de Western Blot usando el anticuerpo monoclonal anti-6His (Fig. 32 C). Posteriormente, la proteína rEhRAD51 desnaturalizada se usó como antígeno en el protocolo de inmunización llevado a cabo en conejo con el objetivo de obtener anticuerpos policlonales específicos.

La purificación bajo condiciones nativas permitió obtener fracciones de elución enriquecidas en rEhRAD51 funcional, que fueron usadas para los ensayos de unión al DNA y de apareamiento entre cadenas de DNA homólogas *in vitro*.



B



C

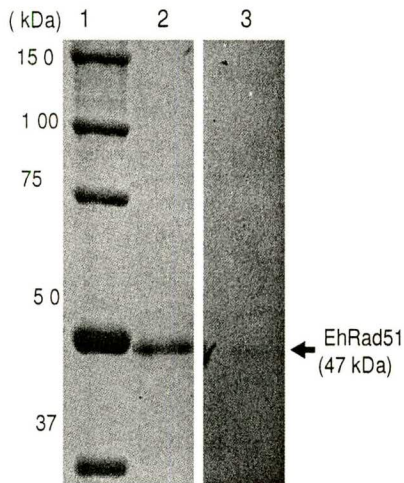


Figura 32. Purificación de la proteína rEhRAD51.

A. Gel de SDS poliacrilamida al 10 % teñido con azul de Coomassie:

carril 1, marcadores de peso molecular;

carril 2, extractos de bacterias no inducidas;

carril 3, extractos de bacterias inducidas con IPTG O/N;

carril 4, lavado;

carriles del 5 al 7, fracciones de elución de la proteína rEhRAD51.

B. Gel preparativo de SDS y poliacrilamida al 10 % mostrando la banda de 47 kDa correspondiente a la proteína rEhRAD51.

C. Comprobación de la identidad de la proteína purificada. Electroforesis en gel de poliacrilamida de la proteína purificada:

carril 1, marcadores de peso molecular;

carril 2, proteína purificada;

carril 3, Ensayo de Westen Blot para la proteína purificada EhRAD51 de 47 kDa usando el anticuerpo anti-6His.

11. Inmunodetección de la proteína endógena EhRAD51

Para evaluar la expresión de la proteína EhRAD51 endógena fueron realizados ensayos de Western Blot, usando los anticuerpos policlonales anti-rEHRAD51 y extractos enriquecidos con proteínas citoplásmicas y nucleares de trofozoítos no irradiados e irradiados con luz UV-C. Fueron detectados niveles muy bajos de expresión de la proteína EhRAD51 en la fracción citoplásmica de los trofozoítos no irradiados (Fig. 33, panel superior, carril 1), y no se observó señal en los extractos nucleares preparados con trofozoítos preparados bajo esta misma condición (Fig. 33, panel superior, carril 2). Por otra parte, los anticuerpos detectaron a la proteína esperada de 41 kDa en los extractos citoplásmicos obtenidos 30 min después del daño genotóxico, pero sorpresivamente, esta misma proteína no se detecta en los extractos nucleares de estos trofozoítos (Fig. 33, panel superior, carriles 3 y 4). Además, interesantemente, los anticuerpos reconocieron, tanto en la fracción citoplásmica como en la nuclear de trofozoítos irradiados, una proteína de 46 kDa que podría corresponder a la EhRAD51 de 41 kDa modificada postraduccionalmente. Como control de la integridad de los extractos proteicos se realizaron ensayos utilizando anticuerpos anti-EhPAP. Por otro lado, como control del fraccionamiento celular se emplearon anticuerpos anti-actina (Fig. 33, paneles intermedio e inferior). Estos hallazgos muestran que la proteína EhRAD51 se indujo tanto en citoplasma como en núcleo en respuesta al daño genotóxico inducido por la radiación UV-C.

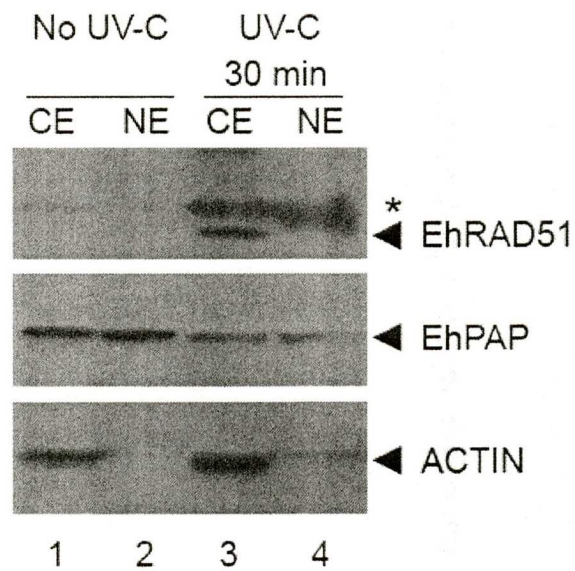


Figura 33. Inmunodetección de la proteína endógena EhRAD51 por Western Blot usando los anticuerpos policlonales anti-EhRAD51.

CE, extractos citoplásmicos; **NE**, extractos nucleares.

Carriles 1 y 2, trofozoítos no irradiados, carriles 3 y 4, trofozoítos irradiados y cosechados 30 min después del tratamiento con luz UV-C.

En el panel superior se presenta la inmunodetección usando el anticuerpo anti-EhRAD51 donde la cabeza de flecha indica la presencia de la proteína de 41 kDa y el asterisco la de la proteína de 46 kDa. En los paneles intermedio e inferior se muestra los controles respectivos usando anticuerpos anti-EhPAP y anti-actina.

12. Inmunolocalización de la proteína EhRAD51

Con el objetivo de ahondar más acerca de la expresión y la función de la proteína EhRAD51, se investigó su localización subcelular mediante ensayos de inmunofluorescencia, usando Microscopía confocal láser. La figura 34 resume los hallazgos encontrados. En concordancia con los ensayos de Western Blot previamente descritos, EhRAD51 se detectó a muy bajos niveles en el citosol de los trofozoítos no irradiados (Fig.34, A-D), mientras que 30 min después del daño genotóxico se hizo evidente una acumulación dramática de dicha proteína en este compartimiento. Interesantemente, también se observó una distribución dispersa de EhRAD51 en el núcleo, formando las típicas estructuras conocidas como *foci* donde se superpone la señal del canal verde (FITC) con el canal rojo (PI), que se visualizan como puntos amarillos (Fig 34, E-H). Tres h después, la señal citoplásmica disminuyó; sin embargo las estructuras nucleares tipo *foci* aparecen incrementadas (Fig. 34, I-L). Por el contrario, a las 12 h, tanto la señal de la detección de EhRAD51 en el núcleo como en el citosol fueron muy débiles, siendo los *foci* realmente escasos (Fig. 34, M-P). Se realizó la cuantificación de los *foci* para cada condición evaluada mediante análisis estadístico y se encontró que alrededor del 60 % de las células contenía al menos un focus a los 30 min después del daño genotóxico y que este porcentaje se redujo a la mitad a las 3 h, hasta hacerse ínfimo a las 12 h (Fig. 35).

Estos resultados confirman que la proteína EhRAD51 se sobreexpresa luego de inducir daño genotóxico al DNA por irradiación con luz UV-C y sugieren que ésta se redistribuye al núcleo durante las 3 primeras h luego del tratamiento.

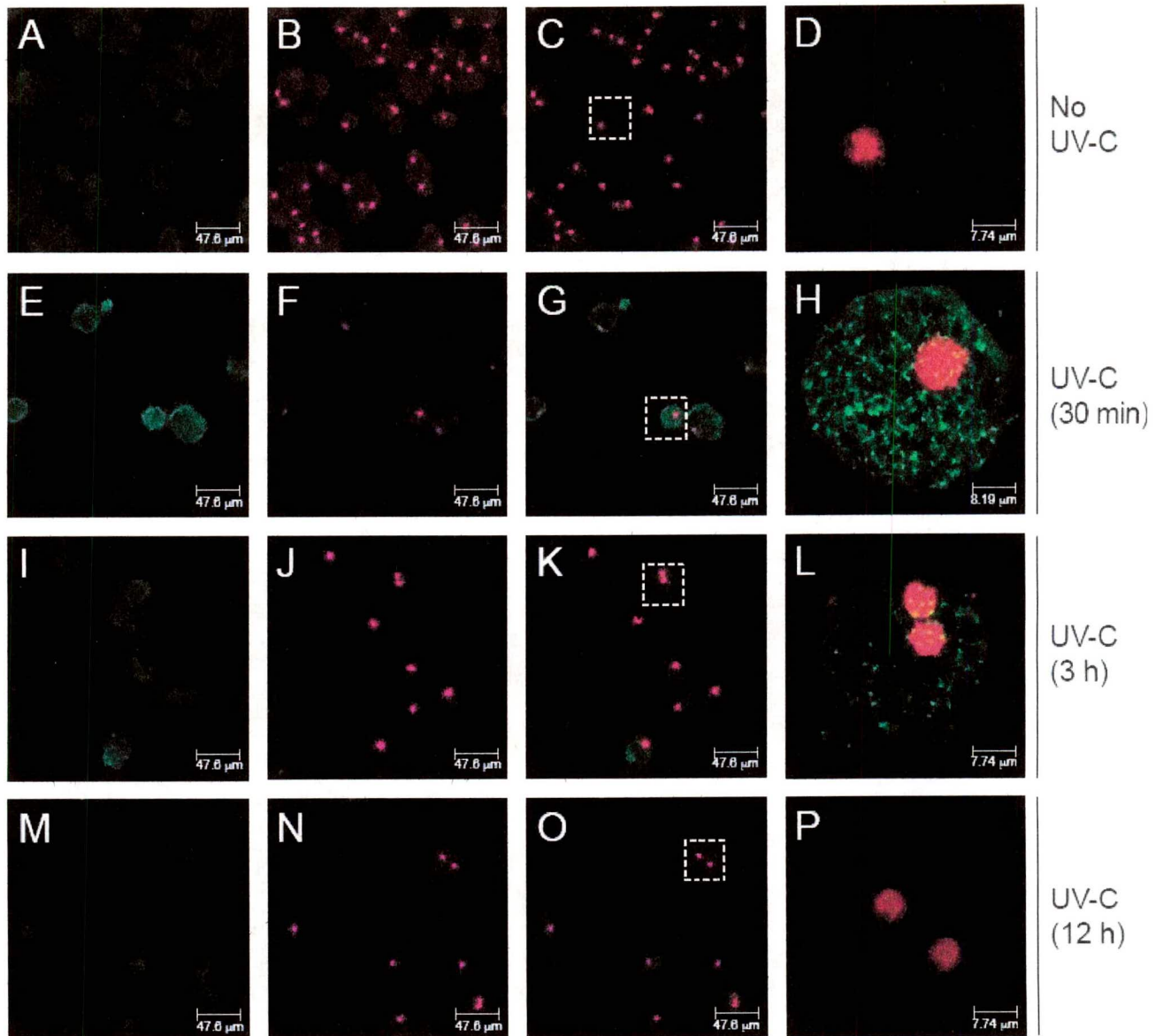


Figura 34. Localización subcelular de EhRAD51 en trofozoítos no irradiados (No UV-C) e irradiados (UV-C) luego de 30 min, 3 y 12 h del tratamiento. Las células fueron incubadas con el anticuerpo anti-rEhRAD51, tratadas con un anticuerpo secundario acoplado a FITC y el DNA fue contrastado con PI. **A, E, I y M,** canal verde (FITC); **B, F, J y N,** canal rojo (PI); **C, G, K y O,** imágenes superpuestas de ambos canales; **D, H, L y P,** magnificaciones de la célula enmarcada en los recuadros blancos que aparecen en los paneles **C, G, K y O.**

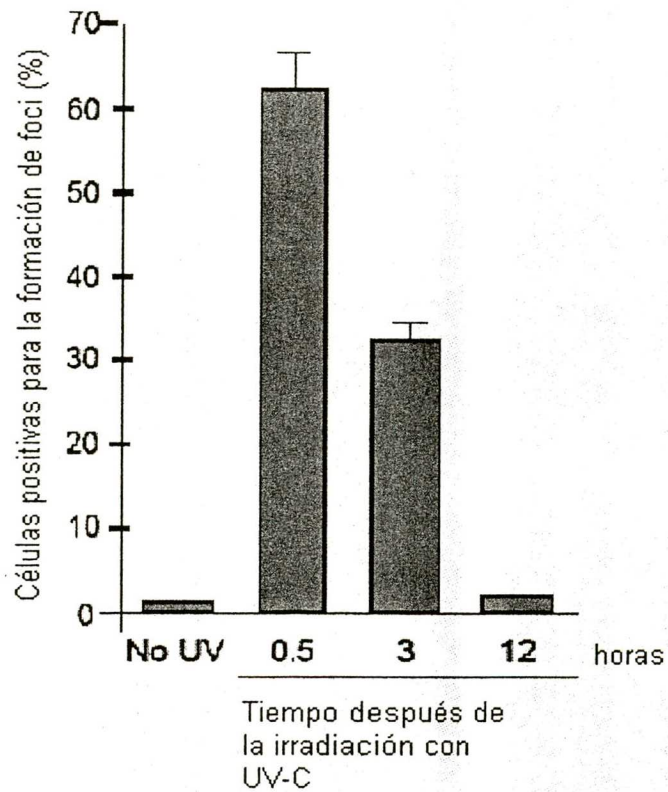


Figura 35. Porcentaje de células positivas para *foci* de EhRAD51 en trofozoítos no irradiados (No UV) e irradiados (UV-C) luego de 30 min, 3 y 12 h del tratamiento.

El porcentaje de los trofozoítos positivos para la presencia de, al menos un *foci*, fue calculado tomando en cuenta 50 células para cada condición y los datos representan la media de tres experimentos diferentes.

13. Evaluación de la actividad de unión al DNA de la proteína rEhRAD51

El análisis *in silico* de la secuencia aminoacídica de EhRAD51 puso en evidencia la presencia de dos dominios putativos de unión al DNA. Para verificar que EhRAD51 es una proteína capaz de unir al DNA, fueron realizados ensayos de unión al DNA usando cantidades crecientes de la proteína rEhRAD51 parcialmente purificada bajo condiciones nativas y una concentración fija de un fragmento de DNA de cadena sencilla (50 pb ssDNA) o de un fragmento de DNA de doble cadena (270 pb dsDNA); ambos sustratos fueron previamente marcados con radioactividad. Para descartar que las proteínas contaminantes de *E. coli*, presentes en la fracción semipurificada de EhRAD51, estén interactuando con las sondas de DNA, se diseñó un ensayo control que consistió en reproducir el experimento utilizando la fracción de elución correspondiente a una purificación simulada de la proteína recombinante, a partir de extractos proteicos de bacterias *E. coli* no transformadas. Los resultados obtenidos muestran que la incubación de rEhRAD51 con ambas sondas de DNA indujo la formación de cinco complejos DNA-proteína (C_1 - C_5). Esto sugiere que coexisten poblaciones alternativas de protómeros de EhRAD51 asociados a las sondas de DNA (Fig. 36 A y B, carriles del 2 al 4). El complejo ssDNA-proteína de mayor migración C_1 , que también se formó en el ensayo control respectivo, fue considerado inespecífico y, por consiguiente, fue descartado (Fig. 36 A, carriles 5 y 6). Por otro lado, no se observó la formación de ningún complejo en el ensayo control para la sonda de doble cadena (Fig. 36 B, carriles del 5 al 7).

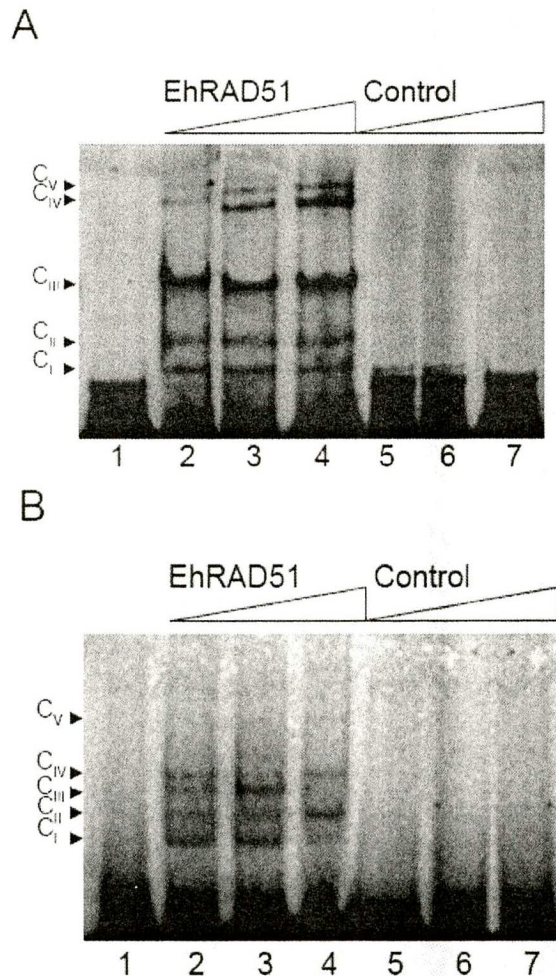


Figura 36. Ensayos de unión al DNA *in vitro* para la proteína rEhRAD51.

A. Formación de complejos DNA-proteína con la sonda de cadena sencilla 50 pb ssDNA. Carril 1, sonda libre, carriles del 2 al 4, cantidades crecientes de rEhRAD51 (2.5, 5 y 7.5 µg, respectivamente); carriles del 5 al 7, sonda de cadena sencilla incubada con cantidades equivalentes de proteínas eluídas durante la purificación simulada en bacterias *E. coli* no transformadas.

B. Formación de complejos DNA-proteína con la sonda de cadena doble 270 pb dsDNA. Carril 1, sonda libre, carriles del 2 al 4, cantidades crecientes de rEhRAD51 (2.5, 5 y 7.5 µg, respectivamente); carriles del 5 al 7, sonda de cadena doble incubada con cantidades equivalentes de proteínas eluídas durante la purificación simulada en bacterias *E. coli* no transformadas. Los complejos DNA-proteína formados son señalados con cabezas de flecha (C_I to C_v).

De manera particular, la abundancia de los complejos DNA-proteína de baja migración se vio incrementada en presencia de las cantidades más elevadas de la proteína rEhRAD51 (Fig. 36 A y B, carriles del 2 al 4).

Estos resultados demuestran que la proteína rEhRAD51 es capaz de unir, eficientemente, tanto DNA de cadena sencilla como de doble cadena *in vitro*.

14. Evaluación de la actividad de apareamiento entre cadenas de DNA homólogas para la proteína rEhRAD51

Con el objetivo de evaluar la función de apareamiento entre cadenas de DNA homólogas catalizada por la proteína rEhRAD51 se realizó el ensayo de D-loop descrito en la Estrategia Experimental. Los resultados revelan que rEhRAD51 fue capaz de retardar la movilidad electroforética de la sonda de cadena sencilla marcada radiactivamente, incubada con el plásmido de doble cadena circular (Fig. 37 A, carriles del 2 al 4). Esto indica que dicha proteína es capaz de catalizar la transferencia entre una cadena sencilla ssDNA y su homólogo de doble cadena formando una estructura híbrida característica conocida como D-loop, la cual tiene una movilidad electroforética reducida. Como era de esperar, la estructura D-loop no se observó en ausencia de la proteína rEhRAD51 (Fig. 37 A, carril 1). La especificidad del D-loop se confirmó con dos ensayos control; el primero incubando la proteína y la sonda marcada ssDNA en ausencia del plásmido dsDNA homólogo (Fig. 37 A, carril 5) y el segundo sustituyendo el plásmido homólogo por uno heterólogo no relacionado, en ambos ensayos no se observó señal alguna correspondiente a la formación del D-loop (Fig. 37 A, carril 6). Por otro lado, la formación de la estructura D-loop se vio

favorecida a mayores cantidades de rEhRAD51. El análisis densitométrico de estos productos radioactivos evidenció que la estructura D-loop formada cuando se utilizó 7.5 μg de rEhRAD51 fue 3.6 veces y 1.7 veces más abundante respecto a cuando se incubó con 2.5 μg y 5 μg de la misma proteína (Fig. 37 B). Estos datos demuestran que la proteína EhRAD51 es capaz de catalizar el apareamiento e intercambio entre cadenas de DNA homólogas *in vitro*, reacción fundamental para llevar a cabo la reparación del DNA por recombinación homóloga.

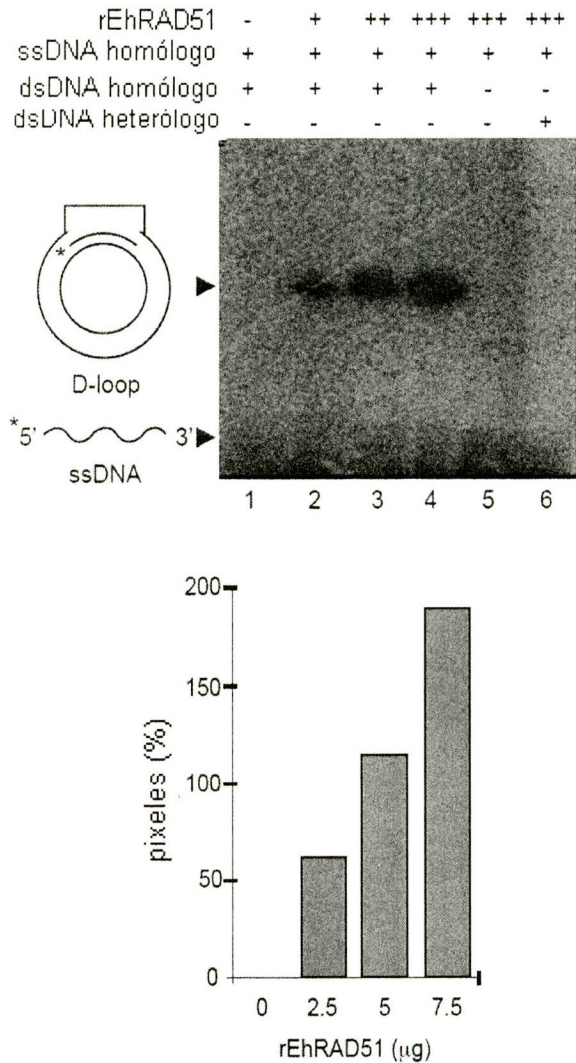


Figura 37. Ensayo de formación del D-loop catalizado por la proteína rEhRAD51.

A. Reacciones conteniendo el oligonucleótido de cadena sencilla marcado radiactivamente, un plásmido homólogo circular dsDNA y 0, 2.5, 5 y 7.5 μg de la proteína rEhRAD51 (carriles del 1 al 4). Los controles negativos fueron realizados en ausencia del plásmido homólogo dsDNA (carril 5) y con un plásmido heterólogo no relacionado (carril 6), ambos usando 7.5 μg de EhRAD51.

B. Análisis densitométrico de los productos D-loop obtenidos.

V. DISCUSIÓN

La unión de extremos no homólogos, también conocida como recombinación no homóloga, constituye el mecanismo principal para reparar las rupturas de la doble cadena del DNA en eucariontes superiores. Sin embargo en eucariontes inferiores, la recombinación homóloga predomina como evento subsanador de este tipo de lesiones (Bhattacharyya y cols., 2004). La gran cantidad de DNA repetitivo presente en los parásitos protozoarios, como lo es *E. histolytica*, sugiere que el genoma de estos organismos es potencialmente recombinogénico. El estudio de los procesos relacionados con la recombinación homóloga en *E. histolytica* debe contribuir a profundizar en el conocimiento de la genética de los trofozoítos, así como de los procesos de variabilidad de la virulencia ligados a los mecanismos de reparación del DNA.

Aquí se desarrolló un modelo de irradiación con luz UV-C a 254 nm, que induce daño al DNA en los trofozoítos de *E. histolytica* y activa las rutas de reparación del DNA. La dosis de irradiación usada (150 J/m²) así como el tiempo (8 seg) fueron determinados como condiciones no letales para las células. La irradiación con luz UV ha sido usada exitosamente como inductor de DSBs en otros organismos, como levadura (Birrell y cols., 2002), ratón (Garinis y cols., 2005), protozoo (Campbell y Romero, 1998) y bacterias (McCready, 2005). Asimismo, diversos estudios demuestran que la irradiación con luz ultravioleta induce directamente la formación de dímeros de pirimidina, los cuales son la principal fuente de DSBs inducidas por este tipo de tratamiento. Estos dímeros de ciclobutano pueden ser reparados por el mecanismo de reparación por escisión de nucleótidos (NER) en el

humano, mientras que las DSBs son eliminadas por recombinación homóloga en eucariontes inferiores (Bhattacharyya y cols, 2004).

Previo a este estudio ya se había reportado que *E. histolytica* posee dos genes *Ehh2ax* homólogos al gen *h2ax* de humano (Sullivan, Jr. y cols., 2006). Los genes *Ehh2ax* parecen haber reemplazado a aquel que codifica para la proteína canónica H2A descrita en otros organismos. El mismo fenómeno ocurre para las histonas de *Giardia lamblia* y *T. vaginalis*, lo cual sugiere que este es un evento común en protozoarios. El motivo SQ, fosforilable luego de que se produce una DSB, es totalmente exclusivo de las histonas H2AX; de hecho su presencia las distingue de las H2A, H2B, H1, H3 y H4.

Nuestros hallazgos evidencian la fosforilación temprana de la histona H2AX de *E. histolytica* luego de la irradiación con luz UV-C. Estos resultados son congruentes con la generación de las DSBs en el DNA y sugieren que tanto el remodelaje de la cromatina, como el reclutamiento de las enzimas modificadoras de las histonas, podrían ocurrir en este parásito tal y como se ha observado en otros sistemas eucariontes (Chen y cols., 2000). Asimismo, el hecho de que la sobrevivencia de los trofozoítos de *E. histolytica* no haya sido afectada con el tratamiento genotóxico, indica la existencia y activación de mecanismos de restauración de la integridad del DNA. Para apoyar nuestros datos, la presencia de las DSBs fue evaluada a través del ensayo Cometa o electroforesis en una célula única en su versión neutra. Esta metodología es ampliamente usada para medir el daño al DNA y la reparación del mismo.

Mediante una búsqueda en el banco de datos del genoma de *E. histolytica*, se encontró que este patógeno contiene genes que codifican para los

miembros putativos del grupo de epistasis *Ehrad52*. Dado al lugar que ocupa este protista en la escala filogenética eucarionte, el grupo de epistasis EhRAD52 posee elevada similitud con proteínas homólogas de diferentes organismos, como plantas, mamíferos y otros parásitos protozoarios.

Fueron hallados dos genes homólogos para *Ehrad52*, cuyos productos fueron identificados como EhRAD52 y EhRAD59 (también llamado EhRAD52/22 en la base de datos Pathema como se indica en la Tabla 4). Tal y como ocurre en levadura, la proteína EhRAD59 es homóloga al C-terminal de EhRAD52.

Los ensayos de RT-PCR semicuantitativos fueron estandarizados con el objetivo de detectar cambios significativos en los niveles de expresión de los RNAm para cada gen evaluado antes y a diferentes tiempos después del tratamiento genotóxico. Nuestros resultados fueron reproducibles y nos permitieron evaluar el perfil transcripcional del grupo de epistasis *Ehrad52*, en respuesta al daño al DNA en *E. histolytica*. Estos datos evidenciaron una expresión diferencial de los genes del grupo de epistasis *rad52* antes y después de la inducción de DSBs en el genoma de este protozoario. Algunos genes (*Ehnbs1*, *Ehrad54* y *Ehrad59*) fueron regulados negativamente luego del daño genotóxico, otros (*Ehmre11*, *Ehrad51*, *Ehrad51-C* y *Ehrad52*), por el contrario, fueron regulados de manera positiva a diferentes tiempos después de la irradiación con luz UV-C. Distintivamente, los niveles de mensajero para *Ehrad50* fluctuaron de manera variante, sugiriendo una respuesta transcripcional compleja. Por otra parte, el gen *Ehrad54b* no parece transcribirse bajo nuestras condiciones experimentales. Tanto en humano como en levadura, RAD54 y RAD54B son helicasas que participan

en la formación del DNA heterodúplex en el proceso de recombinación (Symington, 2002). Tal vez, la expresión del homólogo *Ehrad54* sea suficiente para cubrir esta función en los trofozoítos, empero, se requiere evaluar con mayor profundidad cómo el grupo de epistasis *Ehrad52* se expresa y regula en respuesta a daño al DNA, para comprender estos eventos en *E. histolytica*.

Las aparentes discrepancias en nuestros hallazgos sugieren que las enzimas necesarias para reparar este tipo de lesiones en el DNA vía recombinación homóloga en *E. histolytica* se encuentran en cantidades suficientes en las células y que su regulación pudiera estar ocurriendo a nivel post-traducciona. Pareciese que la naturaleza y dinámica del panorama de la reparación de las lesiones producidas por agentes genotóxicos pueden ser difícilmente inferidas mediante el análisis del perfil de expresión transcripcional. De hecho, estudios similares a los nuestros han reportado y demostrado que no existe una relación ni una coordinación entre la expresión de aquellos genes que se transcriben significativamente después de diferentes tratamientos con agentes que dañan al DNA (radiación ionizante, luz ultravioleta, cisplatina y H₂O₂) y los genes involucrados en proteger a las células de la citotoxicidad causada por estos mismos agentes (Chen y cols., 2000; Garinis y cols., 2005).

Ha sido ampliamente demostrado que las proteínas RAD51 son enzimas clave en la reparación del DNA por recombinación homóloga tanto en eucariontes inferiores como superiores (Chen y cols., 2000; Garinis y cols., 2005; Thacker, 2005). Es por ello que nos enfocamos en el estudio y

caracterización del gen *Ehrad51* y su respectiva proteína RAD51 en *E. histolytica*.

A pesar de que los cultivos axénicos de *E. histolytica* son considerados como poblaciones heterogéneas de células poliploides multinucleadas, varios estudios han demostrado la presencia de células en fase G1, S, G2 y M en los trofozoítos de diferentes clonas. En este trabajo, se usó células de la clona L6 sincronizadas con colchicina en las diferentes fases del ciclo celular y se mostró que la expresión del mensajero de *Ehrad51* está regulada en el ciclo celular, siendo los niveles de transcritos elevados durante la fase S. Tomando en consideración que durante la replicación del DNA se pueden producir DSBs de manera espontánea, es posible que la proteína EhRAD51 pueda estar involucrada en la reparación de este tipo de lesiones durante la síntesis del DNA, cuando una cromátida hermana se encuentra disponible como templado donador de la información. No obstante, el papel preciso de EhRAD51 durante la replicación en la fase S debe ser investigado más a fondo.

Por otro lado, en condiciones de daño, los ensayos de RT-PCR, interesantemente, mostraron que los niveles del mensajero de *Ehrad51* fueron muy bajos en condiciones basales o No UV-C, mientras que 30 min después del daño genotóxico fueron 15 veces más elevados y luego disminuyeron a las 3 y 12 h, sugiriendo que la proteína EhRAD51 pudiera estar participando en las etapas tempranas de la reparación del DNA por recombinación homóloga. Una activación transcripcional similar ha sido reportada como característica común para los homólogos *recA/rad51* de *Tetrahymena thermophila* y *Halobacterium sp.* (Campbell y Romero, 1998;

McCready, 2005). En correspondencia con estos resultados, los ensayos de Western blot mostraron un incremento drástico en los niveles de la proteína EhRAD51 tanto en el citoplasma como en el núcleo de los trofozoítos irradiados y cosechados 30 min después de que las rupturas al DNA fueran generadas dentro del genoma de *E. histolytica*. La especificidad de los anticuerpos policlonales generados en conejo fue demostrada oportunamente, con el objetivo de descartar que éstos presentaran reacción cruzada con proteínas inespecíficas. En consecuencia, el hecho que dichos anticuerpos reconocieran a la proteína de 46 kDa nos permite sugerir que ésta se trate de una EhRAD51 modificada y especular que alguna regulación postraducciona l de la enzima citoplásmica pudiera ser necesaria para su translocación al núcleo, donde efectivamente se lleva a cabo la reparación del DNA. Además, tomando en consideración que la secuencia de EhRAD51 carece de una señal consenso de localización nuclear, otra posibilidad pudiera ser que EhRAD51 requiera asociarse o interactuar con otra u otras proteínas para ser transportada al interior del núcleo. Sin embargo, se requiere del diseño y desarrollo de ensayos adicionales para corroborar estas hipótesis.

Por medio de Microscopía confocal láser, fueron observados sitios puntuales de localización de la proteína EhRAD51, dispersos en el núcleo de los trofozoítos irradiados y cosechados después de los 30 min y 3 h. La presencia de estas estructuras tipo *foci* correlaciona con el grado de fragmentación del DNA observado por inmunomarcaje de los sitios de incorporación para el BrdUTP en el ensayo de TUNEL y concuerda, además, con el patrón de corrida del DNA observado en la electroforesis en célula

única o COMETA. Además, como el tratamiento con luz UV-C realmente no afectó la viabilidad de los trofozoítos, resulta tentador sugerir que, probablemente, fueron activados mecanismos de reparación del DNA para restaurar la integridad del genoma tras el estímulo genotóxico.

El análisis *in silico* de la secuencia de la proteína EhRAD51 predijo que ésta posee todos los motivos estructurales y funcionales que son importantes para la actividad recombinasa. Con vistas a demostrar experimentalmente su función, se llevó a cabo la caracterización básica de EhRAD51 *in vitro*. Las propiedades funcionales de EhRAD51 fueron similares a las previamente reportadas para otras proteínas RAD51 homólogas (Haaf y cols., 1995, Kant y cols., 2005, Tomblin y cols., 2002). EhRAD51 fue capaz de unir los sustratos ssDNA y dsDNA en presencia de ATP y Mg^{2+} . La aparición de varios complejos rEhRAD51-DNA podría deberse a diferente número de moléculas de rEhRAD51 unidas a las sondas ssDNA o dsDNA. Por último, rEhRAD51 promovió el apareamiento específico entre cadenas de DNA homólogas formando la estructura D-loop, lo cual demuestra que tiene actividad recombinasa.

Basándonos en el análisis integral de los resultados obtenidos, se propone un modelo de trabajo para la reparación de DSBs dependiente de la recombinasa EhRAD51 (Fig. 38). Cuando una DSB se genera en el genoma de *E. histolytica*, la(s) histona(s) EhH2AX son fosforiladas, lo cual podría inducir remodelación de la cromatina y acumulación de las proteínas del grupo de epistasia EhRAD52 en los sitios de daño. Nosotros observamos la relocalización de EhRAD51 en los *foci* de reparación nucleares, donde probablemente estén mediando el apareamiento e intercambio entre

cadena de DNA homóloga, necesarios para restaurar la integridad del genoma.

Como se señalaba en la introducción de este trabajo, es factible que la proteína RAD51 de *E. histolytica* y el mecanismo de reparación del DNA por recombinación homóloga jueguen un papel crucial en los rearrreglos que ocurren de manera natural a nivel de genoma. Inclusive, resultaría ciertamente atrayente evaluar la contribución de estos procesos en los frecuentes cambios de ploidía y en los eventos de amplificación génica no programada y duplicación de genes, observados en *E. histolytica* (Zaki y Clark, 2000; Baez-Camargo y cols., 1996). Nuestro siguiente reto vislumbrará el estudio y análisis de la recombinación homóloga *in vivo* en *E. histolytica* y el papel potencial de la recombinasa EhRAD51 en la dinámica de este parásito.

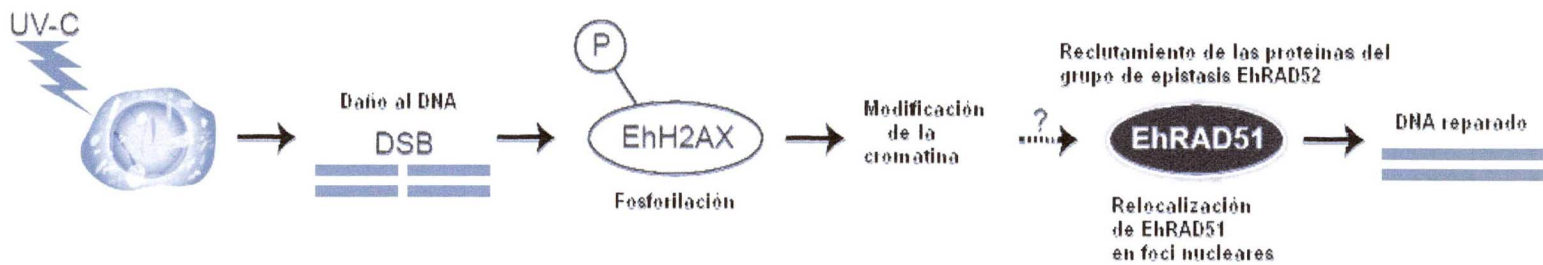


Figura 38. Modelo hipotético para el mecanismo de reparación de DSBs en *E. histolytica*.

Cuando una DSB es introducida en el genoma de *E. histolytica* por acción de la irradiación con luz UV-C, EhH2AX es fosforilada. Esta señal probablemente induce remodelación de la cromatina y permite el reclutamiento de las proteínas del grupo de epistasias EhRAD52 a los sitios de daño. Notablemente la recombinasa EhRAD51 se relocaliza en los núcleos formando *foci* de reparación que le permitan mediar el apareamiento e intercambio entre cadenas de DNA homólogas con vistas a restaurar la integridad del genoma.

VI. CONCLUSIONES

El genoma de *E. histolytica* contiene la mayoría de los genes relacionados al grupo de epistasis *rad52*, los cuales se expresan de manera diferencial cuando se generan rupturas de doble cadena en el DNA de los trofozoítos irradiados con luz UV-C.

En respuesta a dicho daño, se induce la expresión del gen *Ehrad51* y de la proteína EhRAD51, la cual se relocaliza en estructuras nucleares tipo *foci* de reparación.

La expresión del mensajero del gen *Ehrad51* se regula durante la progresión del ciclo celular, siendo los niveles de transcritos particularmente elevados durante la fase S.

Los ensayos funcionales realizados con la proteína rEhRAD51 demuestran que ésta posee actividad recombinasa *in vitro*.

VII. APÉNDICE

1. Soluciones

Acrilamida 30% (1 litro)	290 g Acrilamida 10 g Bis-acrilamida Disolver en 60 ml de H ₂ O a 37°C, aforar, filtrar y guardar en frasco ambar a 4°C.
Azul de Coomassie (100 ml)	0.29 g Azul de Coomassie Disolver con agitación en 90 ml de solución v:v Metanol: H ₂ O y añadir 10 ml de ácido acético glacial Filtrar con papel Whatman
Buffer de corrida para proteínas en condiciones desnaturalizantes 1X (1 litro)	100 ml Tris-glicina 10X 10 ml SDS 10% Aforar con H ₂ O
Buffer de muestra 2X para proteínas (10 ml)	2.5 ml Tris-HCl 100 mM pH 6.8 4 ml SDS 10 % 2 ml Glicerol 200 µl DTT 1 M 0.1 mg Azul de bromofenol Disolver agitando en 10 ml de H ₂ O, alícuotar y guardar a TA
Buffer de muestra 6X para DNA	0.25 % Bromofenol azul 0.25 % Xylene cyanol FF 15% Ficoll 400
Buffer de transferencia 1X para proteínas (1 litro)	100 ml Tris-glicina 10X 200 ml Metanol Aforar con ddH ₂ O
CaCl ₂ 1M (1 litro)	147 g CaCl ₂ Disolver y guardar a TA
DTT 1M (100 ml)	15.45 g DTT Aforar con ddH ₂ O, alícuotar y guardar a - 20°C
EDTA 0.5M a pH 8 (100 ml)	18.612 g EDTA Disolver en H ₂ O, aforar, ajustar pH con

APÉNDICE SOLUCIONES

López-Casamichana M.

Posgrado en Ciencias Genómicas-UACM

	NaOH 10M, guardar a TA
EGTA 100 mM (50 ml)	0.1926 g EGTA Disolver en H ₂ O
Hepes 1M a pH 7.9 (50 ml)	11.915 g Hepes Disolver en H ₂ O, ajustar pH
Medio de cultivo TYI-S 33 (1 litro)	30 g Biosate 9 g Glucosa 2 g NaCl 0.6 g KH ₂ PO ₄ 1.63 g K ₂ HPO ₄ 3H ₂ O 1.25 g L-cisteína 0.25 g Ácido ascórbico Aforar a 870 ml y ajustar el pH a 6.8. Completar el medio con 2% de suero bovino con y una mezcla de antibióticos (1.2 U/ml de penicilina y 1.4 µg/ml de estreptomicina)
Medio de cultivo LB (1 litro)	10 g Triptona 5g extracto de levadura 10g NaCl Disolver en H ₂ O, ajustar pH a 7.5 con NaOH , esterilizar por autoclave, guardar a 4°C
NaCl 4 M (50 ml)	11.688 g NaCl Disolver en H ₂ O
PBS 1X a pH 7.4(1 litro)	8 g NaCl 0.2 g KCl O ₄ 1.44 gNa ₂ HP 0.254 g KH ₂ PO ₄ Disolver y aforar con ddH ₂ O, ajustar pH con HCl, esterilizar por autoclave, guardar a 4°C
PBS-Tween	100 ml PBS 1X 50 µl Tween 20 Disolver con agitación suave
PSA 10% (10 ml)	1g PSA Disolver en 10 ml de H ₂ O, alicuotar en tubos eppendorf y guardar a -20°C
Reactivo de Bradford (500 ml)	50 mg Azul de Coomassie G-250

APÉNDICE SOLUCIONES*López-Casamichana M.**Posgrado en Ciencias Genómicas-UACM*

	25 ml Etanol 100% 50 ml Ácido fosfórico 85 % Disolver y aforar con ddH ₂ O, filtrar con papel Whatman y proteger de la luz.
Rojo de Ponceu 0.1%	Rojo de Ponceu 100 mg/ml
SDS 10% (1 litro)	100 g SDS Disolver en 900 ml de H ₂ O, calentar a 68°C, aforar, alicuotar y guardar a TA
Solución desteñidora (100 ml)	30 ml Etanol 10 ml Ácido acético Aforar con ddH ₂ O
SSC 20X a pH 7(1 litro)	NaCl 173 g Citrato de Na 88.22 g Mezclar, disolver en 800 ml de ddH ₂ O, ajustar pH con HCl, aforar y guardar a TA
TAE 50X (1 litro)	242 g Tris-Base 57.1 ml Ácido acético glacial 100 ml EDTA 0.5 M (pH 8) Mezclar, disolver en H ₂ O, aforar y guardar a TA
TBE 10X (1 litro)	108 g Tris-Base 55 g Ácido bórico 40 ml EDTA 0.5 M (pH 8) Mezclar, disolver en H ₂ O, aforar y guardar a TA
Tris-Glicina 10X (1 litro)	30 g Tris base 144 g Glicina Disolver y aforar con H ₂ O y guardar a TA

VII. APÉNDICE

2. Publicaciones

Este trabajo de doctorado arrojó dos publicaciones científicas que a continuación se anexan.

Research article

Open Access

Transcriptional profile of the homologous recombination machinery and characterization of the EhRAD51 recombinase in response to DNA damage in *Entamoeba histolytica*

Mavil López-Casamichana¹, Esther Orozco², Laurence A Marchat³ and César López-Camarillo*¹

Address: ¹Posgrado en Ciencias Genómicas, Universidad Autónoma de la Ciudad de México, México DF, México, ²Departamento de Patología Experimental, CINVESTAV-IPN, México DF, México and ³Programa Institucional de Biomedicina Molecular, ENMH-IPN, México DF, México

Email: Mavil López-Casamichana - gerry2410@yahoo.com; Esther Orozco - esther@cinvestav.mx; Laurence A Marchat - lmarchat@gmail.com; César López-Camarillo* - genomicas@yahoo.com.mx

* Corresponding author

Published: 10 April 2008

Received: 1 November 2007

BMC Molecular Biology 2008, 9:35 doi:10.1186/1471-2199-9-35

Accepted: 10 April 2008

This article is available from: <http://www.biomedcentral.com/1471-2199/9/35>

© 2008 López-Casamichana et al; licensee BioMed Central Ltd.

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/2.0>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Abstract

Background: In eukaryotic and prokaryotic cells, homologous recombination is an accurate mechanism to generate genetic diversity, and it is also used to repair DNA double strand-breaks. *RAD52* epistasis group genes involved in recombinational DNA repair, including *mre11*, *rad50*, *nsb1/xrs2*, *rad51*, *rad51c/rad57*, *rad51b/rad55*, *rad51d*, *xrcc2*, *xrcc3*, *rad52*, *rad54*, *rad54b/rdh54* and *rad59* genes, have been studied in human and yeast cells. Notably, the *RAD51* recombinase catalyses strand transfer between a broken DNA and its undamaged homologous strand, to allow damaged region repair. In protozoan parasites, homologous recombination generating antigenic variation and genomic rearrangements is responsible for virulence variation and drug resistance. However, in *Entamoeba histolytica* the protozoan parasite responsible for human amoebiasis, DNA repair and homologous recombination mechanisms are still unknown.

Results: In this paper, we initiated the study of the mechanism for DNA repair by homologous recombination in the primitive eukaryote *E. histolytica* using UV-C (150 J/m²) irradiated trophozoites. DNA double strand-breaks were evidenced in irradiated cells by TUNEL and comet assays and evaluation of the EhH2AX histone phosphorylation status. In *E. histolytica* genome, we identified genes homologous to yeast and human *RAD52* epistasis group genes involved in DNA double strand-breaks repair by homologous recombination. Interestingly, the *E. histolytica* *RAD52* epistasis group related genes were differentially expressed before and after UV-C treatment. Next, we focused on the characterization of the putative recombinase EhRAD51, which conserves the typical architecture of RECA/RAD51 proteins. Specific antibodies immunodetected EhRAD51 protein in both nuclear and cytoplasmic compartments. Moreover, after DNA damage, EhRAD51 was located as typical nuclear foci-like structures in *E. histolytica* trophozoites. Purified recombinant EhRAD51 exhibited DNA binding and pairing activities and exchanging reactions between homologous strands *in vitro*.

Conclusion: *E. histolytica* genome contains most of the *RAD52* epistasis group related genes, which were differentially expressed when DNA double strand-breaks were induced by UV-C irradiation. In response to DNA damage, EhRAD51 protein is overexpressed and relocalized in nuclear foci-like structures. Functional assays confirmed that EhRAD51 is a *bonafide* recombinase. These data provided the first insights about the potential roles of the *E. histolytica* *RAD52* epistasis group genes and EhRAD51 protein function in DNA damage response of this ancient eukaryotic parasite.

Background

Entamoeba histolytica, the protozoan causative of human amoebiasis, has a world-wide distribution with a higher prevalence in developing countries, affecting more than 50 million people each year [1]. Trophozoites show a dramatic virulence variability that could be related to great genome plasticity [2]. Frequent ploidy changes, unscheduled gene amplification and duplication have been reported [3,4], and it has been largely assumed that these processes are linked to genetic rearrangements, although no direct experimental evidence has been provided yet.

In eukaryotic and prokaryotic cells, homologous recombination (HR) is an accurate mechanism to generate genetic diversity. HR is also used by cells to properly repair the DNA double strand-breaks (DSBs). Generally, this kind of damage is produced by genotoxic agents or during cellular processes like meiotic division, telomere maintenance, and restoration of collapsed replication forks in the course of DNA synthesis [5-7]. Cellular response to DNA DSBs activates a complex network of proteins that transiently arrests cell cycle and enhances DNA repair mechanisms. Particularly, *Saccharomyces cerevisiae* H2A and *Homo sapiens* H2AX histones are rapidly phosphorylated in the chromatin micro-environment surrounding DNA DSBs, inducing nucleosome remodeling to promote accumulation of checkpoint and DNA repair proteins at these sites [8]. In case of extreme DNA damage, cells are targeted to apoptosis [9]. Additionally, HR is also a useful tool to analyze gene function by gene targeting and gene knock out approaches [10].

Molecular genetics of HR DNA repair has been well preserved throughout evolution. RAD52 epistasis group genes involved in DNA DSB repair, including *mre11*, *rad50*, *nsb1/xrs2*, *rad51*, *rad51c/rad57*, *rad51b/rad55*, *rad51d*, *xrcc2*, *xrcc3*, *rad52*, *rad54*, *rad54b/rdh54* and *rad59* genes, have been identified in human and yeast cells [11]. Pivotal protein in HR pathway is the RAD51 recombinase, which catalyses strand transfer between a broken DNA and its undamaged homologous strand, allowing damaged region to be repaired [12]. Strand exchange reaction is initiated by RAD51-coating of single-stranded DNA (ssDNA) released from DSBs, to generate a nucleoprotein filament. This active thread binds the intact double-stranded DNA (dsDNA) substrate, searching and locating homologous sequences, and promoting DNA strand exchange in an ATP-dependent manner, forming a heteroduplex structure called D-loop [13]. After DNA damage, RAD51 protein has been observed in nuclear complexes forming discrete foci, which are considered as the recombinational DNA repair sites [14].

HR remains the predominant mechanism to repair DSBs in lower eukaryotes [15]. RAD51 proteins have been iden-

tified in *Trypanosoma brucei* and *Plasmodium falciparum* parasites, which perform HR to switch the expression of genes encoding surface membrane glycoproteins and generate antigenic variation [16-18]. Furthermore, recombinational rearrangements are responsible for amplification of the multidrug resistance *pfmdr1* gene in *P. falciparum* [19], demonstrating the relevance of HR to generate genomic versatility and plasticity in protozoan parasites.

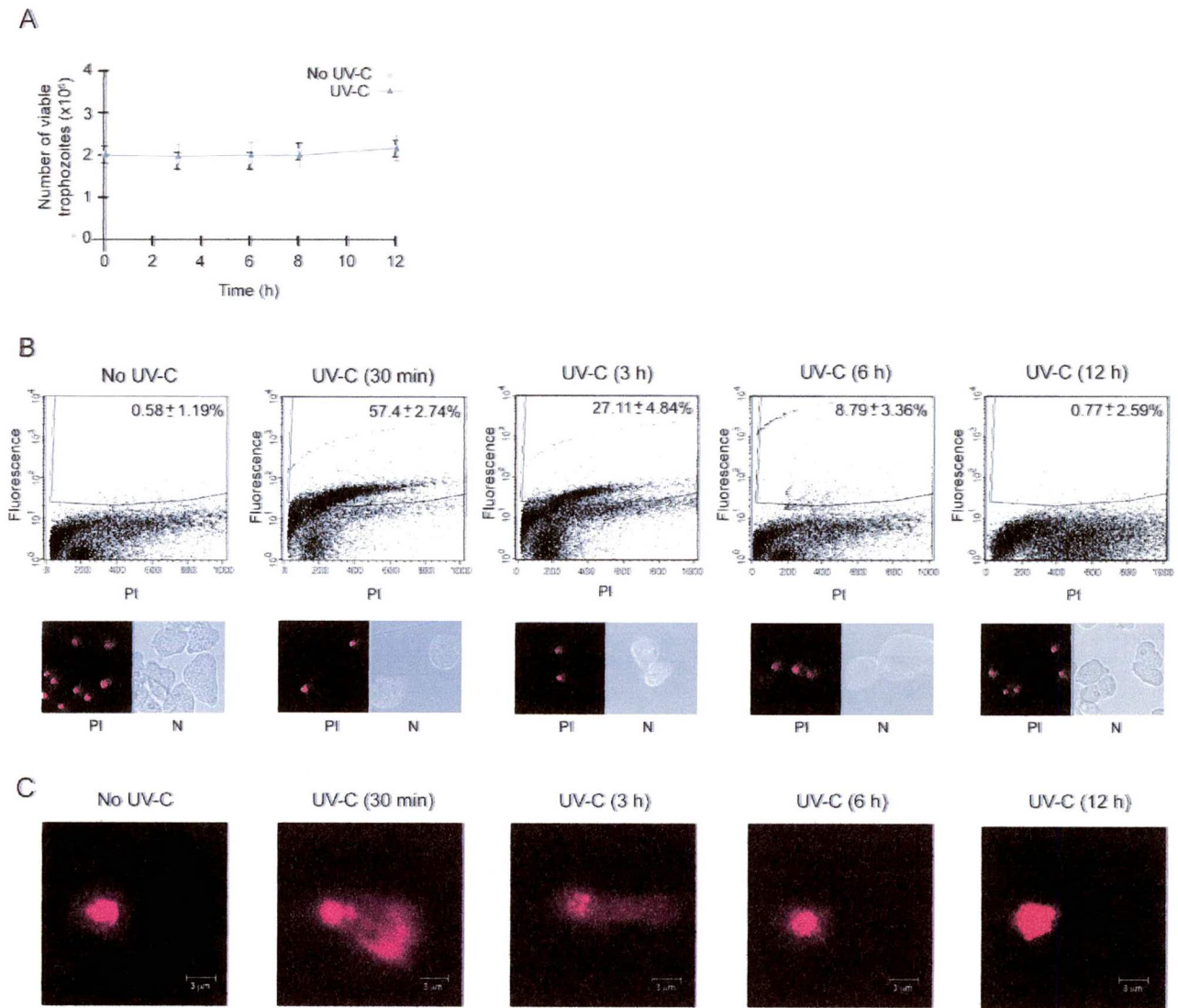
In this paper, we identified and analyzed the mRNA expression profile of *E. histolytica* RAD52 epistasis group related genes in response to DNA damage. Additionally, we presented experimental evidence of EhRAD51 function as a recombinase, which suggest its potential role in DNA damage response. These findings constitute the initial efforts to understand the DNA repair mechanism in *E. histolytica* that will contribute to the further elucidation of events regulating genome integrity and variability in this early-branch protozoan.

Results

High dose of UV-C light induces DNA fragmentation in trophozoites

It has been shown in a wide variety of cells that X-rays exposure, UV irradiation and chemicals activate cellular responses to DNA repair [20]. To initiate the study of the mechanisms involved in DNA repair in *E. histolytica*, we used UV-C light irradiation to induce DNA damage in trophozoites. Our experiments showed that during the first 12 h after irradiation with 254 nm UV-C (150 J/m²), cell survival was not significantly affected (Fig. 1A). Using the same experimental conditions, we analyzed the presence of 3'-hydroxyl DNA ends by TUNEL and FACS assays. In untreated trophozoites, FACS analysis evidenced the presence of <1% TUNEL positive cells; meanwhile, 30 min after treatment, 57.4 ± 2.74% of UV-C irradiated cells showed DNA fragmentation (Fig. 1B, upper panels). DNA damage reduction was observed at 3, 6 and 12 h after treatment (27.11 ± 4.84, 8.79 ± 3.36 and 0.77 ± 2.59%, respectively). Propidium iodide stained cells were checked under the fluorescence microscope to confirm the absence of cytoplasmic stain (Fig. 1B, lower panels).

The comet assay (single-cell gel electrophoresis) is widely used to measure DNA damage and repair. Results obtained through neutral comet assay (Fig. 1C) confirmed the induction of DSBs in trophozoites by UV-C treatment. Typical comet-like structures were observed at 30 min and 3 h, while a reduction of the DNA tails was observed at 6 h after UV-C treatment. As expected, 12 h after the genotoxic insult, DNA migration was similar to the control untreated cells (No UV-C). Taking altogether, these data indicated that UV-C irradiation efficiently induced DNA damage and consequently, repair mechanisms were activated to restore DNA integrity allowing cell survival.

**Figure 1**

Effect of UV-C irradiation on cell viability and DNA integrity of trophozoites. **A.** Growth curves of non-irradiated and irradiated trophozoites (150 J/m^2 of UV-C light for 8 s). **B.** TUNEL assay and flow cytometry (FACS) assays of non-irradiated (No UV-C) and irradiated (UV-C) trophozoites harvested at different times (30 min, 3, 6 and 12 h). Upper panels, histograms show the DNA fragmentation percentage in fluorescence positive cells. The abscissa indicates fluorescence of propidium iodide (PI), and the ordinate indicates fluorescence of Alexa 488-labeled 3' ends of DNA. The number inside each histogram denotes the percentage of fluorescence positive cells above the cut-off line. Lower panels, PI-staining cells were checked in the epifluorescence microscope to confirming the absence of cytoplasmic stain. PI, propidium iodide, N, Nomanski optics. **C.** Neutral comet assays of non-irradiated (No UV-C) and irradiated (UV-C) trophozoites harvested at different times (30 min, 3, 6 and 12 h). Electrophoretic migration of DNA was from left (anode) to right (cathode).

Early EhH2AX histone phosphorylation correlates with the presence of DNA DSBs

DNA DSBs induce early phosphorylation of yeast H2A (major H2A closer to mammalian H2AX) and human H2AX histones on a conserved serine residue located in

the SQ motif at C terminus, producing γ H2A and γ H2AX, respectively [21]. As in yeast, *E. histolytica* seems to have replaced the canonical H2A with H2AX [22]. Two genes (locus EHI_126210 and EHI_188960) that encode putative proteins with 55 and 57% identity (*e*-value $2e-27$ and

2e-28) to yeast H2A and human H2AX histones, respectively, were found in the *E. histolytica* genome. These genes predict two 17.6 kDa conserved paralogous H2AX proteins that share 93% identity. Notably, both contain the H2AX exclusive SQ motif with the potentially phosphorylatable serine residue (S156) (Fig. 2A).

Taking advantage of the high conservation between *H. sapiens* and *E. histolytica* H2AX C-terminus, we performed Western blot assays using the anti-human γ H2AX antibody to detect serine-phosphorylated EhH2AX homologues (γ EhH2AX) in cytoplasmic (CE) and nuclear (NE) extracts of trophozoites. Protein amount and integrity were confirmed on Coomassie blue stained-gels (data not shown). In NE from non-irradiated cells, we identified a 17-kDa weak band, which corresponds to the expected molecular weight of γ EhH2AX histones (Fig. 2B, lane 2). Interestingly, 10 min after UV-C irradiation, this band was five-fold more intense, suggesting an increase in the amount of nuclear γ EhH2AX, and 30 min after treatment no band was found (Fig. 2B, lanes 4 and 6). However, these assays did not allow us to distinguish whether one or both EhH2AX proteins were phosphorylated. In contrast, no signals were observed in CE (Fig. 2B, lanes 1, 3 and 5). We used as an integrity control an anti-EhPAP serum, which recognized the 63-kDa EhPAP protein [23] in non-irradiated and irradiated trophozoites (Fig. 2B,

middle panel). In addition, an anti-actin monoclonal antibody, used as control for cell fractionation, strongly detected the expected 42-kDa band in CE and a slight signal in NE, as expected for a major component of cytoskeleton (Fig. 2B, lower panel). These data showed that UV-C irradiation of trophozoites is a useful model to generate DNA DSBs and study DNA repair in *E. histolytica*.

E. histolytica genome contains RAD52 epistasis group related genes

In order to investigate the presence of RAD52 epistasis group related genes in *E. histolytica* genome, we surveyed the parasite Pathema database (Table 1). We found *Ehmre11*, *Ehrad50* and *Ehnbs1* genes, which could encode the *E. histolytica* putative MRE11-RAD50-NBS1 protein complex that functions as the primary sensor of DNA DSBs in other organisms [9]. Both *Ehmre11* and *Ehrad50* proteins exhibited 32 to 23% identities (*e*-values from 3e-49 to 9e-36) with *S. cerevisiae* and *H. sapiens* orthologous proteins, respectively; whereas the *Ehnbs1* sequence appears to be more divergent (17 to 24% identity and *e*-values from 0.003 to 0.002). *E. histolytica* also contains genes encoding the putative recombinase EhRAD51 and its paralogous protein EhRAD51C. EhRAD52, EhRAD54, EhRAD54B and EhRAD59 (EhRAD52/22 in Pathema database) predicted proteins are also encoded in the *E. histolytica* genome. As in yeast,

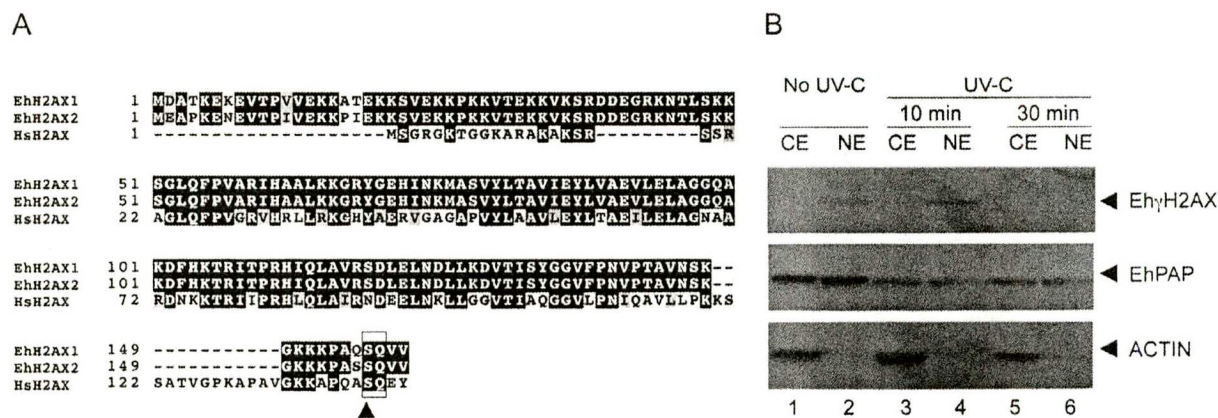


Figure 2 Identification and immunodetection of phosphorylated EhH2AX histones (γ EhH2AX). **A.** Multiple sequence alignments of *E. histolytica* and *H. sapiens* H2AX histones sequences. Black boxes, identical residues; grey boxes, conserved substitutions; open box, C-terminal SQ motif. Arrowhead denotes the potential phosphorylatable serine residue (S156). Numbers at left are relative to the position of the initial methionine in each protein. **B.** Immunodetection of phosphorylated γ EhH2AX polypeptides by Western blot assays using anti-human γ H2AX polyclonal antibody (upper panel). CE, cytoplasmic extracts; NE nuclear extracts. Lanes 1 and 2, non-irradiated (No UV.C) trophozoites; lanes 3 and 4, irradiated trophozoites (10 min after UV-C treatment); lanes 5 and 6, irradiated (UV-C) trophozoites (30 min after UV-C treatment). Controls using anti-EhPAP and anti-actin antibodies (middle and bottom panels, respectively) are shown.

Table 1: Comparison of *E. histolytica*, *H. sapiens* and *S. cerevisiae* RAD52 epistasis group proteins

<i>Entamoeba histolytica</i>			<i>Homo sapiens</i>					<i>Saccharomyces cerevisiae</i>							
Predicted protein	Size (aa)	GeneBank ID	Locus name ^a	Protein	Accession number ^b	Size (aa)	e-value	H (%)	I (%)	Protein	Accession number ^b	Size (aa)	e-value	H (%)	I (%)
EhMRE11	596	XM_651393	EHI_125910	MRE11	P49959	708	3e-49	51	32	MRE11	P32829	692	1e-33	45	26
EhMRE11-like	223	XM_644963	EHI_077650	MRE11	P49959	708	3e-23	51	25	MRE11	P32829	692	2e-20	49	27
EhRAD50	1241	XM_647783	EHI_079960	RAD50	Q92878	1312	2e-44	40	23	RAD50	P12753	1312	2e-43	46	27
EhNBS1	764	XM_647447	EHI_098770	NBS1	Q61Q31	754	0.0022	40	24	XRS2	P33301	854	e+3	28	17
EhRAD51	367	XM_648984	EHI_031220	RAD51	Q06609	339	e-125	83	71	RAD51	P25454	400	2e-43	78	60
EhRAD51C	284	XM_619126	EHI_122860	RAD51C	Q433502	376	3e-17	51	28	RAD57	P25301	460	e-109	47	27
-	-	-	-	RAD51B	O15315	350	-	-	-	RAD55	P38953	406	-	-	-
-	-	-	-	RAD51D	O75771	289	-	-	-	-	-	-	-	-	-
-	-	-	-	XRCC2	O43543	280	-	-	-	-	-	-	-	-	-
-	-	-	-	XRCC3	O43542	346	-	-	-	-	-	-	-	-	-
EhRAD52	243	XM_648599	EHI_188230	RAD52	P43351	418	2e-35	71	48	RAD52	P06778	504	1e-23	57	38
EhRAD54	885	XM_648260	EHI_103840	RAD54	Q92698	747	e-115	58	41	RAD54	P32863	898	e-106	56	37
EhRAD54B	765	XM_645236	EHI_114930	RAD54B	Q9Y620	910	e-130	52	36	RDH54	P32863	920	e-114	55	39
EhRAD59 (EhRAD52/22 ^a)	190	XM_651011	EHI_112840	-	-	-	-	-	-	RAD59	Q12223	238	2e-08	45	25

^a *E. histolytica* Pathema database^b Swiss-Prot/TrEMBL databases

I, identity; H, homology

rad51 paralogs (*rad51b*, *rad51d*, *xrcc2* and *xrcc3*) that participate in HR in vertebrates were not found in *E. histolytica* (Table 1). In conclusion, *E. histolytica* genome contains a conserved set of repair genes, which suggests that it is skilled to perform recombinational DNA repair.

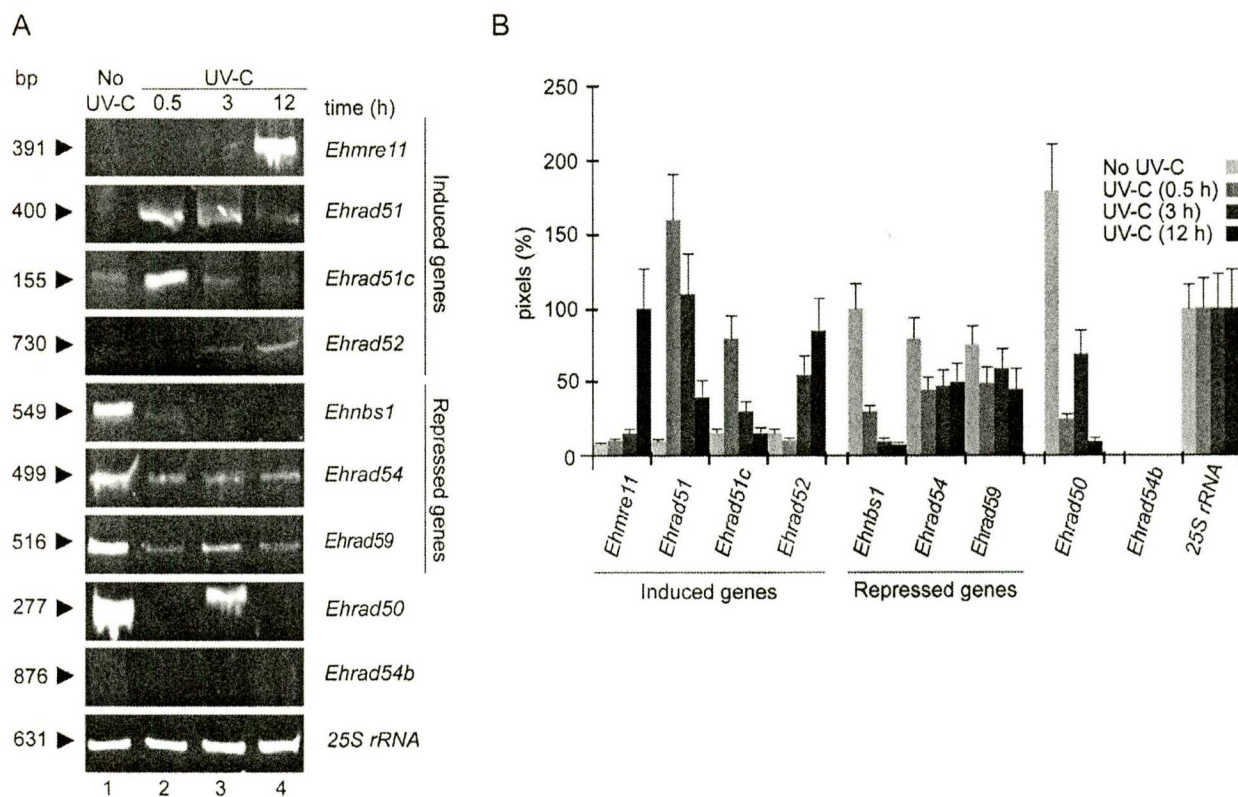
***E. histolytica* genes of the RAD52 epistasis group are differentially expressed in response to UV-C irradiation**

As a first step towards establishing the role of the *E. histolytica* RAD52 epistasis group related genes, we evaluated their mRNA expression by semi-quantitative RT-PCR using the UV-C irradiation model described above. Most genes exhibited a differential mRNA expression profile before and after irradiation (Fig. 3). *Ehmre11*, *Ehrad51*, *Ehrad51c* and *Ehrad52* genes were transcribed at a very low level in non-irradiated trophozoites; meanwhile mRNA expression was induced from 30 min to 12 h after genotoxic damage. Particularly, the *Ehrad51* mRNA expression was 16-, 11- and 4-fold increased at 30 min, 3 h and 12 h, respectively, after UV-C irradiation, when compared with untreated cells (Fig. 3A and 3B). On the other hand, the *Ehnb51*, *Ehrad54* and *Ehrad59* genes were abundantly transcribed in untreated trophozoites; however, mRNA levels were down-regulated after UV-C treatment. The *Ehrad50* gene expression showed the highest steady-state mRNA levels in non-irradiated trophozoites. At 30 min after UV-C irradiation, *Ehrad50* transcript levels dropped drastically; 3 h later, they moderately increased, and at 12 h they diminished again. In contrast, *Ehrad54b* gene did not seem to be expressed under the experimental conditions tested here (Fig. 3A and 3B). We observed minimal changes in the 25S rRNA expression used as control (Fig. 3A, lower panel). These data showed that *E. histolytica*

RAD52 epistasis group related genes were differentially expressed in response to DNA damage.

The predicted EhRAD51 conserves the typical architecture of RECA/RAD51 family members

Since RAD51 recombinases are considered as key enzymes in HR and DNA repair processes in many organisms [24], we focused on the characterization of the *E. histolytica* EhRAD51 protein. *Ehrad51* is an intron-less 1101 bp gene, which encodes a 367 amino acids (aa) polypeptide (40.3-kDa). Sequence similarity searches by BLAST showed the lowest *e*-values (from 3e-29 to 2e-20) and high identity (from 59 to 75%) with many eukaryotic RAD51 proteins, from plants to human, including protozoan parasites. Moreover, EhRAD51 showed 51% and 36% identity with *Methanococcus voltae* RADA and *Escherichia coli* RECA bacterial recombinases, respectively (Additional file 1). Amino acid sequence alignment of EhRAD51 protein with yeast and human RAD51 orthologs revealed that these proteins share functional and structural conserved motifs (Fig. 4A). EhRAD51 contains the putative polymerization motif (110–113 aa residues), which tethers individual subunits to form quaternary assemblies in human RAD51 protein [24] (Additional file 2). We also identified the ATPase Walker A or phosphate binding loop (P-loop: 152–159 aa residues) and Walker B motifs (240–249 aa residues), the ssDNA binding loops L1 (255–264 aa residues) and L2 (293–311 aa residues), as well as the ATP-stacking motif or ATP cap (342–350 aa residues) at the C-terminus, which are essential for nucleofilament assembling and ATP hydrolysis in RAD51/RECA-like recombinases [26,27]. Remarkably, the EhRAD51 N-terminus has a low-complexity region of 34-aa highly enriched in glutamic residues, which is not present in homologous

**Figure 3**

mRNA expression profiles of *E. histolytica* RAD52 epistasis group related genes. **A.** Ethidium bromide stained 6% PAGE showing the RT-PCR products obtained from 1 μ g of total RNA of non-irradiated (No UV-C, lane 1) or irradiated trophozoites harvested at different times (UV-C; lane 2, 0.5 h; lane 3, 3 h and lane 4, 12 h). Arrowheads denote the length (bp) of each expected amplified internal fragment, as described in Table 2. **B.** Densitometric analyses of RT-PCR products in A. Pixels corresponding to the 25S rRNA product were taken as 100% in each lane. Data are the mean of three independent assays.

proteins (Fig. 4A). Phylogenetic relationships among EhRAD51 and RAD51/RECA related proteins from diverse organisms, revealed a progressive evolution from eubacteria to eukaryotes, being EhRAD51 more related to protozoan recombinases (Fig. 4B).

The EhRAD51 protein is overexpressed in response to DNA damage

The recombinant EhRAD51 protein (rEhRAD51) was expressed in *E. coli* BL21 (DE3) plysS strain as a 6x His-tagged fusion polypeptide and subsequently purified by affinity chromatography (Fig. 5A, lanes 3 and 4). By Western blot assays using monoclonal anti-6xHis tag antibodies, the purified rEhRAD51 was detected as a single 47 kDa band, which was slightly higher than the 44.1 kDa expected weight (Fig. 5B, lane 2). Then, rEhRAD51 was used to generate rabbit polyclonal anti-EhRAD51 antibodies. These antibodies recognized the 47 kDa

rEhRAD51 band (Fig. 5B, lane 4), whereas the pre-immune serum, used as negative control, did not detect any signal (Fig. 5B, lane 3). To evaluate the expression of the native EhRAD51 in *E. histolytica*, we performed Western blot assays using anti-EhRAD51 antibodies and protein extracts from irradiated and non-irradiated trophozoites. Antibodies reacted with a weak 46 kDa band in CE from non treated trophozoites, but not signal was detected in NE (Fig. 5C, higher panel, lanes 1 and 2). Meanwhile, at 30 min after UV-C irradiation, antibodies strongly detected the expected 41 kDa endogenous EhRAD51 in CE, but not in NE (Fig. 5C, higher panel lanes 3 and 4). Intriguingly, antibodies also detected a 46 kDa band in both NE and CE from UV-C irradiated trophozoites, which may correspond to a modified form of the 41 kDa protein. The specificity of anti-EhRAD51 antibodies was confirmed performing a similar Western blot assay using anti-EhRAD51 antibodies previously pre-incubated with

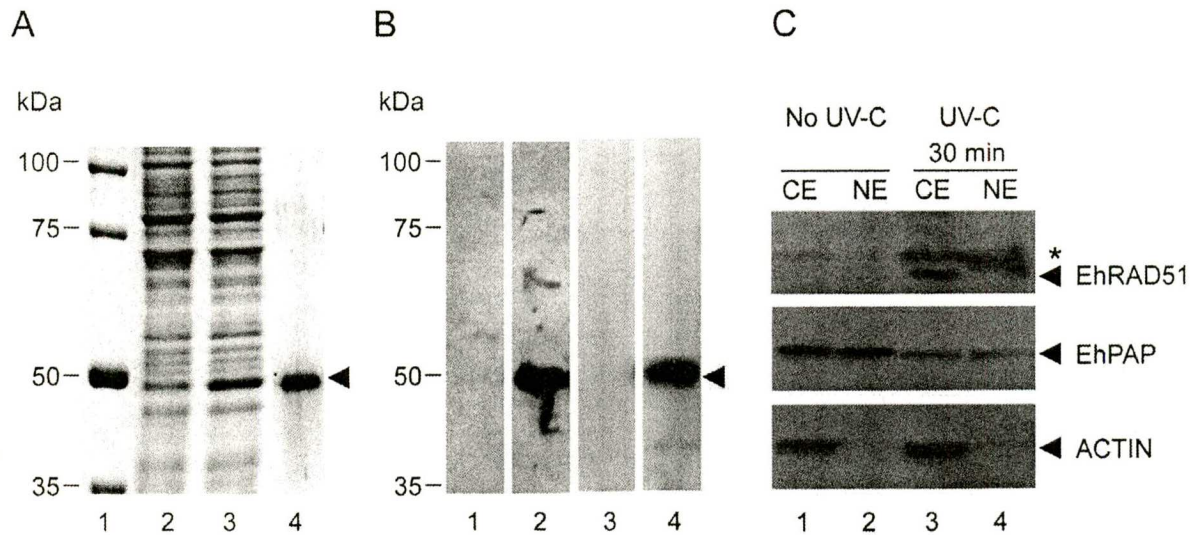


Figure 5

Expression and immunodetection of EhRAD51. **A.** Expression and purification of rEhRAD51-6x His-tagged protein. Bacterial proteins were separated through 10% SDS-PAGE and gels were stained with Coomassie blue. Lane 1, molecular weight markers; lane 2, non-induced bacterial extract (30 μ g); lane 3, IPTG-induced bacterial extract (30 μ g) before passing through the Ni²⁺-NTA affinity column; lane 4, affinity purified polypeptide from IPTG-induced bacteria extract. Arrowhead, 47-kDa rEhRAD51. **B.** Immunodetection of rEhRAD51 polypeptide. Western blot assays were performed using non-induced bacterial extract (lane 1) and purified rEhRAD51 (lanes 2 to 4). Lanes 1 and 2, anti-6x His tag antibodies; lane 3, preimmune serum; lane 4, specific rabbit antibodies raised against rEhRAD51. Arrowhead, 47-kDa rEhRAD51. **C.** Immunodetection of *E. histolytica* endogenous EhRAD51 by Western blot assays using specific anti-EhRAD51 antibodies. CE, cytoplasmic extracts; NE nuclear extracts. Lanes 1 and 2, non-irradiated (No UV-C) trophozoites; lanes 3 and 4, irradiated (UV-C) trophozoites (30 min after UV-C treatment). Upper panel: arrowhead, 41-kDa EhRAD51; asterisk, 46-kDa EhRAD51. Controls using anti-EhPAP and anti-actin antibodies (middle and bottom panels, respectively) are shown.

panels E-H). Three hours later, the cytoplasmic signal diminished, while nuclear *foci*-like structures remained (Fig. 6, panels I-L). At 12 h after genotoxic damage, both cytoplasmic and nuclear EhRAD51 signals were very weak, being EhRAD51 *foci*-like structures scarce (Fig. 6, panels M-P). Quantification of nuclear *foci* like-structures by statistical microscopic analysis showed that about 60% of the cells contained at least one *focus* at 30 min after UV-C irradiation (Fig. 6Q). These findings confirmed that EhRAD51 was up-regulated after UV-C irradiation and suggested that it was redistributed into the nucleus during the first 3 h after DNA damage.

rEhRAD51 exhibits DNA binding activity in vitro

In silico analysis of the EhRAD51 aa sequence evidenced the presence of two putative DNA binding domains. To verify that EhRAD51 is a DNA binding protein, we performed EMSA using increasing amounts of purified rEhRAD51 protein and a fixed concentration of radiolabeled 50-bp ssDNA or 270-bp dsDNA fragments as probes. In order to discard interactions of contaminant *E.*

coli proteins with DNA probes, we used mock purified fractions obtained from untransformed bacteria as a negative control. Results showed that incubation of rEhRAD51 with ssDNA and dsDNA probes resulted in five DNA-protein complexes (C₁-C₅) formation, suggesting that alternative populations of RAD51 protomers were associated to each DNA probes (Fig. 7A and 7B, lanes 2 to 4). The fastest migration ssDNA-protein complex C₁ that was also formed with the mock fraction was considered as unspecific (Fig. 7A, lanes 5 to 7). No complexes were formed in the EMSA control performed with the dsDNA probe (Fig. 7B, lanes 5 to 7). Notably, the abundance of slow migration DNA-protein complexes appeared to increase in the presence of the highest rEhRAD51 amount (Fig. 7A and 7B, lanes 2 to 4). These results showed that rEhRAD51 was able to efficiently bind both ssDNA and dsDNA substrates *in vitro*.

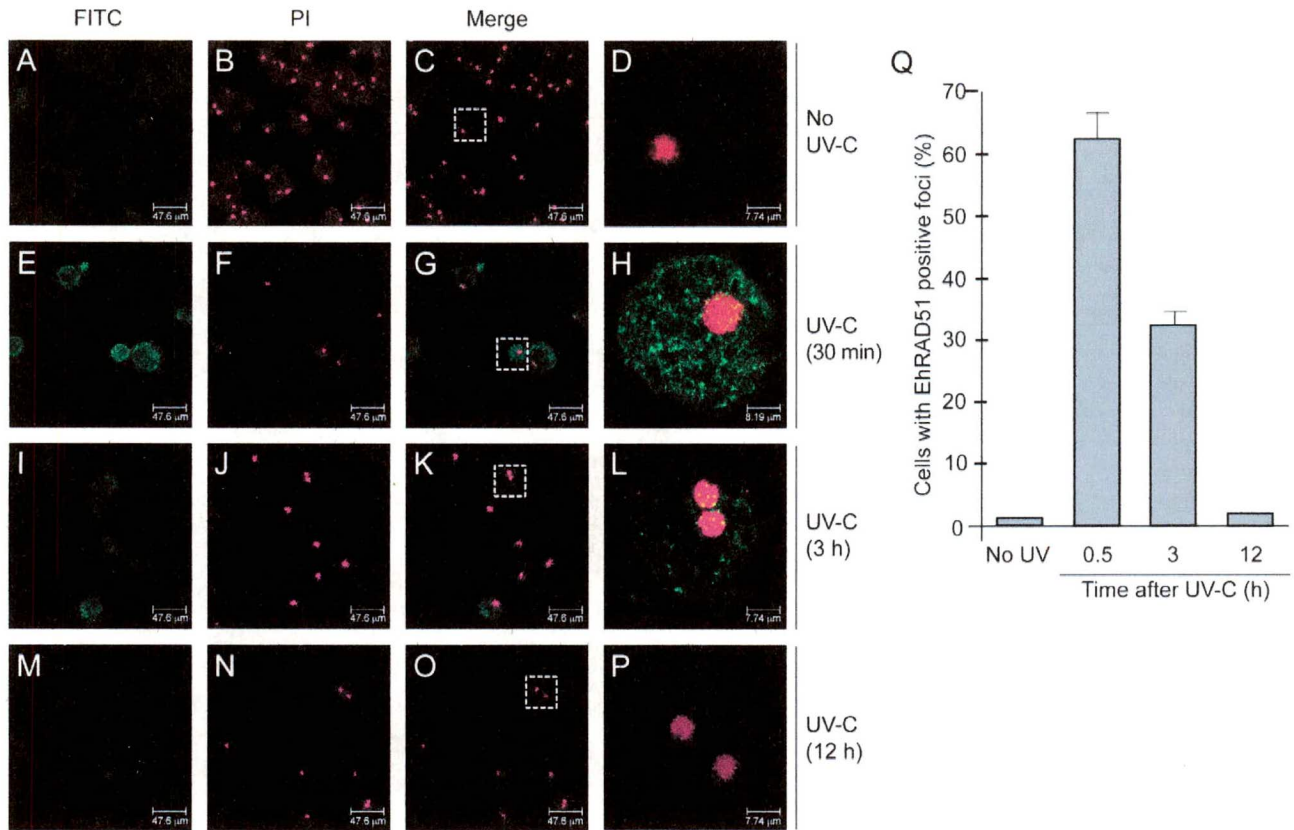


Figure 6
Cellular localization of EhRAD51 in non-irradiated (No UV-C) and irradiated (UV-C) trophozoites at 30 min, 3 h and 12 h after treatment. Trophozoites were incubated with anti-rEhRAD51 antibodies, treated with FITC-labeled secondary antibodies, counterstained with propidium iodide (PI) and analyzed through confocal immunofluorescence microscopy. **A-P.** EhRAD51 immunodetection. A, E, I and M, green channel (FITC); B, F, J and N, red channel (PI) channel; C, G, K and O, merge images; D, H, L and P, single cell (100× magnification) from boxes denoted in C, G, K and O. **Q.** Occurrence of EhRAD51 nuclear foci. The percentage of trophozoites displaying EhRAD51 foci was calculated after scoring 50 nuclei for each time point. Data are the mean of three independent assays.

rEhRAD51 exhibits homologous DNA strand transfer activity in vitro

In order to evaluate the homologous DNA strand transfer function of the rEhRAD51 protein, we performed a pairing assay involving the D-loop structure formation as described in Experimental procedures. Results revealed that rEhRAD51 was able to shift the electrophoretic mobility of the radioactive-labeled 200-bp ssDNA probe incubated with homologous circular dsDNA (Fig. 7C, lanes 2 to 4). This indicated that rEhRAD51 was able to catalyze ssDNA transfer to homologous dsDNA forming the three-stranded pairing molecule or D-loop structure, which has a reduced electrophoretic mobility in comparison with the ssDNA probe. The D-loop formation specificity was confirmed by incubation of rEhRAD51 and ssDNA probe in the absence of homologous dsDNA sub-

strate (Fig. 7C, lane 5), and in the presence of a heterologous dsDNA substrate (Fig. 7C, lane 6), since no complex was observed. In addition, we did not observe any D-loop structure in the absence of rEhRAD51 (Fig. 7C, lane 1). Densitometric analysis of radioactive products showed that D-loop structure formation using 7.5 µg of rEhRAD51 was 3.6 and 1.7-fold higher than with 2.5 and 5 µg of rEhRAD51, respectively (Fig. 7D). These results indicated that EhRAD51 protein was able to catalyze specific DNA pairing and exchange between DNA homologous strands *in vitro*.

Discussion

While non-homologous end joining plays a major role in DSB DNA repair in higher eukaryotes including mammals, HR remains the predominant mechanism to repair

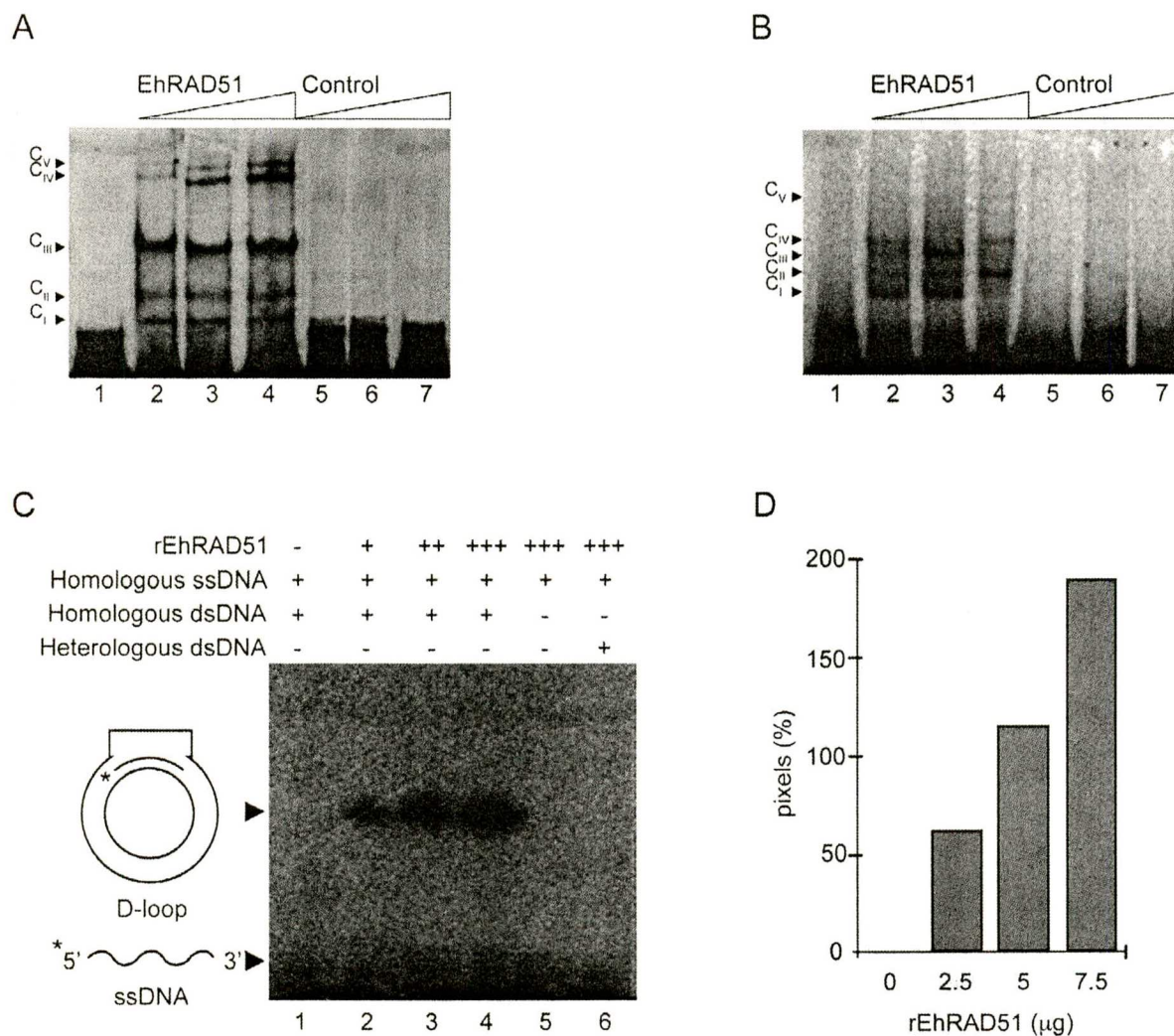


Figure 7

DNA-binding and homologous strand transfer activities of rEhRAD51. **A.** Partially-purified rEhRAD51 was incubated with [γ - 32 P]dATP labeled ssDNA and interactions were resolved through non-denaturing PAGE. Lane 1, free probe. Lanes 2 to 4, ssDNA incubated with increasing amounts of rEhRAD51 (2.5, 5 and 7.5 μ g, respectively); lanes 5 to 7, ssDNA incubated with increasing concentrations of mock purified fraction (2.5, 5 and 7.5 μ g) as control. Protein-DNA complexes (C_I to C_V) are shown by arrowheads. **B.** Partially purified rEhRAD51 was incubated with [α - 32 P]dATP labeled dsDNA and interactions were resolved through PAGE. Lane 1, free probe. Lanes 2 to 4, dsDNA incubated with increasing amounts of rEhRAD51 (2.5, 5 and 7.5 μ g, respectively); lanes 5 to 7, dsDNA incubated with increasing concentrations of mock purified fraction *E. coli* elution fraction (2.5, 5 and 7.5 μ g) as control. Protein-DNA complexes (C_I to C_V) are shown by arrowheads. **C.** D-loop reactions containing 10,000 cpm of [γ - 32 P]dATP-labeled oligonucleotide, circular dsDNA and 0, 2.5, 5 and 7.5 μ g of partially-purified rEhRAD51 (lanes 1 to 4) were incubated at 37°C for 30 min with 2 mM of ATP. Negative controls were performed without homologous dsDNA (lane 5) and with heterologous dsDNA oligonucleotide instead of homologous dsDNA (lane 6), both of them using 7.5 μ g of EhRAD51 elution fraction. Reaction products were analyzed by agarose gel electrophoresis, transferred to nylon membranes and visualized through a Phosphor Imager. **D.** Densitometric analysis of D-loop products obtained in C. Results are representative of two independent experiments.

this kind of lesions in lower eukaryotes [15]. The high amount of repetitive DNA in protozoan parasites, such as *E. histolytica*, suggests that the genome of these organisms can be potentially recombinogenic. Therefore, the study of HR process in *E. histolytica* may advance our understanding about trophozoites genetic and virulence variability, as well as DNA repair mechanisms.

Here, we developed a 254 nm UV-C light irradiation model, which induces DNA damage in *E. histolytica* trophozoites and activates recombinational DNA repair pathway. Irradiation dose (150 J/m²) and time (8 s) were determined as no lethal conditions for cells in comparison with other UV doses previously evaluated. Growth curves were performed up to 18 h, the doubling time of trophozoites, without observing any significant changes (data not shown). Early phosphorylation of *E. histolytica* H2AX histones after UV-C irradiation was consistent with DNA DSBs formation, suggesting chromatin remodeling and recruitment of histone-phosphorylating enzymes, as observed in other eukaryotic systems [22]. Moreover, *E. histolytica* trophozoites survival throughout almost 12 h after irradiation indicated the existence and activation of DNA repair mechanisms. *In silico* analysis of the *E. histolytica* genome sequence revealed that this pathogen has genes that encode putative EhRAD52 epistasis group members, which participate in recombinational DNA repair in other organisms. Given the place of this ancient protista in the eukaryote phylogenetic scale, EhRAD52 epistasis group had equivalent similarity with homologous proteins from different organisms, such as mammals, plants and other protozoan parasites.

RT-PCR assays evidenced a differential mRNA expression of *E. histolytica* *rad52* epistasis group genes, before and after DNA damage. Some genes (*Ehnb51*, *Ehrad54* and *Ehrad52/22*) were down-regulated after DNA damage, others (*Ehmre11*, *Ehrad51*, *Ehrad51-C* and *Ehrad52*) were up-regulated at different times following genotoxic stimulus, whereas *Ehrad50* mRNA levels were regulated in a variable manner, suggesting a complex transcriptional response. Interestingly, *Ehrad54b* gene did not seem to be transcribed under our experimental conditions. However, in yeast and human, both RAD54 and RAD54B are DNA helicases which participate in the formation of heteroduplex DNA in recombination processes [11]. It is possible that the expression of *Ehrad54* homolog is sufficient to cover this activity in trophozoites, although additional experiments are required to confirm this hypothesis. The absence of a coordinated transcriptional activation of *Ehrad52* epistasis group genes suggest that trophozoites have enough stationary levels of enzymes for DBB repair and the main regulation could be occurring at translational and/or posttranslational level. A further evaluation of EhRAD52 epistasis group proteins regulation in

response to DNA damage will help us to better understand DNA repair by HR in *E. histolytica*. It seems that the molecular events related to DNA lesions produced by genotoxic agents can be barely inferred from gene expression profiling. Indeed, studies in yeast and mammals have shown no-relationship between genes whose expression is increased after different DNA-damaging treatments (ionizing radiation, UV light, cisplatin, H₂O₂) and those genes that are involved in protecting against cytotoxicity to the same agents [28,29].

We focused on *Ehrad51* gene because RAD51 proteins have been demonstrated as key players in recombinational DNA repair in lower and higher eukaryotes [for review see [12]]. Interestingly, the *Ehrad51* transcript steady state levels were about 15-fold higher at 30 min post-UV-C treatment and decreased 3 and 12 h later, suggesting that EhRAD51 could be participating in HR in the early steps of DNA repair. Similar transcriptional activation after UV treatment has been reported as a common characteristic for *recA/rad51* homologs of *Tetrahymena thermophila* [30] and *Halobacterium* sp. [31]. In agreement with the RT-PCR results, Western blot assays showed a dramatic increase of EhRAD51 in cytoplasm and nucleus, 30 min after DNA breaks were introduced into the *E. histolytica* genome. The fact that specific polyclonal antibodies immunodetected a 46 kDa EhRAD51 protein suggest that some posttranslational modifications of the cytoplasmic 41 kDa EhRAD51 could be a requirement for its translocation to the nucleus where DNA repair takes place. Taking in consideration that the EhRAD51 sequence lacks a nuclear localization signal, an alternative possibility might be that EhRAD51 needs to interact with other protein(s) to be transported inside the nucleus. However, additional experiments are required to corroborate these hypotheses.

As observed for yeast and human homologs [32], laser confocal microscopy evidenced focal sites of the EhRAD51 protein scattered in the nucleus at 30 min and 3 h after DNA damage. Congruently, the EhRAD51 nuclear *foci*-like structure occurrence was consistent with the DNA fragmentation degree observed in TUNEL and neutral comet assays. Since UV-C treatment did not affect trophozoites viability, it is tempting to suggest that DNA repair mechanisms involving EhRAD51 *foci* formation were activated to restore genome integrity after genotoxic insult.

In silico analysis demonstrated that the predicted EhRAD51 protein contains all functional and structural motifs that are important for RECA/RAD51 recombinases activities. To experimentally support its role in DNA repair by HR, we performed the basic characterization of EhRAD51 protein. EhRAD51 functional properties were

similar to those previously reported for RAD51 homologous [33-35]. EhRAD51 was able to bind both ssDNA and dsDNA substrates in the presence of ATP and Mg²⁺. The various rEhRAD51-DNA complexes may be related to different amounts of rEhRAD51 molecules bound to ssDNA or dsDNA probe. Finally, EhRAD51 promoted specific three-stranded pairing structure formation or D-loop. Based on the data presented here, we proposed a working model for DNA DSB repair involving the EhRAD51 recombinase. When a DSB is introduced in *E. histolytica* genome, EhH2AX histones become phosphorylated, which could induce chromatin remodeling and accumulation of the EhRAD52 epistasis group proteins at the DNA DSB site. We observed that EhRAD51 was relocated into the DNA repair nuclear foci, where it could mediate DNA pairing and homologous strand exchange to restore genome integrity. It is also possible that *E. histolytica* RAD51 protein may play a role in genome rearrangements that naturally occur within this organism during DNA synthesis. Therefore, it will be interesting to evaluate its involvement in frequent ploidy changes, unscheduled gene amplification and duplication events observed in *E. histolytica* genome [3,4]. Our next challenge will involve studying *in vivo* HR and the relevant role of EhRAD51 in this process in *E. histolytica*.

Conclusion

Our results provide the first data supporting the role of the RAD52 epistasis group genes in DNA repair process in *E. histolytica*. We showed that *E. histolytica* RAD52 epistasis group genes, were differentially expressed when DNA fragmentation was induced by UV-C irradiation. We also showed that EhRAD51 protein was overexpressed and relocalized in nuclear foci-like structures after DNA damage, and demonstrated that recombinant EhRAD51 function as a recombinase *in vitro*. These data evidenced a potential role of EhRAD51 protein in DNA damage response in this ancient eukaryotic parasite.

Methods

E. histolytica cultures

Trophozoites of *E. histolytica* clone A (strain HM1: IMSS) were axenically cultured in TYI-S-33 medium [36] at 37°C and harvested during exponential growth phase.

Trophozoites UV-C light irradiation

Trophozoites (2×10^6) grown in culture bottles were transferred into glass dishes and incubated at 37°C for 30 min. Medium and floating cells were discarded, and adhered trophozoites were irradiated with 254 nm UV-C light at 150 J/m² for 8 s using a UV Stratalinker 1800 device (Stratagene). After treatment, cells were incubated in fresh TYI-S-33 medium at 37°C for 0.5, 3, 6 and 12 h to be used in different experiments. Non-irradiated cells were used as a control in all experiments. Cell viability

was monitored by microscopy using a trypan blue dye exclusion test. Assays were done three times by duplicate.

Evaluation of DNA fragmentation by TUNEL assay

Trophozoites (2×10^6) were harvested at 0.5, 3, 6 and 12 h after UV-C irradiation, washed with PBS 1× and fixed with 1% paraformaldehyde. After cell permeabilization with 70% ethanol, DNA damage was quantified using the APO-BrdUTP TUNEL Assay Kit (Molecular Probes) in order to detect 3'-hydroxyl ends in DNA. Permeabilized trophozoites were incubated at 37°C for 1 h in the DNA-labeling solution, which contains terminal deoxynucleotidyl transferase enzyme (TdT) and deoxythymidine analog 5-bromo-2'-deoxyuridine 5'-triphosphate (BrdUTP). Then, cells were washed twice and suspended in antibody staining solution (Alexa Fluor 488 dye-labeled anti-BrdU antibody) at room temperature for 1 h. After that, cells were incubated in propidium iodide/RNase A staining buffer at room temperature for 30 min. Samples were analyzed by flow cytometry in a BD FACS Calibur system and fluorescence data were plotted with the FloJo software.

Evaluation of DNA fragmentation by Comet assay

Trophozoites (5×10^4) were harvested at 0.5, 3, 6 and 12 h after UV-C irradiation. Neutral comet assay were performed using protocols from Tice and co-workers [37]. Briefly, cells were mixed with agarose and spread over a warmed, precoated microscope slides. Agarose was allowed to solidify at 4°C, followed by immersion in cold lysis fresh solution (2.5 M NaCl, 100 mM EDTA, 10 mM Tris, pH 7) overnight. Next, electrophoresis was carried out in neutral buffer for 20 min at 1.5 V/cm (measured electrode to electrode) in the dark at 4°C. Finally, the slides were completely dried and ethidium bromide-stained DNA was observed at 400× magnification using an epifluorescence microscope (Leica DMIL).

Detection of phosphorylated EhH2AX histones

The two *Ehh2ax* genes, which are homologous to the human *h2ax* gen, had been previously reported [22]. Their existence in the *E. histolytica* Pathema database [38] were confirmed by BLAST using yeast H2A and human H2AX protein sequences as queries. The presence of phosphorylated forms of EhH2AX histone (γEhH2AX) in *E. histolytica* protein extracts obtained 10 or 30 min after UV-C irradiation was evaluated by Western blot assays using the anti-phospho-Histone H2AX (pSer¹³⁹), which was developed in rabbit using a synthetic phosphorylated peptide corresponding to 134–142 aa residues (including the phosphorylated Ser) of human H2AX histone C-terminus (Sigma). Subcellular fractionation to obtain CE and NE from clone A trophozoites was performed as described [39]. Proteins were separated by 10% SDS-PAGE, transferred to nitrocellulose membranes (BioRad) and blocked with 1% BSA/PBS solution. Then, filters were incubated at

room temperature for 2 h with the anti-human γ H2AX polyclonal antibody (1:7000 dilution), washed with PBS $1 \times 0.05\%$ Tween and incubated at 37°C for 1 h with goat anti-rabbit IgG horseradish peroxidase secondary antibody (Zymed) at 1:10000 dilution. Bands were revealed by ECL Plus Western blotting system (Amersham). As internal controls, we used polyclonal antibodies (1:1000 dilution) raised against the *E. histolytica* poly(A) polymerase EhPAP and anti-actin antibodies.

In silico identification of *E. histolytica* genes homologous to yeast RAD52 epistasis group

RAD52 epistasis group related genes were identified in *E. histolytica* Pathema database using both yeast and human protein sequences as queries. Putative *E. histolytica* orthologous proteins were selected from BLAST analysis according to the following criteria: (i) at least 20% identity and 35% homology to the query sequence; (ii) *e*-value lower than 0.002; and (iii) absence of stop codons in the coding sequence. Predicted aa sequences were aligned by the ClustalW software [40]. Functional domains were predicted by the Prosite program [41]. Phylogenetic inference was performed using the Neighbor-joining distance method [42] as implemented in the Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA version 3.1) software [43]. Tree robustness was established by bootstrapping test, involving 1000 replications of the data based on the criteria of 50% majority-rule consensus.

RT-PCR assays

Total RNA was obtained using Trizol reagent (Invitrogen) from trophozoites of clone A grown in basal culture conditions or after UV-C treatment. Semi-quantitative RT-PCR was performed as previously described [44] using 1 μg of total RNA and specific primers for each gene (Table 2). As a control, we amplified a 25S rRNA gene internal sequence. Products were separated by 6% PAGE, stained with ethidium bromide and submitted to densitometric analysis in a Gel doc 1000 apparatus (BioRad) using the

Quantity One software. Data are the mean of three independent assays.

Cloning of the *Ehrad51* gene

The 1098-bp full-length *Ehrad51* gene was PCR-amplified from genomic DNA of clone A trophozoites using *Ehrad51-S* (5'-CGGGATCCAAAGTAATGAG TGCCAA GCA-3') sense and *Ehrad51-AS* (5'-CCAAGCTTGCCAT-TCTCC GTATTATGGC-3') antisense primers, which contain *Bam*HI and *Hind*III restriction sites, respectively (underlined). Amplification was performed as follows: 94°C for 5 min and 30 cycles at 94°C for 35s, 48°C for 35 s and 72°C for 1 min, plus a final extension step at 72°C for 7 min, using High Fidelity DNA *Taq* polymerase (Invitrogen). The PCR product was purified and cloned in frame into the pRSET A expression vector (Invitrogen). The recombinant pRSET -*Ehrad51* plasmid construct was confirmed by automated DNA sequencing in an ABI-PRISM 310 (Applied Biosystem) sequencer.

Expression and purification of recombinant *EhRAD51* (r*EhRAD51*) protein

E. coli BL21 (DE3) pLysS bacteria were transformed with pRSET -*Ehrad51* plasmid and grown at 37°C in 2-TY medium containing 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ampicillin and 34 $\mu\text{g}/\text{ml}$ chloramphenicol to an $\text{OD}_{600\text{nm}}$ of 0.6. The expression of r*EhRAD51* was induced with 1 mM isopropyl beta-D-thiogalactopyranoside (IPTG) at 37°C for 3 h. Cells were harvested, resuspended in lysis buffer (50 mM NaH_2PO_4 , 300 mM NaCl, 10 mM imidazole, pH 8.0) and lysed by sonication at 4°C . Soluble r*EhRAD51* was purified near to homogeneity under denaturing and native conditions through Ni^{2+} -NTA affinity chromatography according to the manufacturer recommendations (Qiagen). Purified r*EhRAD51* identity and integrity were confirmed by 10% SDS-PAGE and Western blot assays using anti-6xHis tag antibodies (Roche) at 1:5000 dilution and the ECL Plus Western blotting detection system (Amersham).

Table 2: Primers used in RT-PCR assays

Gene	Sense primer	Antisense primer	Amplified product (bp)	T _m ($^\circ\text{C}$)
<i>Ehmrel1</i>	5'-CGAGAAGAAGAGCAGCTCAA	5'-CTTTCCTTTTCTTCAGCCA	391	49.5
<i>Ehrad50</i>	5'-CAGCCCAAGACATTCAAACA	5'-CTGCATAATTGTTGTGCCAA	277	49.5
<i>Ehnbs1</i>	5'-CACCTCCCACACCACAGTAT	5'-CTCCACCAATGAATGACCAT	549	49.0
<i>Ehrad51</i>	5'-ATTGCTTTTACACCAAAG	5'-TTCTTCTGAATTTAATCC	400	49.5
<i>Ehrad51C</i>	5'-CCACATGACATTGTGAGTCT	5'-GAATTATCCGATGAAGTGCT	155	45.0
<i>Ehrad52</i>	5'-ATGACTGAAATAGATACCTC	5'-AATTTGATTGTTTTAAGAAT	730	37.5
<i>Ehrad54</i>	5'-GTCATGCCATTGACCAATTA	5'-TCACACTCTTCCTCAGTTGG	499	47.5
<i>Ehrad54b</i>	5'-GGGCAAAAAATTCACTAAA	5'-GTCGTGATCCTCCAAGTGCT	876	50.0
<i>Ehrad52/22</i>	5'-ATGTCTCATGAAATAAAACCAC	5'-TCATTTCTTACGTCTAACTATTACT	516	44.5
25S rRNA	5'-TATCAAATCAAAGACCCCGCT	5'-AAAAGA AAAACTAAGCGGTAA	631	51.0
<i>actin</i>	5'-AGCTGTTCTTTCATTATATGC	5'-TTCTCTTTCAGCAGTAGTGTT	220	48.0

Production of polyclonal antibodies raised against EhRAD51

Purified rEhRAD51 was submitted to preparative 10% SDS-PAGE, electroeluted from Coomassie stained-gels and subsequently used as antigen to immunize a New Zealand male rabbit. An initial dose of 200 µg of rEhRAD51 in complete Freund's adjuvant (Sigma) was subcutaneously inoculated into the animal, and then three doses of 100 µg in incomplete Freund's adjuvant were injected every 15 days. One week after the last immunization, the rabbit was bled and polyclonal antiserum was obtained. IgGs were purified through protein G sepharose chromatography and tested for reactivity against rEhRAD51 protein by Western blot assays.

Immunodetection of EhRAD51 in subcellular extracts

Western blot assays were performed using CE and NE proteins obtained before or 30 min after UV-C irradiation, and the membranes were incubated with anti-EhRAD51 polyclonal antibodies (1:1000 dilution) and goat anti-rabbit IgG horseradish peroxidase secondary antibody (Zymed)(1:10000 dilution). Immunodetected proteins were revealed with the ECL Plus Western blotting system (Amersham). The specificity of the anti-EhRAD51 antibodies was confirmed using anti-EhRAD51 antibodies pre-incubated with purified rEhRAD51 protein. As internal controls, we used polyclonal antibodies raised against the *E. histolytica* EhPAP [23] and actin proteins.

Laser confocal microscopy assays

Trophozoites were grown on sterile coverslips, fixed with 4% paraformaldehyde at 37°C for 1 h, permeabilized with acetone and blocked with 1% BSA/PBS. Next, cells were incubated with anti-EhRAD51 polyclonal antibodies (1:200 dilution) at 37°C for 2 h, followed by the anti-rabbit fluoresceinated monoclonal antibody (1:100 dilution) at 37°C for 1 h. Then, trophozoites were washed three times with PBS 1× at room temperature and DNA was counterstained with propidium iodide (5 µg/ml) for 7 min. Light optical sections were obtained through a Nikon inverted microscope attached to a laser confocal scanning system (Leica) and analyzed by Confocal Assistant software Image J [45].

DNA-binding assays

For the electrophoretic mobility shift assay (EMSA), we used two DNA probes: a 50-nt ss oligonucleotide (*adh50*) from the *Ehadh112* gene [46], which was [γ -³²P]dATP (500 µCi/mmol) 3'-end labeled by T4 polynucleotide kinase at 37°C for 30 min, and a 270-bp dsDNA fragment (*pgp270*) of the 3'-UTR *EhPgp5* gene [50] that was [α -³²P]dATP (200 µCi/mmol) uniformly labeled by PCR. EMSA was carried out in a 25 µl final volume reaction in binding buffer (50 mM Tris-HCl pH 7.8, 1 mM DTT, 10 mM MgCl₂, 1 mM ATP) in the presence of increasing

amounts of native rEhRAD51 (0, 2.5, 5 and 7.5 µg). Reactions were started by addition of *adh50* or *pgp270* radiolabeled probes (10000 cpm) at 37°C for 15 min. Control assays were performed substituting purified rEhRAD51 by the mock purified fraction obtained from untransformed bacteria. DNA-protein complexes were resolved on 6% non-denaturing TBE polyacrylamide gels, vacuum-dried and exposed to Phosphor Imager screen (BioRad).

D-loop structure formation assay

The EhRAD51 homologous DNA strand transfer activity was evaluated by the D-loop formation assay according to the described procedure [47]. A ssDNA fragment of 200 bases (*pgp200*), which is complementary to the 3'-UTR *Ehpgp5* gene cloned in the dsDNA plasmid [44], was [γ -³²P]dATP (500 µCi/mmol) 3'-end labeled by T4 polynucleotide kinase at 37°C for 30 min. Increasing amounts of rEhRAD51 (0, 2.5, 5 and 7.5 µg) were pre-incubated in reaction buffer (50 mM Tris-HCl pH 7.8, 1 mM DTT, 10 mM MgCl₂ and 1 mM ATP) with the *pgp200* probe (10,000 cpm) at 37°C for 15 min. Then, homologous dsDNA plasmid (1 µM) was added and the mixture was incubated at 37°C for 30 min. A non-related plasmid was used as heterologous dsDNA control. Reactions were stopped by addition of 0.1% SDS. To prevent that EhRAD51 binds and shifts the *pgp200* probe, samples were deproteinized with proteinase K (1 mg/ml) at 37°C for 10 min. Then, they were fractionated by 1% agarose gel electrophoresis in TAE 1× buffer and transferred to a nylon membrane (Amersham) in SSC 20× solution overnight. Homologous DNA strand transfer activity of rEhRAD51 was evaluated through the visualization of radioactive DNA products in a Phosphor Imager (BioRad) and quantified by densitometry using the Quantity one software (BioRad).

Authors' contributions

MLC carried out most of the experiments and drafted the manuscript. EO participated in the study design, data interpretation and co-wrote the manuscript. Most of experiments presented here were performed in EO laboratory (CINVESTAV-IPN). LAM participated in the study design, data interpretation and bioinformatic analysis. CLC conceived the project, cloned the *Ehrad51* gene, supervised the experiments and co-wrote the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Additional material

Additional file 1

Comparisons of EhRAD51 with orthologous proteins from other organisms. This table includes proteins homologous to EhRAD51 with respective homology/identity and e-values.

Click here for file

[<http://www.biomedcentral.com/content/supplementary/1471-2199-9-35-S1.doc>]

Additional file 2

Predictions of EhRAD51 tertiary structure using the Swiss Model software and the yeast RAD51 protein crystal structure (PDB entry 1szp) as template. **A.** Predicted three-dimensional model of EhRAD51 protein showing the N-terminal domain (ND) constituted by a five- α helix bundle ($\alpha 1$ to $\alpha 5$) and an ATPase domain (AD) conformed by a twisted central β -sheet, which includes 10 β strands sandwiched by α -helices on both sides connected by a polymerization motif (PM). **B.** ATPase Walker A motif lies between $\beta 1$ and $\alpha 8$ and conserves the catalytic lysine (K160) and threonine (T160) residues, which are associated to ATP γ -phosphate contact and Mg^{2+} ion stabilization, respectively, in homologous proteins. Walker B motif lies on $\beta 4$ and precedes $\alpha 12$ and the disordered DNA-binding loop 1. ATP cap is in close proximity to an ATP molecule. EhRAD51 DNA-binding loop 2 is formed by two inter-connected β strands ($\beta 6$ and $\beta 7$). **C.** Three-dimensional representation of Polymerization motif (PM). Critical conserved residues conforming PM in helix 6 are shown. Key motifs were colored as follow: violet, PM; red, ATPase Walker A; green, Walker B; blue, ATP cap; yellow, Loop 1 and purple, Loop 2. Models were displayed and refined using the Pymol PBD viewer.

Click here for file

[<http://www.biomedcentral.com/content/supplementary/1471-2199-9-35-S2.tiff>]

Acknowledgements

Monoclonal anti-actin antibodies were gently donated by Dr. Manuel Hernandez (CINVESTAV-IPN). We are grateful to Victor Rosales (CINVESTAV-IPN) for helping us with the acquisition of FACS data and to M. Sc. Eduardo Carrillo (UACM) for laser confocal microscopy assistance. Our thanks are also to Alfredo Padilla and Sollange Archer (UACM) for their help in the artwork, as well as Dr. Rosana Arroyo for critical reading of manuscript. This work was supported by Mexican grants from UACM, CONACyT, COFAA-IPN and SIP-IPN.

References

- Jackson T, Reddy S, Fincham J, bd-Alla M, Welles S, Ravdin J: **A comparison of cross-sectional and longitudinal seroepidemiological assessments of entamoeba-infected populations in South Africa.** *Arch Med Res* 2000, **31**:S36-S37.
- Orozco E, de la Cruz HF, Rodriguez MA: **Isolation and characterization of Entamoeba histolytica mutants resistant to emetine.** *Mol Biochem Parasitol* 1985, **15**:49-59.
- Zaki M, Meelu P, Sun W, Clark CG: **Simultaneous differentiation and typing of Entamoeba histolytica and Entamoeba dispar.** *J Clin Microbiol* 2002, **40**:1271-1276.
- Báez-Camargo M, Gharaibeh R, Riverón AM, de la Cruz Hernández F, Luna JP, Gariglio P, Chávez P, Orozco E: **Gene amplification in Entamoeba histolytica.** *Invasion Metastasis* 1996, **16**:269-279.
- Lisby M, Rothstein R: **DNA damage checkpoint and repair centers.** *Curr Opin Cell Biol* 2004, **16**:328-334.
- Wei C, Skopp R, Takata M, Takeda S, Price CM: **Effects of double-strand break repair proteins on vertebrate telomere structure.** *Nucleic Acids Res* 2002, **30**:2862-2870.
- Masson JY, West SC: **The Rad51 and Dmcl1 recombinases: a non-identical twin relationship.** *Trends Biochem Sci* 2001, **26**:131-136.
- van Attikum H, Gasser SM: **The histone code at DNA breaks: a guide to repair?** *Nat Rev Mol Cell Biol* 2005, **6**:757-765.
- Longhese MP, Mantiero D, Clerici M: **The cellular response to chromosome breakage.** *Mol Microbiol* 2006, **60**:1099-1108.
- Peck RF, DasSarma S, Krebs MP: **Homologous gene knockout in the archaeon Halobacterium salinarum with ura3 as a counterselectable marker.** *Mol Microbiol* 2000, **35**:667-676.
- Symington LS: **Role of RAD52 epistasis group genes in homologous recombination and double-strand break repair.** *Microbiol Mol Biol Rev* 2002, **66**:630-700.
- Thacker J: **The RAD51 gene family, genetic instability and cancer.** *Cancer Lett* 2005, **219**:125-135.
- Paques F, Haber JE: **Multiple pathways of recombination induced by double-strand breaks in Saccharomyces cerevisiae.** *Microbiol Mol Biol Rev* 1999, **63**:349-404.
- Tashiro S, Walter J, Shinohara A, Kamada N, Cremer T: **Rad51 accumulation at sites of DNA damage and in postreplicative chromatin.** *J Cell Biol* 2000, **150**:283-291.
- Bhattacharyya MK, Norris DE, Kumar N: **Molecular players of homologous recombination in protozoan parasites: implications for generating antigenic variation.** *Infect Genet Evol* 2004, **4**:91-98.
- Conway C, Proudfoot C, Burton P, Barry JD, McCulloch R: **Two pathways of homologous recombination in Trypanosoma brucei.** *Mol Microbiol* 2002, **45**:1687-1700.
- Dzikowski R, Deitsch K: **Antigenic variation by protozoan parasites: insights from Babesia bovis.** *Mol Microbiol* 2006, **59**:364-366.
- Freitas-Junior LH, Bottius E, Pirrit LA, Deitsch KW, Scheidig C, Guinet F, Nehrass U, Wellemis TE, Scherf A: **Frequent ectopic recombination of virulence factor genes in telomeric chromosome clusters of P. falciparum.** *Nature* 2000, **407**:1018-1022.
- Triglia T, Foote SJ, Kemp DJ, Cowman AF: **Amplification of the multidrug resistance gene pfmdr1 in Plasmodium falciparum has arisen as multiple independent events.** *Mol Cell Biol* 1991, **11**:5244-5250.
- Woods WG, Dyal-Smith ML: **Construction and analysis of a recombination-deficient (radA) mutant of Haloferax volcanii.** *Mol Microbiol* 1997, **23**:791-797.
- Chen HT, Bhandoola A, Diflippantonio MJ, Zhu J, Brown MJ, Tai X, Rogakou EP, Brotz TM, Bonner WM, Ried T, Nussenzweig A: **Response to RAG-mediated VDJ cleavage by NBS1 and gamma-H2AX.** *Science* 2000, **290**:1962-1965.
- Sullivan WJ Jr, Naguleswaran A, Angel SO: **Histones and histone modifications in protozoan parasites.** *Cell Microbiol* 2006, **8**:1850-1861.
- García-Vivas J, Lopez-Camarillo C, Azuara-Liceaga E, Orozco E, Marchat LA: **Entamoeba histolytica: cloning and expression of the poly(A) polymerase EhPAP.** *Exp Parasitol* 2005, **110**:226-232.
- Bell CE: **Structure and mechanism of Escherichia coli RecA ATPase.** *Mol Microbiol* 2005, **58**:358-366.
- Wu Y, Qian X, He Y, Moya IA, Luo Y: **Crystal structure of an ATPase-active form of Rad51 homolog from Methanococcus voltae. Insights into potassium dependence.** *J Biol Chem* 2005, **280**:722-728.
- Shin DS, Pellegrini L, Daniels DS, Yelent B, Craig L, Bates D, Yu DS, Shivji MK, Hitomi C, Arvai AS, Volkmann N, Tsuruta H, Blundell TL, Venkataraman AR, Tainer JA: **Full-length archaeal Rad51 structure and mutants: mechanisms for RAD51 assembly and control by BRCA2.** *EMBO J* 2003, **22**:4566-4576.
- Conway AB, Lynch TW, Zhang Y, Fortin GS, Fung CW, Symington LS, Rice PA: **Crystal structure of a Rad51 filament.** *Nat Struct Mol Biol* 2004, **11**:791-796.
- Birrell GW, Brown JA, Wu H, Giaever G, Chu AM, Davis RW, Brown JM: **Transcriptional response of Saccharomyces cerevisiae to DNA-damaging agents does not identify the genes that protect against these agents.** *Proc Natl Acad Sci USA* 2002, **99**:8778-8783.
- Garinis GA, Mitchell JR, Moorhouse MJ, Hanada K, de Waard H, Vandeputte D, Jans J, Brand K, Smid M, van der Spek PJ, Hoeljmackers JH, Kanaar R, van der Horst GT: **Transcriptome analysis reveals cyclobutane pyrimidine dimers as a major source of UV-induced DNA breaks.** *EMBO J* 2005, **24**:2952-2962.

30. Campbell C, Romero DP: **Identification and characterization of the RAD51 gene from the ciliate Tetrahymena thermophila.** *Nucleic Acids Res* 1998, **26**:3165-3172.
31. McCready S, Muller JA, Boubriak I, Berquist BR, Ng WL, Dassarma S: **UV irradiation induces homologous recombination genes in the model archaeon, Halobacterium sp. NRC-1.** *Saline Systems* 2005, **1**:3.
32. Sorensen CS, Hansen LT, Dziegielewski J, Syljuåsen RG, Lundin C, Bartek J, Helleday T: **The cell-cycle checkpoint kinase Chk1 is required for mammalian homologous recombination repair.** *Nat Cell Biol* 2005, **7**:195-201.
33. Haaf T, Golub EI, Reddy G, Radding CM, Ward DC: **Nuclear foci of mammalian Rad51 recombination protein in somatic cells after DNA damage and its localization in synaptonemal complexes.** *Proc Natl Acad Sci USA* 1995, **92**:2298-2302.
34. Kant CR, Rao BJ, Sainis JK: **DNA binding and pairing activity of OsDmcl, a recombinase from rice.** *Plant Mol Biol* 2005, **57**:1-11.
35. Tomblin G, Heinen CD, Shim KS, Fishel R: **Biochemical characterization of the human RAD51 protein. III. Modulation of DNA binding by adenosine nucleotides.** *J Biol Chem* 2002, **277**:14434-14442.
36. Orozco E, Suarez ME, Sanchez T: **Differences in adhesion, phagocytosis and virulence of clones from Entamoeba histolytica, strain HMI:IMSS.** *Int J Parasitol* 1985, **15**:655-660.
37. Tice RR, Agurell E, Anderson D, Burlinson B, Hartmann A, Kobayashi H, Miyamae Y, Rojas E, Ryu JC, Sasaki YF: **Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing.** *Environ Mol Mutagen* 2000, **35**:206-221.
38. **The E. histolytica Pathema database** [<http://pathema.tigr.org/tigr-scripts/Entamoeba/PathemaHomePage.cgi>]
39. Marchat LA, Pezet-Valdez M, Lopez-Camarillo C, Orozco E: **Entamoeba histolytica: expression and DNA binding of CCAAT/enhancer-binding proteins are regulated through the cell cycle.** *Exp Parasitol* 2003, **103**:82-87.
40. **ClustalW software** [<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>]
41. **Prosite program** [<http://www.expasy.org/tools/scanprosite/>]
42. Saitou N, Nei M: **The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees.** *Mol Biol Evol* 1987, **4**:406-425.
43. **MEGA version 3.1 software** [<http://www.megasoftware.net>]
44. Lopez-Camarillo C, Luna-Arias JP, Marchat LA, Orozco E: **EhPgp5 mRNA stability is a regulatory event in the Entamoeba histolytica multidrug resistance phenotype.** *J Biol Chem* 2003, **278**:11273-11280.
45. **Confocal Assistant software Image J** [<http://rsb.info.nih.gov/ij/>]
46. Banielos C, Garcia-Rivera G, Lopez-Reyes I, Orozco E: **Functional characterization of EhADH112: an Entamoeba histolytica Bro1 domain-containing protein.** *Exp Parasitol* 2005, **110**:292-297.
47. Kinebuchi T, Kagawa W, Enomoto R, Tanaka K, Miyagawa K, Shibata T, Kurumizaka H, Yokoyama S: **Structural basis for octameric ring formation and DNA interaction of the human homologous-pairing protein Dmcl.** *Mol Cell* 2004, **14**:363-374.

Publish with **BioMed Central** and every scientist can read your work free of charge

"BioMed Central will be the most significant development for disseminating the results of biomedical research in our lifetime."

Sir Paul Nurse, Cancer Research UK

Your research papers will be:

- available free of charge to the entire biomedical community
- peer reviewed and published immediately upon acceptance
- cited in PubMed and archived on PubMed Central
- yours — you keep the copyright

Submit your manuscript here:
http://www.biomedcentral.com/info/publishing_adv.asp



Insights in DNA Repair by Homologous Recombination in *Entamoeba histolytica*: *in silico* Characterization of EhMRN Complex

M. López-Casamichana¹, E. Orozco²,
L.A. Marchat³ and C. López-Camarillo^{1*}

¹Posgrado en Ciencias Genómicas, Universidad Autónoma de la Ciudad de México, México, ²Departamento de Patología Experimental, CINVESTAV-IPN, México, ³Programa Institucional de Biomedicina Molecular, Escuela Nacional de Medicina y Homeopatía-IPN, México. *Corresponding autor. genomicas@yahoo.com.mx

Summary

Here, we identified *Entamoeba histolytica* putative genes encoding orthologous proteins to MRE11, RAD50 and NBS1 (MRN complex) which are involved in recombinational DNA repair in both yeast and human. Our *in silico* analysis revealed that EhMRN members conserve the typical molecular architecture of orthologues from other organisms and suggested that this complex could be functional in this parasite.

Introduction

E. histolytica is the early branch protozoan responsible for human amoebiasis that affects 500 million people around the world¹. Differences in virulence of trophozoites have been related to great genome plasticity and it has been speculated that they might be associated to genetic rearrangements mediated by homologous recombination (HR); however no evidence has been provided yet.

In eukaryotic and prokaryotic cells, HR is a fundamental mechanism to recombine the genetic information stored in the sister chromatid or the homologous chromosome to generates genetic diversity². In addition, HR is also required for re-initiation of collapsed replication forks during DNA replication, telomere maintenance and DNA double strand breaks (DSBs) repair.

Particularly, MRN complex (MRE11–RAD50–NBS1 proteins) is one of the first factors that localize at DSBs, having a structural role to tether and stabilize broken chromosomes and to facilitate efficient DNA damage response. The MRE11 and RAD50 proteins are conserved through evolutionary scale, whereas NBS1 appears to be more divergent being only present in eukaryotes³.

The elucidation of *E. histolytica* factors participating in HR could help us to understand the virulence and genetic variability events and the *in silico* study of these factors represents the first approach to understand how these proteins function in this pathogen.

Materials and Methods

Identification of *E. histolytica* MRN complex proteins

Putative gene sequences were identified in *E. histolytica* Pathema databases (http://pathema.tigr.org/tigr-scripts/Entamoeba/PathemaHome_Page.cgi) by BLAST. Orthologous proteins were selected using the following criteria: (i) at least 20% identity and 35% homology to yeast and human query sequences and, (ii) e-value lower than 0.002. Predicted amino acid sequences were aligned by ClustalW software (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>). Functional and structural domains were predicted by Prosite (<http://www.expasy.org/tools/scanprosite/>), Pfam (<http://www.sanger.ac.uk/Software/Pfam/>), SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de/>) and Motif Scan (<http://myhits.isb-sib.ch/cgi-bin/motifscan>) programs.

Results

EhMRE11 molecular organization

E. histolytica *Ehmre11* intronless gene (1788 bp) predicts a 595 aminoacids protein with molecular weight of 68.8 kDa (Table 1). *EhMRE11* protein has a putative nuclease domain constituted by five well conserved amino-terminal metallo-phosphoesterase motifs (9 to 262 aa) (pfam PF00149) followed by an

Table 1. *Entamoeba histolytica* putative MRN complex members.

Putative gene	Locus name ^a	Length (bp)	Predicted protein	Protein size (aa)	Molecular weight (kDa)
<i>Ehmre11</i>	EHI_125910	1 788	<i>EhMRE11</i>	596	68.8
<i>Ehmre11-like</i>	EHI_077650	670	<i>EhMRE11-like</i>	223	25.2
<i>Ehrad50</i>	EHI_079960	3 723	<i>EhRAD50</i>	1241	146.4
<i>Ehnbs1</i>	EHI_098770	2 292	<i>EhNBS1</i>	764	88.9

^a *E. histolytica* Pathema database

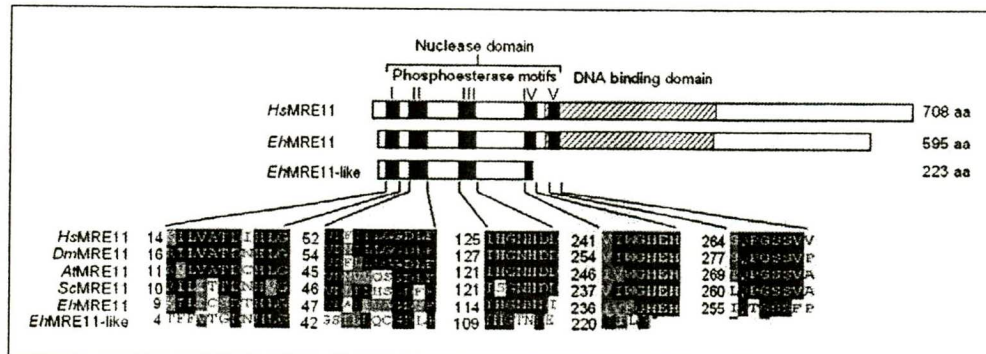


Figure 1. Domain structure and multiple sequence alignments of MRE11 related proteins. EhMRE11 phosphoesterase motifs I-V (■) and DNA-binding domain (▨). Black box, identical amino acid residues; grey box, similar amino acid residues. Numbers at the left are relative to the position of the initial methionine to each protein. *Hs*, *Homo sapiens*; *Dm*, *Drosophila melanogaster*; *At*, *Arabidopsis thaliana* *Sc*, *Sacharomyces cerevisiae*; *Eh*, *Entamoeba histolytica*.

MRE11 DNA-binding domain (pfam PF04152) located from 244 to 446 amino acid residues. This molecular organization appears highly conserved in eukaryotic cells (Fig. 1). Phosphoesterase motifs of HsMRE11 function as single- and double-stranded (ds) DNA endonuclease, as well as 32 –52 dsDNA exonuclease that resects broken dsDNA⁴, this activity increases when MRE11 is in complex with RAD50. Besides, eukaryotic MRE11 C-terminal DNA-binding domain allows MRE11-DNA complexes formation to facilitate DNA joining. Additionally, we identified a 670 bp *Ehmre11-like* gene whose product predicts a smaller (223 aa) MRE11-like protein (Table 1). Amino acids sequence of this protein shares 28% identity and 54% homology (e-value 1.2e-45) respect to EhMRE11. Intriguingly, EhMRE11-like protein only has the first four of five metallo-phosphoesterase motifs and lacks the DNA binding domain. This finding suggests that MRN complex could be constituted by two different MRE11-like proteins in this parasite (Fig. 1).

EhRAD50 molecular organization

In *E. histolytica* the putative *Ehrad50* intronless gene (3723 bp) predicts a polypeptide of 146.4 kDa (Table 1). EhRAD50 amino acids sequence contains the Walker A and B motifs of the ABC-ATPase domains, separated by two coiled-coil regions, which are required for nucleotide binding and hydrolysis in human RAD50-ATPase (Fig. 2). EhRAD50 also contains the highly conserved zinc-hook structure including the CysXXCys motif located in the middle of the long coiled-coil domains, as it has been described in HsRAD50.

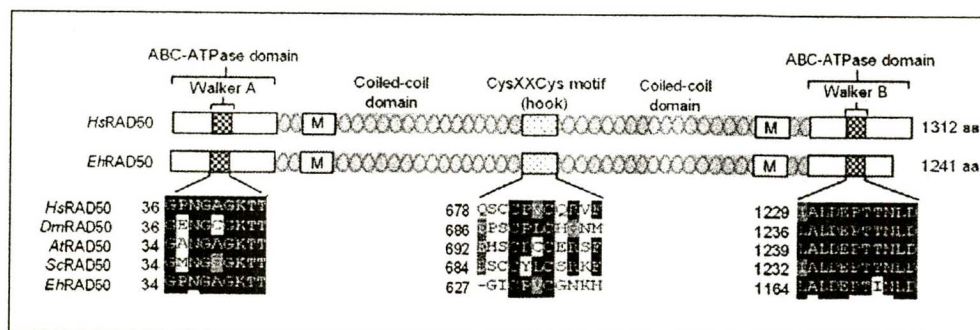


Figure 2. Domain structure and multiple sequence alignments of the central portion of the RAD50 related proteins. The Walker A and B are marked in the ABC-ATPase domains (☒), while MRE11-binding sites (M) and the CysXXCys hook domain (☐) are labeled in the coiled-coil central regions. Black box, identical amino acid residues; grey box similar amino acid residues. Numbers are relative to the position of the initial methionine in each protein. *Hs*, *H. sapiens*; *Dm*, *D. melanogaster*; *At*, *A. thaliana* *Sc*, *S. cerevisiae*; *Eh*, *E. histolytica*.

This motif is required as a dimerization domain between two RAD50 arms and for intramolecular interactions with MRE11, which results in the tethering of broken DNA ends.

EhNBS1 molecular organization

In eukaryotic cells, but not in bacteria, the MRE11 and RAD50 proteins interact with nibrin polypeptide (NBS1), which is considered as the functional analogue of yeast XRS2 protein, although significant sequence similarity is limited to the first 115 amino acid residues of the N-terminal. Human NBS1 is required for activation of ATM kinase in response to DSBs and it also functions in an amplification loop with ATM to allow an effective checkpoint response. In *E. histolytica* the putative *Ehnbs1* gene (2292 bp) predicts a 88.9 kDa protein (Table 1). Similar to eukaryotic NBS1 proteins, EhNBS1 N-terminal contains a fork-head associated (FHA) domain from 22 to 99 residue (pfam PF00498), which is a phosphopeptide recognition domain, and a BRCA1 C-terminal (BRCT) domain (pfam PF00533), that is important to protein-protein interactions (Fig. 3).

Conclusions

In an effort to understand the DNA damage response in *E. histolytica*, we studied the structural features of EhMRN complex members. Our findings revealed that EhMRE11, EhRAD50 and EhNBS1 conserve the typical struc-

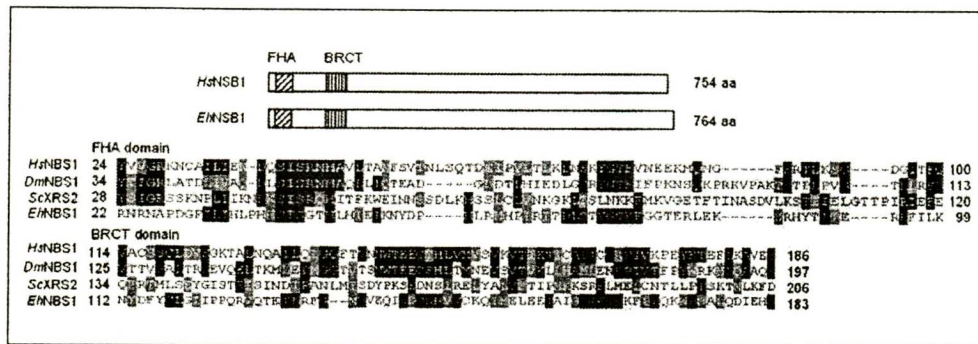


Figure 3. Domain structure and multiple sequence alignments of NBS1 related proteins. EhNBS1 N-terminal fork-head associated (FHA) domain (▨) and BRCA1 C-terminal (BRCT)-like domain (▩). Black box, identical amino acid residues; grey box similar amino acid residues. Numbers are relative to the position of the initial methionine in each protein. *Hs*, *H. sapiens*; *Dm*, *D. melanogaster*; *Sc*, *S. cerevisiae*; *Eh*, *E. histolytica*.

tural and functional domains reported in orthologous proteins from other organisms. The presence of an additional homologue to *mre11* gene (*Ehmre11-like*) suggests that this pathogen could express two MRE11 proteins, which possibly will interact to RAD50. In addition, *E. histolytica* MRN members are evolutionary conserved, suggesting that they could mediate the cellular response to broken chromosomes. Enzymatic activity assays, protein-protein interactions and immunolocation of EhMRN proteins after DSBs must be consequently evaluated, in order to demonstrate their functional role as a specific sensor of genome damage in this parasite.

References

- 1 T. JACKSON, *et al.*, "A comparison of cross-sectional and longitudinal seroepidemiological assessments of entamoeba-infected populations in South Africa," Arch. Med. Res. 31(4 Suppl), S36-S37 (2000).
- 2 J. Y. MASSON, *et al.*, "Identification and purification of two distinct complexes containing the five RAD51 paralogs" Genes Dev. 15(24), 3296 (2001).
- 3 VAN DEN BOSCH M., *et al.* "The MRN complex: coordinating and mediating the response to broken chromosomes", EMBO Rep. 4(9), 844 (2003).
- 4 D. D'AMOURS and S. P. JACKSON, "The Mre11 complex: at the crossroads of DNA repair and checkpoint signaling" Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 3(5), 317 (2002).

VIII. BIBLIOGRAFÍA

- Ariza,A., Richard,D.J., White,M.F., y Bond,C.S. (2005) Conformational flexibility revealed by the crystal structure of a crenarchaeal RadA. *Nucleic Acids Res* **33**: 1465-1473.
- Ausubel,F.M., Brent,R., Moore.D.D, Kingston,R.E., Seidman,J.G., Smith,J.A., and Struhl,K. (1994) *Current Protocols in Molecular Biology* EUA.
- Baez-Camargo,M., Gharaibeh,R., Riveron,A.M., de la Cruz,H.F., Luna,J.P., Gariglio,P. y cols. (1996) Gene amplification in *Entamoeba histolytica*. *Invasion Metastasis* **16**: 269-279.
- Bakhshi,A., Jensen,J.P., Goldman,P., Wright,J.J., McBride,O.W., Epstein,A.L., y Korsmeyer,S.J. (1985) Cloning the chromosomal breakpoint of t(14;18) human lymphomas: clustering around JH on chromosome 14 and near a transcriptional unit on 18. *Cell* **41**: 899-906.
- Banuelos,C., Garcia-Rivera,G., Lopez-Reyes,I., y Orozco,E. (2005) Functional characterization of EhADH112: an *Entamoeba histolytica* Bro1 domain-containing protein. *Exp Parasitol* **110**: 292-297.
- Basile,G., Aker,M., y Mortimer,R.K. (1992) Nucleotide sequence and transcriptional regulation of the yeast recombinational repair gene RAD51. *Mol Cell Biol* **12**: 3235-3246.
- Baumann,P., y West,S.C. (1998) Role of the human RAD51 protein in homologous recombination and double-stranded-break repair. *Trends Biochem Sci* **23**: 247-251.
- Bhattacharyya,A., Ear,U.S., Koller,B.H., Weichselbaum,R.R., y Bishop,D.K. (2000) The breast cancer susceptibility gene BRCA1 is required for subnuclear assembly of Rad51 and survival following treatment with the DNA cross-linking agent cisplatin. *J Biol Chem* **275**: 23899-23903.
- Bhattacharyya,M.K., Norris,D.E., y Kumar,N. (2004) Molecular players of homologous recombination in protozoan parasites: implications for generating antigenic variation. *Infect Genet Evol* **4**: 91-98.
- Birrell,G.W., Brown,J.A., Wu,H.I., Giaever,G., Chu,A.M., Davis,R.W., y Brown,J.M. (2002) Transcriptional response of *Saccharomyces cerevisiae* to DNA-damaging agents does not identify the genes that protect against these agents. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**: 8778-8783.
- Bishop,D.K., Park,D., Xu,L., y Kleckner,N. (1992) DMC1: a meiosis-specific yeast homolog of *E. coli* recA required for recombination, synaptonemal complex formation, and cell cycle progression. *Cell* **69**: 439-456.

Bracha R,M.D (1984) Virulence of *Entamoeba histolytica* trophozoites. Effects of bacteria, microaerobic conditions, and metronidazole. Cell signalling and motility in *Entamoeba histolytica*. *J Exp Med.* **160**: 353-368.

Bradford, MM. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* **72**: 248-254

Braybrooke,J.P., Li,J.L., Wu,L., Caple,F., Benson,F.E., y Hickson,I.D. (2003) Functional interaction between the Bloom's syndrome helicase and the RAD51 paralog, RAD51L3 (RAD51D). *J Biol Chem* **278**: 48357-48366.

Caballero-Salcedo,A., Viveros-Rogel,M., Salvatierra,B., Tapia-Conyer,R., Sepulveda-Amor,J., Gutierrez,G., y Ortiz-Ortiz,L. (1994) Seroepidemiology of amebiasis in Mexico. *Am J Trop Med Hyg* **50**: 412-419.

Campbell,C., y Romero,D.P. (1998) Identification and characterization of the RAD51 gene from the ciliate *Tetrahymena thermophila*. *Nucleic Acids Res* **26**: 3165-3172.

Cartwright,R., Dunn,A.M., Simpson,P.J., Tambini,C.E., y Thacker,J. (1998) Isolation of novel human and mouse genes of the recA/RAD51 recombination-repair gene family. *Nucleic Acids Res* **26**: 1653-1659.

Chavez-Munguia,B., Espinosa-Cantellano,M., Castanon,G., y Martinez-Palomo,A. (2000) Ultrastructural evidence of smooth endoplasmic reticulum and golgi-like elements in *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar*. *Arch Med Res* **31**: S165-S167.

Chen,G., Yuan,S.S., Liu,W., Xu,Y., Trujillo,K., Song,B. y cols. (1999) Radiation-induced assembly of Rad51 and Rad52 recombination complex requires ATM and c-Abl. *J Biol Chem* **274**: 12748-12752.

Chen,H.T., Bhandoola,A., Difilippantonio,M.J., Zhu,J., Brown,M.J., Tai,X. y cols. (2000a) Response to RAG-mediated VDJ cleavage by NBS1 and gamma-H2AX. *Science* **290**: 1962-1965.

Cinfuentes,E., Blumenthal,U., Rúa-Palacios,G., Bennett,S., y and Peassey,A. (1994) Ambiente epidemiológico del uso de aguas negras en agricultura: Valle del Mezquital. *Salud Pública*: 3-9.

Clark,C.G., y Roger,A.J. (1995) Direct evidence for secondary loss of mitochondria in *Entamoeba histolytica*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**: 6518-6521.

- Clever,B., Interthal,H., Schmuckli-Maurer,J., King,J., Sigrist,M., y Heyer,W.D. (1997) Recombinational repair in yeast: functional interactions between Rad51 and Rad54 proteins. *EMBO J* **16**: 2535-2544.
- Conde-Bonfil,M.C., y Mora-Zerpa,C. (1992) [Entamoeba histolytica: a standing threat]. *Salud Publica Mex* **34**: 335-341.
- Conway,C., Proudfoot,C., Burton,P., Barry,J.D., y McCulloch,R. (2002) Two pathways of homologous recombination in Trypanosoma brucei. *Mol Microbiol* **45**: 1687-1700.
- Cook,G.C. (1990) Parasitic disease in clinical practice Cell signalling and motility in Entamoeba histolytica London: London G.B., pp. 103-112.
- Davies,A.A., Masson,J.Y., McIlwraith,M.J., Stasiak,A.Z., Stasiak,A., Venkitaraman,A.R., y West,S.C. (2001) Role of BRCA2 in control of the RAD51 recombination and DNA repair protein. *Mol Cell* **7**: 273-282.
- Delacote,F., y Lopez,B.S. (2008) Importance of the cell cycle phase for the choice of the appropriate DSB repair pathway, for genome stability maintenance: the trans-S double-strand break repair model. *Cell Cycle* **7**: 33-38.
- Diamond,L.S., Harlow,D.R., y Cunnick,C.C. (1978) A new medium for the axenic cultivation of Entamoeba histolytica and other Entamoeba. *Trans R Soc Trop Med Hyg* **72**: 431-432.
- Dzikowski,R., y Deitsch,K. (2006) Antigenic variation by protozoan parasites: insights from Babesia bovis. *Mol Microbiol* **59**: 364-366.
- Edman, U., Meza, I. and Agobian, N. (1987). Genomic and cDNA actin sequences from a virulent strain of *Entamoeba histolytica*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 84(9):3024-3028
- Espinosa-Cantellano,M., y Martinez-Palomo,A. (2000) Recent developments in amoebiasis research. *Curr Opin Infect Dis* **13**: 451-456.
- Esteve,I., y Gaju,N. (1999) Bacterial symbioses. Predation and mutually beneficial associations. *Int Microbiol* **2**: 81-86.
- Game,J.C. (1993) DNA double-strand breaks and the RAD50-RAD57 genes in Saccharomyces. *Semin Cancer Biol* **4**: 73-83.
- García-Vivas J, López-Camarillo C, Azuara-Liceaga E, Orozco E, Marchat LA. (2005).Entamoeba histolytica: cloning and expression of the poly(A) polymerase EhPAP. *Exp Parasitol* **3**:226-32.

Garinis,G.A., Mitchell,J.R., Moorhouse,M.J., Hanada,K., de,W.H., Vandeputte,D. y cols. (2005) Transcriptome analysis reveals cyclobutane pyrimidine dimers as a major source of UV-induced DNA breaks. *EMBO J* **24**: 3952-3962.

Ghosh,S.K., Field,J., Frisardi,M., Rosenthal,B., Mai,Z., Rogers,R., y Samuelson,J. (1999) Chitinase secretion by encysting *Entamoeba invadens* and transfected *Entamoeba histolytica* trophozoites: localization of secretory vesicles, endoplasmic reticulum, and Golgi apparatus. *Infect Immun* **67**: 3073-3081.

Haaf,T., Golub,E.I., Reddy,G., Radding,C.M., y Ward,D.C. (1995) Nuclear foci of mammalian Rad51 recombination protein in somatic cells after DNA damage and its localization in synaptonemal complexes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**: 2298-2302.

He,A.S., Rohatgi,P.R., Hersh,M.N., y Rosenberg,S.M. (2006) Roles of *E. coli* double-strand-break-repair proteins in stress-induced mutation. *DNA Repair (Amst)* **5**: 258-273.

Holliday,R. (1964) the induction of mitotic recombination by mitomycin c in ustilago and saccharomyces. *genetics* **50**: 323-335.

Huang,Y., Yuan,Z.M., Ishiko,T., Nakada,S., Utsugisawa,T., Kato,T. y cols. (1997) Pro-apoptotic effect of the c-Abl tyrosine kinase in the cellular response to 1-beta-D-arabinofuranosylcytosine. *Oncogene* **15**: 1947-1952.

Kant,C.R., Rao,B.J., y Sainis,J.K. (2005) DNA binding and pairing activity of OsDmc1, a recombinase from rice. *Plant Mol Biol* **57**: 1-11.

Kharbanda,S., Yuan,Z.M., Weichselbaum,R., y Kufe,D. (1997) Functional role for the c-Abl protein tyrosine kinase in the cellular response to genotoxic stress. *Biochim Biophys Acta* **1333**: O1-O7.

Kinebuchi,T., Kagawa,W., Enomoto,R., Tanaka,K., Miyagawa,K., Shibata,T. y cols. (2004) Structural basis for octameric ring formation and DNA interaction of the human homologous-pairing protein Dmc1. *Mol Cell* **14**: 363-374.

Komori,K., Miyata,T., Daiyasu,H., Toh,H., Shinagawa,H., y Ishino,Y. (2000a) Domain analysis of an archaeal RadA protein for the strand exchange activity. *J Biol Chem* **275**: 33791-33797.

Komori,K., Miyata,T., DiRuggiero,J., Holley-Shanks,R., Hayashi,I., Cann,I.K. y cols. (2000b) Both RadA and RadB are involved in homologous recombination in *Pyrococcus furiosus*. *J Biol Chem* **275**: 33782-33790.

Kovalenko,O.V., Plug,A.W., Haaf,T., Gonda,D.K., Ashley,T., Ward,D.C. y cols. (1996) Mammalian ubiquitin-conjugating enzyme Ubc9 interacts with Rad51

recombination protein and localizes in synaptonemal complexes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**: 2958-2963.

Krejci,L., Chen,L., Van,K.S., Sung,P., y Tomkinson,A. (2003) Mending the break: two DNA double-strand break repair machines in eukaryotes. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* **74**: 159-201.

Levine,N.D., Corliss,J.O., Cox,F.E., Deroux,G., Grain,J., Honigberg,B.M. y cols. (1980) A newly revised classification of the protozoa. *J Protozool* **27**: 37-58.

Li,W., Hesabi,B., Babbo,A., Pacione,C., Liu,J., Chen,D.J. y cols. (2000) Regulation of double-strand break-induced mammalian homologous recombination by UBL1, a RAD51-interacting protein. *Nucleic Acids Res* **28**: 1145-1153.

Lim,D.S., y Hasty,P. (1996) A mutation in mouse rad51 results in an early embryonic lethal that is suppressed by a mutation in p53. *Mol Cell Biol* **16**: 7133-7143.

Liu,N., Lamerdin,J.E., Tebbs,R.S., Schild,D., Tucker,J.D., Shen,M.R. y cols. (1998) XRCC2 and XRCC3, new human Rad51-family members, promote chromosome stability and protect against DNA cross-links and other damages. *Mol Cell* **1**: 783-793.

Liu,Y., Tarsounas,M., O'regan,P., y West,S.C. (2007) Role of RAD51C and XRCC3 in genetic recombination and DNA repair. *J Biol Chem* **282**: 1973-1979.

Llorente,B., y Symington,L.S. (2004) The Mre11 nuclease is not required for 5' to 3' resection at multiple HO-induced double-strand breaks. *Mol Cell Biol* **24**: 9682-9694.

Loftus,B., Anderson,I., Davies,R., Alsmark,U.C., Samuelson,J., Amedeo,P. y cols. (2005) The genome of the protist parasite *Entamoeba histolytica*. *Nature* **433**: 865-868.

Longhese,M.P., Mantiero,D., y Clerici,M. (2006) The cellular response to chromosome breakage. *Mol Microbiol* **60**: 1099-1108.

Lopez-Camarillo,C., Luna-Arias,J.P., Marchat,L.A., y Orozco,E. (2003) EhPgp5 mRNA stability is a regulatory event in the *Entamoeba histolytica* multidrug resistance phenotype. *J Biol Chem* **278**: 11273-11280.

Lopez-Revilla,R., y Baez-Camargo,M. (1992) Immediate autoproteolysis and new proteinases in *Entamoeba invadens* and *Entamoeba moshkovskii* trophozoites. *Arch Med Res* **23**: 95-97.

Marion,S., y Guillen,N. (2006) Genomic and proteomic approaches highlight phagocytosis of living and apoptotic human cells by the parasite *Entamoeba histolytica*. *Int J Parasitol* **36**: 131-139.

Marmorstein,L.Y., Ouchi,T., y Aaronson,S.A. (1998) The BRCA2 gene product functionally interacts with p53 and RAD51. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**: 13869-13874.

McCready,S. (2005) An immunoassay for measuring repair of ultraviolet photoproducts. *Methods Mol Biol* **291**: 337-349.

McCulloch,R., y Barry,J.D. (1999) A role for RAD51 and homologous recombination in *Trypanosoma brucei* antigenic variation. *Genes Dev* **13**: 2875-2888.

Mendoza,L., Orozco,E., Rodriguez,M.A., Garcia-Rivera,G., Sanchez,T., Garcia,E., y Gariglio,P. (2003) Ehp53, an *Entamoeba histolytica* protein, ancestor of the mammalian tumour suppressor p53. *Microbiology* **149**: 885-893.

Mirelman D,K.D. Adhesion properties of *Entamoeba histolytica*.Cell signalling and motility in *Entamoeba histolytica*. Ciba Found Symp. 80, 17-35. 1981.

Muñoz,M.L., Moreno,M.A., Perez-Garcia,J.N., Tovar,G.R., y Hernandez,V.I. (1991) Possible role of calmodulin in the secretion of *Entamoeba histolytica* electron-dense granules containing collagenase. Cell signalling and motility in *Entamoeba histolytica*. *Mol Microbiol* **5**: 1707-1714.

Neff,N.F., Ellis,N.A., Ye,T.Z., Noonan,J., Huang,K., Sanz,M., y Proytcheva,M. (1999) The DNA helicase activity of BLM is necessary for the correction of the genomic instability of bloom syndrome cells. *Mol Biol Cell* **10**: 665-676.

Orozco E. (1981). Virulencia y propiedades de superficie de *Entamoeba histolytica*. Departamento de Biología Celular del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN.

Orozco,E., de la Cruz,H.F., y Rodriguez,M.A. (1985a) Isolation and characterization of *Entamoeba histolytica* mutants resistant to emetine. *Mol Biochem Parasitol* **15**: 49-59.

Orozco,E., Suarez,M.E., y Sanchez,T. (1985b) Differences in adhesion, phagocytosis and virulence of clones from *Entamoeba histolytica*, strain HM1:IMSS. *Int J Parasitol* **15**: 655-660.

Orozco E, Solís FJ, Domínguez J, Chávez B, Hernández F. (1988) *Entamoeba histolytica*: cell cycle and nuclear division. *Exp Parasitol*; **67**(1):85-95.

Passy,S.I., Yu,X., Li,Z., Radding,C.M., Masson,J.Y., West,S.C., y Egelman,E.H. (1999) Human Dmc1 protein binds DNA as an octameric ring. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**: 10684-10688.

Pérez-Tamayo,R. (1989) Patología de la amibiasis. Cell signalling and motility in *Entamoeba histolytica*, pp. 42-45.

Petri,W.A., Jr. (2000) Protozoan parasites that infect the gastrointestinal tract. *Curr Opin Gastroenterol* **16**: 18-23.

Petukhova,G., Sung,P., y Klein,H. (2000) Promotion of Rad51-dependent D-loop formation by yeast recombination factor Rdh54/Tid1. *Genes Dev* **14**: 2206-2215.

Pittman,D.L., Cobb,J., Schimenti,K.J., Wilson,L.A., Cooper,D.M., Brignull,E. y cols. (1998a) Meiotic prophase arrest with failure of chromosome synapsis in mice deficient for Dmc1, a germline-specific RecA homolog. *Mol Cell* **1**: 697-705.

Pittman,D.L., Weinberg,L.R., y Schimenti,J.C. (1998b) Identification, characterization, and genetic mapping of Rad51d, a new mouse and human RAD51/RecA-related gene. *Genomics* **49**: 103-111.

Qian,X., He,Y., Ma,X., Fodje,M.N., Grochulski,P., y Luo,Y. (2006) Calcium stiffens archaeal Rad51 recombinase from *Methanococcus voltae* for homologous recombination. *J Biol Chem* **281**: 39380-39387.

Qian,X., Wu,Y., He,Y., y Luo,Y. (2005) Crystal structure of *Methanococcus voltae* RadA in complex with ADP: hydrolysis-induced conformational change. *Biochemistry* **44**: 13753-13761.

Ravdin,JI. (2000) Amebiasis Londres: Imperial College Press.

Saintigny,Y., Dumay,A., Lambert,S., y Lopez,B.S. (2001) A novel role for the Bcl-2 protein family: specific suppression of the RAD51 recombination pathway. *EMBO J* **20**: 2596-2607.

Saitou,N., y Nei,M. (1987) The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* **4**: 406-425.

Sambrook, J., Fritsch, E. and Maniatis, T. 1989. Molecular cloning: A laboratory manual, 2nd edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY.

- Scully,R., Chen,J., Plug,A., Xiao,Y., Weaver,D., Feunteun,J. y cols. (1997) Association of BRCA1 with Rad51 in mitotic and meiotic cells. *Cell* **88**: 265-275.
- Sengupta,S., Linke,S.P., Pedeux,R., Yang,Q., Farnsworth,J., Garfield,S.H. y cols. (2003) BLM helicase-dependent transport of p53 to sites of stalled DNA replication forks modulates homologous recombination. *EMBO J* **22**: 1210-1222.
- Shangary,S., Brown,K.D., Adamson,A.W., Edmonson,S., Ng,B., Pandita,T.K. y cols. (2000) Regulation of DNA-dependent protein kinase activity by ionizing radiation-activated abl kinase is an ATM-dependent process. *J Biol Chem* **275**: 30163-30168.
- Shen,Z., Pardington-Purtymun,P.E., Comeaux,J.C., Moyzis,R.K., y Chen,D.J. (1996) UBL1, a human ubiquitin-like protein associating with human RAD51/RAD52 proteins. *Genomics* **36**: 271-279.
- Shin,D.S., Pellegrini,L., Daniels,D.S., Yelent,B., Craig,L., Bates,D. y cols. (2003) Full-length archaeal Rad51 structure and mutants: mechanisms for RAD51 assembly and control by BRCA2. *EMBO J* **22**: 4566-4576.
- Shinohara,A., Ogawa,H., Matsuda,Y., Ushio,N., Ikeo,K., y Ogawa,T. (1993) Cloning of human, mouse and fission yeast recombination genes homologous to RAD51 and recA. *Nat Genet* **4**: 239-243.
- Shinohara,A., Shinohara,M., Ohta,T., Matsuda,S., y Ogawa,T. (1998) Rad52 forms ring structures and co-operates with RPA in single-strand DNA annealing. *Genes Cells* **3**: 145-156.
- Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica. Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica. 2005.
- Slupianek,A., Schmutte,C., Tomblin,G., Nieborowska-Skorska,M., Hoser,G., Nowicki,M.O. y cols. (2001) BCR/ABL regulates mammalian RecA homologs, resulting in drug resistance. *Mol Cell* **8**: 795-806.
- Sonoda,E., Sasaki,M.S., Buerstedde,J.M., Bezzubova,O., Shinohara,A., Ogawa,H. y cols. (1998) Rad51-deficient vertebrate cells accumulate chromosomal breaks prior to cell death. *EMBO J* **17**: 598-608.
- Sullivan,W.J., Jr., Naguleswaran,A., y Angel,S.O. (2006) Histones and histone modifications in protozoan parasites. *Cell Microbiol* **8**: 1850-1861.
- Sung,P. (1997) Yeast Rad55 and Rad57 proteins form a heterodimer that functions with replication protein A to promote DNA strand exchange by Rad51 recombinase. *Genes Dev* **11**: 1111-1121.

Sung,P., Trujillo,K.M., y Van,K.S. (2000) Recombination factors of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mutat Res* **451**: 257-275.

Susse,S., Janz,C., Janus,F., Deppert,W., y Wiesmuller,L. (2000) Role of heteroduplex joints in the functional interactions between human Rad51 and wild-type p53. *Oncogene* **19**: 4500-4512.

Symington,L.S. (2002) Role of RAD52 epistasis group genes in homologous recombination and double-strand break repair. *Microbiol Mol Biol Rev* **66**: 630-700.

Tambini,C.E., George,A.M., Rommens,J.M., Tsui,L.C., Scherer,S.W., y Thacker,J. (1997) The XRCC2 DNA repair gene: identification of a positional candidate. *Genomics* **41**: 84-92.

Tanyuksel,M., y Petri,W.A., Jr. (2003) Laboratory diagnosis of amebiasis. *Clin Microbiol Rev* **16**: 713-729.

Thacker,J. (2005) The RAD51 gene family, genetic instability and cancer. *Cancer Lett* **219**: 125-135.

Tomblin,G., Shim,K.S., y Fishel,R. (2002) Biochemical characterization of the human RAD51 protein. II. Adenosine nucleotide binding and competition. *J Biol Chem* **277**: 14426-14433.

Triglia,T., Foote,S.J., Kemp,D.J., y Cowman,A.F. (1991) Amplification of the multidrug resistance gene *pfmdr1* in *Plasmodium falciparum* has arisen as multiple independent events. *Mol Cell Biol* **11**: 5244-5250.

WHO (1997). World Health Organization.

Woods,W.G., y Dyll-Smith,M.L. (1997) Construction and analysis of a recombination-deficient (*radA*) mutant of *Haloferax volcanii*. *Mol Microbiol* **23**: 791-797.

Wu,Y., Qian,X., He,Y., Moya,I.A., y Luo,Y. (2005) Crystal structure of an ATPase-active form of Rad51 homolog from *Methanococcus voltae*. Insights into potassium dependence. *J Biol Chem* **280**: 722-728.

www.dpd.cdc.gov. Centers for Disease Control (CDC), Laboratory Identification of Parasites of Public Health. 2006.

Yang,S., Yu,X., Seitz,E.M., Kowalczykowski,S.C., y Egelman,E.H. (2001) Archaeal RadA protein binds DNA as both helical filaments and octameric rings. *J Mol Biol* **314**: 1077-1085.

BIBLIOGRAFÍA

López-Casamichana M.

Posgrado en Ciencias Genómicas- UACM

Yoshida,K., Kondoh,G., Matsuda,Y., Habu,T., Nishimune,Y., y Morita,T. (1998) The mouse RecA-like gene Dmc1 is required for homologous chromosome synapsis during meiosis. *Mol Cell* **1**: 707-718.

Yuan,Z.M., Utsugisawa,T., Ishiko,T., Nakada,S., Huang,Y., Kharbanda,S. y cols. (1998) Activation of protein kinase C delta by the c-Abl tyrosine kinase in response to ionizing radiation. *Oncogene* **16**: 1643-1648.

Zaki,M., y Clark,C.G. (2000) Polymorphic DNA markers in *Entamoeba histolytica*. *Arch Med Res* **31**: S255-S257.

Zhong,Q., Chen,C.F., Li,S., Chen,Y., Wang,C.C., Xiao,J. y cols. (1999) Association of BRCA1 with the hRad50-hMre11-p95 complex and the DNA damage response. *Science* **285**: 747-750.

Zhu,X.D., Kuster,B., Mann,M., Petrini,J.H., y de,L.T. (2000) Cell-cycle-regulated association of RAD50/MRE11/NBS1 with TRF2 and human telomeres. *Nat Genet* **25**: 347-352.

Pedro Ahumada



TESIS URGENTES

REP. DE CUBA No. 99 DESP. 23-A
CENTRO HISTORICO MEXICO, D.F.

TEL. 5512-8469
PART. 2619-0742

PRESUPUESTOS DE 9:30 A 7:00 P.M.
SABADOS DE 9:30 A.M. A 3:00 P.M.