



INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL  
ESCUELA NACIONAL DE MEDICINA Y HOMEOPATIA  
SECCION DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACION



**Caracterización estructural del promotor del gen *Ehrad54* y análisis de la expresión y localización celular de la proteína EhRad54 de *Entamoeba histolytica* en respuesta al daño al DNA.**

**TESIS**

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRA EN CIENCIAS EN BIOMEDICINA  
MOLECULAR

PRESENTA:

**Lorena García Morales**

Directores

Dra. Laurence A. Marchat M.  
Dr. Mario César López Camarillo.

México, D.F., 2008



**INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**  
**SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO**

SIP-14

*ACTA DE REVISIÓN DE TESIS*

En la Ciudad de México siendo las 12:00 horas del día 27 del mes de noviembre del 2008 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de Tesis designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de la ENMyH-IPN para examinar la tesis de titulada:

Caracterización estructural del promotor del gen *Ehrad54* y análisis de la expresión y localización celular de la proteína EhRAD54 de *Entamoeba histolytica* en respuesta al daño al DNA

Presentada por el alumno:

|                  |                  |                             |  |  |  |  |  |
|------------------|------------------|-----------------------------|--|--|--|--|--|
| García           | Morales          | Lorena                      |  |  |  |  |  |
| Apellido paterno | Apellido materno | Nombre(s)                   |  |  |  |  |  |
|                  |                  | Con registro: B 0 6 1 5 7 7 |  |  |  |  |  |

aspirante al grado de:

Maestro en Ciencias en Biomedicina Molecular

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron **SU APROBACIÓN DE LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

**LA COMISIÓN REVISORA**

Director de tesis

Dra. Laurence A. Marchat M.

Dra. Esther Ramirez Moreno

Dr. Juan Salas Benito

Director de tesis

Dr. Mario César Lopez Camarillo

Dra. Mavil Lopez Casamichana

EL PRESIDENTE DEL COLEGIO

Dr. Guillermo Pérez Ishwara

SECRETARÍA DE EDUCACIÓN PÚBLICA  
 INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL  
 SECCIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO Y HOMEOPATÍA  
 Y HOMEOPATÍA  
 SECCION DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACION



**INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**  
**SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO**

**CARTA CESIÓN DE DERECHOS**

En la Ciudad de **México** el día **28** del mes **Noviembre** del año **2008**, el (la) que suscribe **Lorena García Morales** alumno (a) del Programa de **Maestría en Ciencias en Biomedicina Molecular** con número de registro **B061577**, adscrito a la **Escuela Nacional de Medicina y Homeopatía**, manifiesta que es autor (a) intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección de la Dra. Laurence A. Marchat y cede los derechos del trabajo intitulado **Caracterización estructural del promotor del gen *Ehrad54* y análisis de la expresión y localización celular de la proteína EhRAD54 de *Entamoeba histolytica* en respuesta al daño al DNA**, al Instituto Politécnico Nacional para su difusión, con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del autor y/o director del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a la siguiente dirección **dralorena\_garcia@yahoo.com.mx**. Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

Lorena García Morales  
Nombre y firma

Este trabajo fue realizado en el laboratorio de Biomedicina Molecular 2 de la Sección de Estudios de Posgrado e Investigación de la Escuela Nacional de Medicina y Homeopatía (ENMyH), bajo la dirección de la Dra. Laurence A. Marchat Marchau, Investigadora titular del programa de Biomedicina Molecular de la Sección de Estudios de Posgrado e Investigación de la Escuela Nacional de Medicina y Homeopatía del Instituto Politécnico Nacional (IPN); y en el laboratorio 2 del Posgrado en Ciencias Genómicas de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México (UACM), bajo la co-dirección del Dr. Mario César López Camarillo, Investigador titular del programa de Investigación Genómica de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México.

Este proyecto forma parte del proyecto CONACYT # 54085.

Durante la realización de este proyecto se contó con el financiamiento del Instituto de Ciencia y Tecnología del Distrito Federal (ICyT DF - 426) mediante el programa "CREACION JOVEN", así como del apoyo económico del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) y del Programa Institucional de Formación de Investigadores (PIFI) del Instituto Politécnico Nacional.

# ÍNDICE

| TEMA   | PAGINA |
|--|--------|
| <b>Lista de abreviaturas</b>   | I      |
| <b>Índice de figuras</b>   | IV     |
| <b>Índice de tablas</b>  | VII    |
| <b>Resumen</b>   | VIII   |
| <b>Abstract</b>  | IX     |
| <b>Introducción</b>  | 1      |
| Recombinación Homóloga (RH) y Variabilidad genética                                  | 1      |
| Recombinación Homóloga y Reparación de ADN   | 1      |
| Ruptura de doble cadena (DSB)  | 3      |
| Mecanismo molecular de reparación de DSB por RH                                      | 4      |
| Proteína RAD54   | 8      |
| Recombinación Homóloga en parásitos protozoarios                                     | 13     |
| <b>Antecedentes</b>  | 14     |
| <i>Entamoeba histolytica</i>   | 14     |
| Amibiasis  | 17     |
| Recombinación Homóloga en <i>Entamoeba histolytica</i>                               | 19     |
| <b>Justificación</b>   | 22     |
| <b>Objetivos</b>   | 23     |
| <b>Estrategia Experimental</b>   | 24     |
| <b>Metodología</b>   | 25     |
| Análisis de promotores   | 25     |
| Análisis <i>in silico</i> de la secuencia de aa de EhRAD54                           | 26     |
| Diseño de un péptido antigénico sintético  | 27     |
| Inmunización de ratones Balb-C para obtener anticuerpos<br>específicos               | 28     |
| Amplificación por PCR de un fragmento del gen <i>Ehrad54</i>                         | 29     |
| Clonación en el vector pTZ57R/T  | 30     |
| Subclonación y ligación del fragmento del gen <i>Ehrad54</i> en el<br>vector pGEX6p1 | 33     |

|  |     |
|--|-----|
| Preparación de bacterias competentes                           | 35  |
| Bacterias competentes congeladas                               | 35  |
| Bacterias competentes frescas                                  | 36  |
| Transformación de bacterias competentes por choque térmico     | 37  |
| Minipreparación de ADN plasmídico                              | 37  |
| Purificación de ADN plasmídico                                 | 38  |
| Restricción enzimática y purificación de ADN                   | 38  |
| Electroforesis de ADN en geles de agarosa                      | 39  |
| Maxipreparación de ADN plasmídico                              | 40  |
| Inducción de la expresión del polipéptido recombinante EhRAD54 | 41  |
| Cultivo de trofozoitos y su irradiación con luz UV             | 42  |
| Obtención de extractos nucleares y citoplásmicos               | 42  |
| Ensayo de Western Blot   | 43  |
| Ensayos de Dot Blot  | 45  |
| <b>Resultados</b>  | 46  |
| Identificación de secuencias promotoras conservadas            | 46  |
| Análisis in silico de la proteína EhRAD54                      | 55  |
| Análisis filogenético de la proteína EhRAD54                   | 64  |
| Análisis estructural de la proteína EhRAD54                    | 66  |
| Diseño de un péptido antigénico sintético de 15 residuos       | 77  |
| Obtención de anticuerpos específicos anti- PAS EhRAD54         | 81  |
| Obtención del polipéptido recombinante EhRAD54                 | 84  |
| Inmunodetección del polipéptido recombinante EhRAD54           | 91  |
| Inmunodetección de la proteína EhRAD54 endógena                | 96  |
| <b>Discusión</b>   | 99  |
| <b>Conclusiones</b>  | 105 |
| <b>Perspectivas</b>  | 106 |
| <b>Referencias</b>   | 107 |



# LISTA DE ABREVIATURAS

| <b>ABREVIATURA</b> | <b>SIGNIFICADO</b>                                   |
|--------------------|--|
| A                  | Adenina  |
| aa                 | Aminoácido   |
| ADN                | Ácido desoxirribonucleico                            |
| ATPasa             | Enzima que hidroliza el ATP                          |
| BLAST              | Alineamiento de secuencia tipo local                 |
| BSA                | Albúmina de suero bovina                             |
| C                  | Citosina   |
| C-terminal         | Extremo carboxilo                                    |
| D.O.               | Densidad óptica                                      |
| DNAsa              | Enzima que degrada DNA                               |
| dNTPs              | Deoxinucleótidos trifosfatados                       |
| DSB                | Ruptura de la doble cadena del DNA                   |
| dsDNA              | DNA de doble cadena                                  |
| EC                 | Extractos de proteínas citoplásmicas                 |
| ECL                | Quimioluminiscencia enzimática                       |
| EDTA               | Ácido etilén diamino tetraacético                    |
| EN                 | Extractos de proteínas nucleares                     |
| g                  | Gramo  |
| G                  | Guanina  |
| GST                | Glutation S Transferasa                              |
| H                  | Homología  |
| HEPES              | Ácido 4-(2 hidroxietil)-1-piperazina etano sulfónico |
| His                | Histidina  |
| HSE                | Elemento de respuesta a choque térmico               |
| IgG                | Inmunoglobulina tipo G                               |
| IMSS               | Instituto Mexicano del Seguro Social                 |
| IPTG               | Isopropil-β-D- tiogalactopiranosido                  |
| J                  | Joules   |

|                |   |
|----------------|---|
| Kb             | Kilo base                                 |
| KDa            | Kilodalton                                |
| l              | Litro                                     |
| Kg             | Kilogramo                                 |
| LB             | Medio de cultivo Luria-Broth              |
| M              | Motivo                                    |
| m <sup>2</sup> | metro cuadrado                            |
| mA             | miliamperes                               |
| MDR            | Multiresistencia a drogas                 |
| MEGA           | Análisis Genético de Evolución Molecular  |
| mg             | Miligramo                                 |
| min            | Minuto                                    |
| ml             | Mililitro                                 |
| mM             | Milimolar                                 |
| ND             | No determinado                            |
| NER            | Reparación por escisión de nucleótidos    |
| ng             | Nanogramo                                 |
| nM             | Nanomolar                                 |
| No.            | Número                                    |
| N-terminal     | Extremo amino                             |
| OMS            | Organización Mundial de la Salud          |
| 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            | Banco de Datos Proteicos                  |
| PFA            | Paraformaldehído                          |
| pH             | Potencial de hidrógeno                    |
| PI             | Ioduro de propidio                        |
| pm             | Picomolar                                 |
| PM             | Peso molecular                            |
| PSA            | Persulfato de amonio                      |
| PTB            | Proteína unida a tracto de polipirimidina |
| RH             | Recombinación homóloga                    |
| RNA            | Ácido ribonucleico                        |

|                  |   |
|------------------|---|
| RNA <sub>m</sub> | RNA mensajero   |
| rpm              | Revoluciones por minuto                                   |
| RT               | Retrotranscripción  |
| SDS              | Dodecil sulfato de sodio                                  |
| seg              | Segundo   |
| T                | Timina  |
| 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 <sub>m</sub>   | Temperatura de alineamiento                               |
| Tris             | Tris (hidroximetil)-amino-metano                          |
| TYI-S-33         | Medio de tripticasa, extracto de levadura, hierro y suero |
| URE              | Elemento de regulación río arriba                         |
| UV               | Ultravioleta  |
| UV-C             | Radiación ultravioleta tipo C ( longitud de onda corta )  |
| V                | Volt  |
| VSG              | Glicoproteína variante de superficie                      |
| μg               | Microgramo  |
| μl               | Microlitro  |
| μM               | Micromolar  |

# ÍNDICE DE FIGURAS

| FIGURA   | PÁGINA |
|--|--------|
| 1. Mecanismo molecular del proceso de Recombinación Homóloga   | 7      |
| 2. Ciclo de vida de <i>Entamoeba histolytica</i>   | 16     |
| 3. Mapa del vector pTZ57R/T del Kit InsTAclone PCR (Fermentas)   | 32     |
| 4. Mapa del vector pGEX6p1 (GE Health Care)  | 34     |
| 5. Análisis de la secuencia nucleotídica de los promotores de genes sobreexpresados a los 5 minutos y a las 3 horas después de la irradiación con luz UV (Frecuencia nucleotídica y Entropía)  | 47     |
| 6. Identificación de secuencias reguladoras reportadas en los promotores de genes inducidos a los 5 minutos post irradiación.  | 50     |
| 7. Identificación de secuencias reguladoras reportadas en los promotores de genes inducidos a las 3 horas post irradiación.  | 51     |
| 8. Identificación de secuencias reguladoras predichas por el programa MEME ( <a href="http://meme.sdsc.edu/meme4/intro.html">http://meme.sdsc.edu/meme4/intro.html</a> ) en secuencias promotoras de genes inducidos a los 5 minutos posteriores de la irradiación de trofozoitos con luz UV.                | 53     |
| 9. Identificación de secuencias reguladoras predichas por el programa MEME ( <a href="http://meme.sdsc.edu/meme4/intro.html">http://meme.sdsc.edu/meme4/intro.html</a> ) en secuencias promotoras de genes inducidos a las 3 horas posteriores de la irradiación de trofozoitos con luz UV.                  | 54     |
| 10. Secuencia de la proteína EhRAD54 de 884 aminoácidos obtenida del banco de datos del proyecto de secuencia del genoma de <i>Entamoeba histolytica</i> ( <a href="http://www.tigr.org">http://www.tigr.org</a> ) y del servidor Pathema ( <a href="http://pathema.tigr.org">http://pathema.tigr.org</a> ). | 56     |
| 11. Comparación de las secuencias aminoacídicas de las proteínas parálogas EhRAD54 y EhRAD54b.   | 57     |

|  |    |
|--|----|
| 12. Comparación de secuencias de aminoácidos de proteínas RAD54.   | 61 |
| 13. Representación de los dominios funcionales y estructurales de EhRAD54 de <i>Entamoeba histolytica</i> .  | 63 |
| 14. Árbol filogenético de proteínas de la familia RAD54.   | 65 |
| 15. Comparación estructural entre el templado de la proteína ATPasa SNF2 de <i>Solfoglobus solfataricus</i> y el modelo predicho de la proteína EhRAD54 de <i>Entamoeba histolytica</i>  | 67 |
| 16. Gráfico de Ramachandran.   | 69 |
| 17. Sobreposición de la Estructura terciaria predicha para la proteína EhRAD54 con el templado de ATPasa de la superfamilia SNF2 de <i>Solfoglobus solfataricus</i> .  | 72 |
| 18. Sobreposición de la estructura terciaria predicha para la proteína EhRAD54 con el cristal de la proteína RAD54 de <i>Danio rerio</i> .   | 73 |
| 19. Sobreposición de la Estructura del templado de ATPasa de la superfamilia SNF2 de <i>Solfolubus solfataricus</i> con el cristal de la proteína RAD54 de <i>Danio rerio</i> .  | 74 |
| 20. Estructura secundaria predicha por el programa LOOPP ( <a href="http://cbsuapps.tc.cornell.edu/loopp.aspx">http://cbsuapps.tc.cornell.edu/loopp.aspx</a> ) para el extremo amino terminal de la proteína EhRAD54 de <i>Entamoeba histolytica</i> . | 75 |
| 21. Estructura terciaria predicha del extremo amino terminal de la proteína EhRAD54.   | 76 |
| 22. Identificación de las determinantes antigénicas en la secuencia de 884 residuos correspondiente a la proteína EhRAD54.   | 78 |
| 23. Superficie del extremo amino-terminal de la proteína EhRAD54 de <i>Entamoeba histolytica</i> .   | 80 |
| 24. Inmunodetección del péptido sintético EhRAD54 por el anticuerpo anti- PAS EhRAD54 por Dot Blot.  | 82 |
| 25. Inmunodetección del péptido sintético EhRAD54 por el anticuerpo anti – PAS EhRAD54 por Western Blot.   | 83 |

|  |     |
|--|-----|
| 26. Amplificación de 581 pb correspondientes al fragmento del gen <i>Ehrad54</i> de <i>Entamoeba histolytica</i> .   | 85  |
| 27. Restricción enzimática de la construcción pTZ57R/T- <i>Ehrad54</i>   | 86  |
| 28. Corrimiento electroforético en gel de agarosa TAE 1% del fragmento del gen <i>Ehrad54</i> y del vector pGEX6p1 restringidos y purificados con fines de cuantificación. | 88  |
| 29. Restricción enzimática de la construcción pGEX6p1- <i>Ehrad54</i> .  | 90  |
| 30. Inducción e inmunodetección de la proteína recombinante EhRAD54 - GST de <i>Entamoeba histolytica</i> .  | 92  |
| 31. Inducción e inmunodetección de la proteína de unión GST.   | 93  |
| 32. Inmunodetección de la proteína recombinante EhRAD54-GST de <i>Entamoeba histolytica</i> por el anticuerpo específico anti - PAS EhRAD54.                               | 95  |
| 33. Inmunodetección de la proteína endógena EhRAD54 por Western Blot usando los anticuerpos policlonales anti-PSA EhRAD54.   | 98  |
| 34. Modelo hipotético del papel de la proteína EhRAD54 en la reparación de DSB mediante el proceso de recombinación homóloga.  | 104 |

## ÍNDICE DE TABLAS

| TABLA  | PÁGINA |
|--|--------|
| <i>Tabla 1.</i> Identificación de proteínas homólogas a EhRAD54 en otros organismos utilizando el algoritmo BLAST. | 59     |
| <i>Tabla 2.</i> Análisis de las determinantes antigénicas de la proteína EhRAD54 de <i>Entamoeba histolytica</i> . | 79     |

## RESUMEN

La Recombinación Homóloga (RH) además de ser el mecanismo mediante el cual se logra la variabilidad genética durante la replicación del DNA, también es un mecanismo altamente eficiente para la reparación del mismo, sobre todo cuando se trata de daños tan severos como la Ruptura de Doble Cadena (DSB). En parásitos protozoarios, la RH puede inducir rearrreglos en el genoma que modifican la expresión de genes para regular la variación antigénica, multirresistencia a drogas y virulencia. Recientemente, nuestro grupo de trabajo detectó la posible maquinaria de RH en *Entamoeba histolytica*, el protozoario causante de la amibiasis humana. En particular se identificó una posible EhRAD54 que es indispensable para la formación y estabilización del núcleofilamento así como para el intercambio de cadenas homólogas en otros organismos. Mediante ensayo de microarreglo, se demostró que el gen *Ehrad54* se sobreexpresa en respuesta al daño genotóxico, no así el gen parálogo *Ehrad54b*.

El análisis *in silico* de los promotores de los genes sobreexpresados en respuesta al daño al DNA, incluyendo al gen *Ehrad54*, permitió la identificación de secuencias que pudieran controlar su transcripción, y que están ausentes en el promotor del gen parálogo *Ehrad54b*. El gen *Ehrad54* codifica para una posible proteína EhRAD54 de 100 kDa (884 aminoácidos), la cual presenta una homología del 58 al 61% con las proteínas homologas de otros organismos y esta filogenéticamente relacionado con las mismas. Estructuralmente, tiene la característica forma bilobulada de esta familia de proteínas y cuenta con el dominio de helicasa y los siete típicos motivos de la superfamilia SWI2/SNF2. El extremo 5' (581 pb) del gen *Ehrad54* (2655 pb) se clonó en el vector pGEX6p1 para inducir la expresión del péptido recombinante EhRAD54-GST (47.5 kDa) en bacterias *Escherichia coli*. Mediante la inoculación en ratones de un péptido antigénico sintético (PAS) correspondiente al extremo amino de EhRAD54 (15 aminoácido), obtuvimos anticuerpos que reconocieron específicamente a EhRAD54-GST. Estos anticuerpos se utilizaron para evaluar la expresión de la proteína EhRAD54 nativa en trofozoítos sometidos al modelo de daño al DNA inducido con luz UV-C (150 J/m<sup>2</sup>). EhRAD54 se expresa de manera constitutiva en extractos nucleares y su expresión aumenta a los 5 minutos después del daño al DNA, lo que sugiere que pudiera participar en reparación del DNA mediante el proceso de RH en este parásito.



## ABSTRACT

DNA double strand breaks (DSB), the most lethal DNA damage, is caused by UV rays, ionizing radiations or genotoxic agents. It also occurs in collapsed forks restoration during replication, mitosis and meiosis. DSB affects genome integrity and survival. Homologous recombination (HR) is an accurate mechanism to repair DSB in both prokaryotic and eukaryotic cells. It is also used to generate genetic diversity. In protozoan parasites, HR generating antigenic variation and genomic rearrangements, is responsible for virulence variation and drug resistance. We have recently reported the identification of the HR machinery in *Entamoeba histolytica*, the protozoan parasite responsible for human amoebiasis. Particularly, we identified a gene that codify for a putative EhRAD54 protein that is involved in nucleofilament stabilization and DNA exchange in other organisms. Moreover, microarrays assays showed that *Ehrad54* is overexpressed in response to genotoxic damage, but no the paralogous *Ehrad54b* gene.

*In silico* analysis of promoters corresponding to genes overexpressed after DNA damage, including the *Ehrad54* gene, allowed the identification of sequences that could control their transcription, and that are not present in the promoter of the paralogous *Ehrad54b* gene. The *Ehrad54* gene codify for a putative 100 kDa EhRAD54 protein (884 aminoacids) which presents 58-61% homology with homologous proteins from other organisms and is phylogenetically related to them. EhRAD54 has the typical bilobulated structure of this RAD54 family and presents the helicase domain with the seven characteristic motifs of the SWI2/SNF2 superfamily. The 5' end (581 bp) of *Ehrad54* gene (2655 bp) was cloned into the pGEX6p1 vector to induce the expression of the recombinant peptide EhRAD54-GST (47.5 kDa) in *Escherichia coli*. Through the inoculation of mice with a synthetic peptide (PAS) corresponding to the amino end of EhRAD54 (15 aminoacids), we obtained antibodies that specifically recognized EhRAD54-GST. These antibodies were used to evaluate native EhRAD54 expression in trophozoites irradiated with 254 nm UV-C (150 J/m<sup>2</sup>). EhRAD54 is constitutively expressed in nuclear extracts and its expression is increased at 5 minutes after DNA damage, suggesting that EhRAD54 could be participating in DNA repair by HR in this parasite.

# INTRODUCCION

## **RECOMBINACION HOMÓLOGA Y VARIABILIDAD GENÉTICA**

De manera independiente a que una célula tenga un solo cromosoma (como las células procarióticas) o que tenga varios cromosomas (como las células de organismos eucarióticos), el genoma completo debe ser replicado con precisión una vez en cada ciclo celular. Durante la replicación pueden ocurrir eventos de recombinación, es decir, el intercambio de segmentos de ADN entre cromosomas aumentando así la diversidad genética. El que el ADN pueda intercambiar fragmentos es un principio importante en genética. Y, cuando el ADN intercambia fragmentos y esos fragmentos son las mismas copias de información resultando suficientemente similares, se llaman homólogos. De forma que la recombinación homóloga (RH) es cuando cadenas de ADN parecidas se juntan e intercambian su información. El "entrecruzamiento" cromosómico que ocurre cuando los cromosomas homólogos se unen lleva a que se intercambien trozos de información genética, lo cual genera nuevas combinaciones de secuencias de ADN en cada cromosoma. El beneficio de esta mezcla genética para la progenie de los organismos es tan grande que la redistribución de genes mediante RH no está limitada a los organismos de reproducción sexual, sino que también es extensa en los organismos que se reproducen asexualmente, como las bacterias (Tsubouchi *et al.*, 2003).

## **RECOMBINACIÓN HOMÓLOGA Y REPARACIÓN DE ADN**

La RH además de ser el mecanismo mediante el cual se logra la variabilidad genética durante la replicación del ADN, también es un mecanismo extremadamente eficiente para la reparación del ADN dañado. El proceso permite a un organismo reparar el ADN dañado en ambas cadenas de la doble hélice, y puede corregir otros accidentes genéticos que se producen casi durante cada ronda de replicación del ADN (Paques *et al.*, 1999).

El ADN celular está constantemente expuesto a agentes medioambientales que le causan daño (los agentes físicos tales como la radiación y los agentes químicos del medio ambiente y los radicales libres, altamente reactivos producidos en el metabolismo corporal). Se define daño al ADN como cualquier cambio que introduce una desviación de la estructura ortodoxa de la doble hélice. En esta categoría se incluyen:

- ✓ La introducción de rompimientos de una cadena, es decir, rompimientos de enlaces fosfodiéster.
- ✓ La eliminación de una base, lo cual deja a la base complementaria sin poder formar puentes de hidrógeno.
- ✓ La modificación de las propiedades químicas de las bases por medio de la adición covalente de grupos reactivos, por ejemplo.
- ✓ La conversión de una base en otra, lo que produce una región donde ocurre un mal apareamiento.
- ✓ La introducción de enlaces covalentes entre bases de la misma banda del ADN.
- ✓ Los dímeros de pirimidina resultan de la introducción de enlaces covalentes entre bases adyacentes de la misma banda del ADN, por radiación ultravioleta y representan las distorsiones estructurales mejor entendidas y probablemente las más comunes.
- ✓ La introducción de entrecruzamientos (crosslinking en inglés) producidos por la introducción de enlaces covalentes entre bases de bandas opuestas del ADN.
- ✓ La ruptura de la doble cadena de ADN, conocida por sus siglas en inglés como DSB (Double Strand Break). Siendo esta la lesión más severa que puede sufrir la doble hélice (Jiang *et al.*, 1996).

## RUPTURAS DE DOBLE CADENA

Las rupturas de cadenas son consecuencia directa del depósito de energía a nivel de la molécula de ADN como a través de mecanismos indirectos de daño, mediados por especies reactivas del oxígeno (ROS por sus siglas un inglés) (Golub *et al.*, 1997). Sus causas más frecuentes son la radiación ionizante y los compuestos químicos aunque también pueden originarse cuando la maquinaria de replicación encuentra otro tipo de daños (como un corte de cadena simple) así como en procesos naturales de recombinación en los que aparecen como intermediarios. Se reconoce también el daño de origen espontáneo (para distinguirlo del daño de origen medioambiental), se estima que cada célula humana pierde diariamente más de 10000 bases por deterioro espontáneo del ADN a temperatura corporal, además de que las células replican su material genético con una cierta probabilidad de error, sin embargo, los cambios químicos en el ADN que ocurren espontáneamente son indistinguibles de los cambios químicos generados en él gracias a agentes medioambientales conocidos (Kim *et al.*, 2002).

La exposición a radiaciones ionizantes (RI) constituye un modelo característico de estrés genotóxico ya que, aun cuando todas las estructuras celulares pueden resultar afectadas, la molécula de ADN se considera un blanco preferencial de su acción. Su importancia radica en que con sólo una DSB se puede inducir con eficiencia la muerte celular (en organismos superiores) y porque una mala reparación de estas lesiones puede causar mutaciones, deleciones, o translocaciones. Estas últimas pueden generar cromosomas acéntricos o dicéntricos, también muy peligrosos para la célula (Symington *et al.*, 2002).

Para corregir las DSB, la célula ha desarrollado sistemas que las detectan, señalizan y finalmente reparan la lesión. La recombinación homóloga es la ruta principal de reparación de DSB en organismos eucariontes unicelulares.

## MECANISMO MOLECULAR DE REPARACION DE DSB POR RECOMBINACIÓN HOMÓLOGA

Estudios genéticos en *Sacharomyces cerevisiae* han revelado la existencia de la maquinaria especializada en reparar las rupturas en la doble cadena vía recombinación homóloga. Los genes codificadores para este sistema se encuentran altamente conservados en todos los organismos. La RH en levadura implica la acción del denominado grupo de epistasis RAD52 integrado por poco más de 12 proteínas, el complejo MRX formado por MRE11, RAD50 y XRS2, además de las proteínas RPA, RAD51, RAD52, RAD54, RAD55, RAD57, RAD59, ligasas y helicasas específicas (Symington *et al.*, 2002).

Al producirse una ruptura en la doble cadena de ADN, el complejo MRX (MRN en humano) se une al extremo 5' de los fragmentos rotos, actuando en primera instancia como sensor del daño. Se propone que el complejo MRX forma un anillo alrededor de la cadena de ADN rota, para proporcionarle cierta cohesión (Llorente y Symington, 2004). Las proteínas RAD50 y MRE11 muestran homología con las proteínas SbcC y SbcD, de *Escherichia 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 MRX de levadura es el homólogo a MRN de eucariontes superiores y a 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 ADN. El homólogo RAD50 de humano se pliega sobre sí mismo formando 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 una 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 *et al.*, 2000). Por otra parte, la proteína MRE11 es una fosfodiesterasa; tiene dos motivos de unión a ADN 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. Por otro lado, XRS2 o NBS1 interactúa con el N-terminal de MRE11 a través de su extremo C-terminal. Su función aún no es muy clara, parece estar implicada en mantener abierta la horquilla de ADN, además de tener actividad endonucleasa dependiente de ATP (Zhu *et al.*, 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 ADN, 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 ADN y de promover la búsqueda de homología y la reacción de intercambio de cadenas con un ADN 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 ADN de doble cadena intacto generando un híbrido conocido como D-loop (Petukhova *et al.*, 2000).

A ciencia cierta, los mecanismos de búsqueda de homología e intercambio entre cadenas de ADN 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 ADN en presencia de ATP y de ATPUS (un análogo de ATP no hidrolizable). 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 *et al.*, 2005).

Las restantes proteínas del grupo de epistasis RAD52 colaboran en las distintas etapas del mecanismo de recombinación homóloga. RAD52 interactúa con RPA y facilita la asociación de RAD51 a la hebra de ADN carente de estructura secundaria contribuyendo así a la formación del nucleofilamento (Shinohara *et al.*, 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 ADN (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 *et al.*, 2007). Por otro lado, RAD54 y su homólogo RAD54B están estructuralmente relacionados con una familia de ADN helicasas (Clever *et al.*, 1997) y su función precisa es ayudar a la formación de un ADN heterodúplex, que es el intermediario clave en el proceso de recombinación (Petukhova *et al.*, 2000). En este proceso pueden interactuar también con RAD51 y compensar su baja actividad ATPasa, estimulando así el intercambio entre las cadenas de ADN (Bhattacharyya *et al.*, 2004).

Comienza el intercambio de cadenas homólogas que al encontrarse se conoce como reacción de D-loop. Es entonces cuando da inicio la síntesis de la nueva cadena de ADN por una ADN polimerasa. La estructura es resuelta por enzimas helicasas y ligasas específicas en una de dos formas, generando recombinantes entrecruzados y recombinantes no entrecruzados. De esta manera la RH repara el ADN sin pérdida de material usando la cromátide hermana como molde para la síntesis de una nueva cadena de ADN intacta.

Un diagrama representativo de las diferentes etapas del proceso de reparación por recombinación homóloga en levadura se muestra en la figura 1.

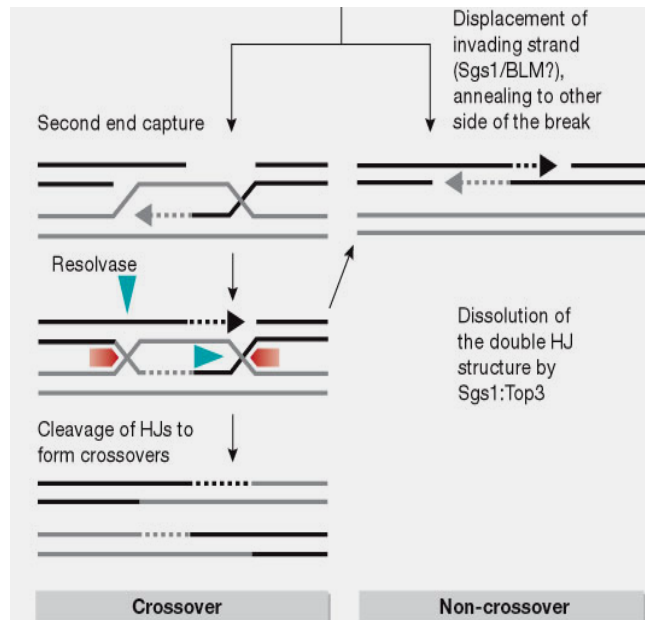
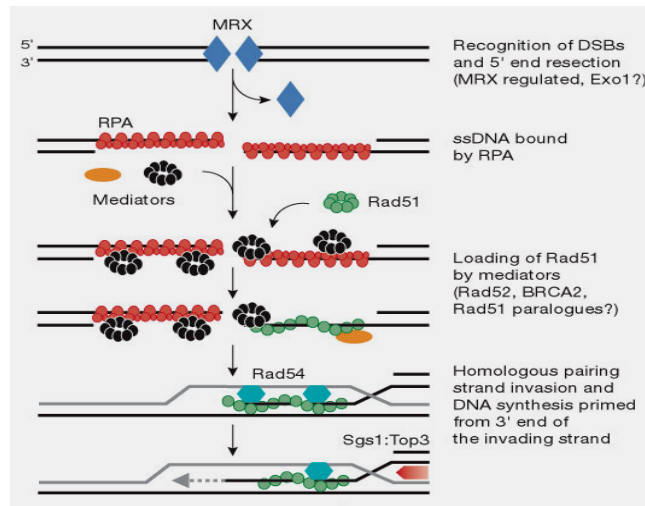


Figura 1. Mecanismo molecular del proceso de Recombinación Homóloga.



## PROTEÍNA RAD54

Hemos mencionado que las proteínas RAD54 tienen su principal función basada en la interacción con la proteína RAD51 fortaleciendo la unión de esta última con la hebra de ADN. Las propuestas de este mecanismo han sido ampliamente discutidas por diferentes grupos de trabajo, Alexander V. Mazin y colaboradores en el año 2003 describieron tres etapas fundamentales para la Recombinación Homóloga en función a la participación de diversas proteínas, una pre-sináptica en la que participa la proteína RPA y se da la unión de la proteína RAD51 al ADN, otra sináptica en la que participa la proteína RAD54 como un componente del nucleofilamento que adhiere a RAD51 y una post-sináptica en la que diferentes proteínas como RAD55 y RAD57 contribuyen a la búsqueda de la homología, lo anterior, les permitió reconocer que la proteína RAD54 participa en las tres etapas como un complejo indispensable de unión y recombinación (Mazin *et al.*, 2003; Komen *et al.*, 2002).

Joana Wesoly y colaboradores comprobaron lo anterior en el año 2006 mediante ensayos de inmunoprecipitación donde las proteínas RAD51 y RAD54 cooperaron e interaccionaron, del mismo modo que el evento de RH se muestra casi totalmente disminuido en células embrionarias troncales de ratones knockout RAD54 (Wesoly *et al.*, 2006).

También, análisis *in vivo* e *in vitro* sugieren que la sinergia entre RAD51 y RAD54 está dada gracias al dominio N-terminal de la segunda donde se presume se encuentra su actividad de ATPasa. En esta misma línea, investigaciones extensas han demostrado que, en varios organismos la proteína RAD54 y su paróloga RAD54b permiten la remodelación de la cromatina mediante la unión de pares homólogos gracias a la integridad de su extremo N-terminal, específicamente de nueve aminoácidos muy bien conservados entre humano, mosca y ratón, ya que mediante mutaciones de la proteína RAD54 de *Drosophila melanogaster* han observado que dicha función es abolida por completo además de disminuir la actividad de ATPasa y la formación del D-loop indispensable para la remodelación del material genético ( Alexiadis *et al.*, 2004).

Por otra parte, la proteína RAD54 de levadura ya ha sido purificada y se ha demostrado que posee una actividad dependiente de la hidrólisis de ATP para reparar ruptura de doble cadena del ADN mediante la unión con RAD51, venciendo los impedimentos cinéticos que limitarían el apareamiento de homólogos de ADN entre cromosomas recombinantes "*in vivo*" (Petukhova *et al.*, 1998). Otros autores aseguran que la interacción entre ambas proteínas y con ello el proceso de RH es dependiente de calcio, el cual funge como un cofactor universal para el intercambio de fragmentos de ADN homólogos (Golub *et al.*, 1997; Mazin *et al.*, 2004).

Del mismo modo, Kozo Tanaka y colaboradores en el año 2000, describieron mediante diferentes mutaciones en la proteína RAD54 de *Sacharomyces cerevisiae*, utilizando altas radiaciones y sensibilidad a metil metasulfonato, que esta proteína es esencial para la recombinación homóloga exitosa, ya que la proteína mutada no fue capaz de terminarla o siquiera inducirla; deduciendo que forma parte de un complejo de recombinación para la reparación de ruptura de doble cadena de ADN ( Tanaka *et al.*, 2000; Schmuckli-Maurer *et al.*, 2003).

Por otra parte se sabe que cromosomas asociados a las actividades celulares complejas requieren acceso ADN. Por ejemplo, el ADN eucariota está jerárquicamente envasado en nucleosomas y de orden superior en la cromatina, una estructura que interfiere con la replicación, transcripción, reparación del ADN, y recombinación (Wu y Grunstein, 2000). Del mismo modo, los mecanismos de transcripción u otras proteínas que forman complejos de ADN pueden interferir con la expresión de genes y con ello en el mantenimiento génico de procariontes y eucariotes (Svejstrup, 2002; Van den Boom *et al.*, 2002). Para hacer frente a estos eventos y para facilitar o regular la expresión génica y el mantenimiento del genoma, células que poseen actividad de remodelar la cromatina pueden modificar esta unión al ADN siendo estos complejos de proteínas quienes utilizan la hidrólisis de ATP.

Probablemente el mejor ejemplo estudiado de esta actividad es el mecanismo de remodelación de la cromatina ATP-dependiente en los eucariontes, que se lleva a cabo por los grandes complejos multiprotéicos que cambian la posición de

histonas o nucleosomas (Korber y Horz, 2004; Kornberg y Lorch, 1999; Narlikar *et al.*, 2002). Múltiples factores de remodelación cumplen con estos mecanismos siendo su composición general muy variada, pero todas ellas contienen una subunidad principal motora que pertenece al tipo SWI2/SNF2 de ATPasas (Horz y Becker, 2002; Peterson, 2002). Por lo anterior, otra función atribuible a la proteína RAD54 es la de remodelar la cromatina, su participación en procesos como la transcripción, replicación, reparación y recombinación, involucra cambios dinámicos en su estructura que puede darse por la existencia de dos estrategias clave mediante las cuales la cromatina es alterada: I) los componentes de la cromatina son covalentemente modificados, por ende el ADN es metilado, así como los residuos CpG y las histonas son acetiladas, metiladas, fosforiladas, ubiquitinizadas y ADP ribosiladas II) la estructura de la cromatina es reconfigurada por factores remodelantes de la cromatina dependientes de ATP con lo cual se disrumpe el contacto ADN – histona en la movilidad del nucleosoma (Alexiadis *et al.*, 2004).

El estudio de este mecanismo en plantas como *Arabidopsis* no se ha quedado atrás y han identificado a la proteína RAD54 como clave angular de la respuesta al daño del ADN y de su futura reparación (Shaked *et al.*, 2006).

Se ha mencionado que la proteína RAD54 tiene por si sola la capacidad de alterar la arquitectura del ADN facilitando la unión de la proteína RAD51 para formarse el nucleofilamento, se cree que este cambio conformacional se debe a que RAD54 ejerce fuerzas microscópicas sobre la cadena de ADN ocasionándole superenrollamientos plectonémicos que facilitan el desplazamiento de histonas y/o diversas proteínas contenidas en la cromatina (Ristic *et al.*, 2001).

Muchos otros autores se han enfocado al estudio del grupo de epistasis RAD52 partiendo de las DSB's como desencadenante de múltiples rearrreglos que condicionan en la célula translocaciones, inversiones o deleciones que culminan en su mal funcionamiento, muerte celular o carcinogénesis.

En líneas celulares de tumores humanos se han observado que mediante el uso de radiaciones ionizantes se generan diversas mutaciones en los genes que codifican proteínas RAD54, en consecuencia, el evento de RH es deficiente en estas células y esto puede ser debido a la acción directa del agente causal. De forma interesante mutantes RAD54 empleadas para los experimentos anteriores también mostraron baja o nula interacción con la proteína RAD51, nula actividad de ATPasa y formación de D-loop. Basados en lo anterior se propone que las alteraciones de la proteína RAD54 representan un elemento fenotípico característico de las células tumorales en el humano (Smirnova *et al.*, 2004).

Investigaciones que propician ruptura de doble cadena empleando al daño genotóxico mediante irradiación con luz ultravioleta en ratón, observan la formación de un foci nuclear en donde co-localiza la proteína RAD51 con RAD54, dando inicio a la reparación de DSB en respuesta al estrés genotóxico (Tan *et al.*, 1999).

Mutaciones en líneas celulares de linfocitos B en pollo sugieren que la proteína RAD54 actúa de manera sinérgica con la proteína RAD18, ya que células con ambas mutaciones son inviables a un 100% impidiéndose la síntesis de ADN y la Recombinación homóloga posterior a un daño celular inducido en este vertebrado (Yamashita *et al.*, 2002).

Las proteínas RAD54 pertenecen a la superfamilia SNF2/SWI2 que contiene un dominio ATPasa altamente conservado evolutivamente en sus miembros, están implicadas en una variedad de procesos incluyendo la regulación de la transcripción, la reparación y recombinación del ADN y la remodelación de la cromatina. (Miyagawa *et al.*, 2002; Wesoly *et al.*, 2006).

Roland Kanaar y colaboradores en el año 1996 además de observar dicha conservación establecieron la localización de la proteína RAD54 de humano en el cromosoma 1p32 y reportan su hallazgo en el núcleo, del mismo modo observaron que los niveles de RNAm aumentan durante la fase G1 del ciclo celular y tiene relación con el desarrollo de tejido germinal y linfóide (Kanaar *et al.*, 1996).

Las enzimas Rad54 SWI2/SNF2 son helicasas, sin embargo en este tenor tienen baja actividad, se les consideran como translocasas que participan en la reparación de ADN mediante recombinación de doble filamento cuando se ha dañado con ruptura de doble cadena, además de iniciar el proceso de degradación de la cromátida que se ha tomado como plantilla y durante la búsqueda de homología (Alexeev *et al.*, 2003; Tan *et al.*, 2003 y Komen *et al.*, 2000). Esta controversia de actividad helicasa / translocasa se resuelve con la teoría que sugiere que ATPasas SWI2/SNF2 viajan a lo largo de ambos surcos menores de la hélice, con ello, su actividad de helicasa queda disminuida o incluso abolida.

Estructuralmente las proteínas RAD54 siendo ATPasas de dominios SWI2/SNF2 cuentan con siete motivos característicos de la superfamilia SNF2 que les permiten realizar la hidrólisis del ATP favoreciendo la interacción del ADN con diversos factores de transcripción, destacando el motivo DEGH que las incluye en la familia DEAD like helicasas. Son típicamente alfa/beta bilobuladas y en cada fracción contienen parte del dominio de helicasa, a saber, el primer lóbulo contiene a los dominios I, Ia, II y III, el segundo lóbulo a los dominios IV, V y VI, cada uno de los lóbulos corresponde al extremo amino y carboxilo, sin embargo, no se les ha observado propiamente actividad de helicasa, sino una actividad análoga a esta que pudiese tratarse de una actividad de translocasa del ADN (Thoma *et al.*, 2005).

Las siete clásicas secuencias de motivos que están implicadas en la hidrólisis de ATP y/o vinculantes de ADN helicasas se encuentran en las regiones del bucle de dominios 1 (motivos I - CIMADEMGLGKTLQ, Ia - KPEIDKVIVVSPSSLVRNW, II - VGLVICDEGHR, III - RRVLISGTPIQN) y 2 (motivos IV – DKVVLVSNYTQTLDL, V - FMLSSKAGGCGLNLIG, VI - LVMFDPDWNPANDEQAMARVWR), además de que enzimas SWI2/SNF2 y proteínas con función de helicasa que contienen caja DExx comparten la base del mecanismo de la hidrólisis de ATP (Singleton *et al.*, 2001).

## RECOMBINACIÓN HOMÓLOGA EN PARÁSITOS PROTOZOARIOS

Para poder sobrevivir en el huésped, los parásitos protozoarios deben de ser capaces de modificar la expresión de sus genes, como en el caso de procesos relacionados con la resistencia a drogas, virulencia o escape del sistema inmune . Así un obstáculo importante para el desarrollo de una vacuna contra las infecciones causadas por parásitos protozoos tales como *P. falciparum* y *Trypanosoma* es la extraordinaria capacidad de estos parásitos para cambiar rápidamente sus moléculas de superficie, un fenómeno conocido como variación antigénica. Un factor determinante de la variación antigénica en estos organismos se asocia con reordenamientos de genes, especialmente los conocidos como *var* en *P. falciparum* y variantes de su capa protectora de glicoproteína de superficie (VSG) por sus siglas en inglés, en tripanosoma (Bhattacharyya *et al.*, 2004).

Se ha demostrado la expresión de una proteína RAD51, integrante del grupo de epistasis implicada en la reparación de ruptura del ADN y el intercambio genético, en *T. brucei* agente causal de la enfermedad del sueño, mediante la creación de parásitos knockout para el gen *rad51*. Se observó una alteración en la funcionalidad de VSG, indicando que RAD51 cataliza, o bien regula, la variación antigénica, sin embargo, no es la única proteína encargada del proceso.

En nuestro grupo de trabajo se inició el estudio del mecanismo de recombinación homóloga en trofozoitos de *Entamoeba histolytica* utilizando como modelo la reparación de ruptura de doble cadena causada por irradiación con luz UV.

## ANTECEDENTES

### ***ENTAMOEBIA HISTOLYTICA***

*Entamoeba histolytica* es el parásito protozoario causante de la amibiasis humana. Es uno de los eucariotes más primitivos, pertenece a la familia *Entamoebidae* del orden *Amoebida*, subfilo *Sarcodina*, superclase *Rhizopoda* de protozoos formadores de seudópodos, de la clase *Lobosea*.

*E. histolytica* existe en dos formas: trofozoito y quiste. El trofozoito es anaerobio facultativo de 10-40  $\mu\text{m}$  de diámetro, muy activo y pleomórfico. Su citoplasma carece de algunos organelos que se encuentran en la mayoría de los eucariontes como son: citoesqueleto estructurado, microtúbulos citoplasmáticos, mitocondrias y sistema de lisosomas primarios y secundarios. Se alimenta por fagocitosis y digestión intracelular de nutrientes.

Los quistes son formas redondas o ligeramente ovaladas de 8 a 20  $\mu\text{m}$  de diámetro, las cuales, en muestras sin teñir, se pueden ver como cuerpos hialinos con pared refringente. Su citoplasma es incoloro permitiendo la visualización de los llamados cuerpos cromatoides y nucleólos en número de uno a cuatro. Los quistes son una forma de resistencia de *E. histolytica*, ya que pueden sobrevivir fuera del huésped por semanas o meses en un ambiente húmedo. El proceso de enquistamiento de la amiba se da cuando las condiciones ambientales le son desfavorables a los trofozoitos. Aún hoy, dicho evento dista mucho de ser entendido cabalmente, sin embargo, se ha podido confirmar un papel importante de la quitina (polímero de N-acetilglucosamina unida por enlaces  $\beta$  (1-4), muy común en hongos, crustáceos e insectos pero ausente en humanos) en la transformación *in vitro* del trofozoito de *E. invadens* a quiste. Esto pudo comprobarse con inhibidores específicos de quitina los que disminuyeron notablemente el número de quistes formados en cultivo (Espinosa *et al.*, 2000).

Recientemente grupos de trabajo mexicanos obtuvieron a *E. histolytica* en su estructura quística *in vitro* mediante su inducción con medio TYI-S-33 en combinación con enterobacterias *Escherichia coli* y *Enterococcus faecalis* acondicionando este medio con una alta tensión de CO<sup>2</sup> y la histamina. Esta forma quística puso de manifiesto características propias de tal estructura, como por ejemplo la agregación, la resistencia a 0,15% sarcosil durante 10 min, una alta señal de fluorescencia a la luz ultravioleta cuando se tiñen con 10% de calcofluor M2r y una rugosa topología de superficie. Además, estas estructuras son multinucleadas con la cromatina condensada adjunta a la membrana nuclear, contienen grandes vacuolas y ribonucleoproteínas espirales en el citoplasma con una delgada pared celular (Barrón-González *et al.*, 2008).

El ciclo de vida de *Entamoeba histolytica* se inicia mediante la infección con la ingesta de quistes (los cuales son capaces de resistir el pH gástrico) provenientes de agua o alimentos contaminados con materia fecal. En el intestino delgado ocurre la llamada exquistación, que consiste en la división del quiste cuatrinucleado que da origen a ocho núcleos (estado metaquístico transitorio), la división citoplásmica continúa y emergen ocho trofozoitos. Los trofozoitos se dirigen al intestino grueso para colonizarlo, ahí se alimentan de bacterias y restos celulares. Finalmente, los trofozoitos pueden enquistarse y ser eliminados con las heces, completando el ciclo (Figura 2).



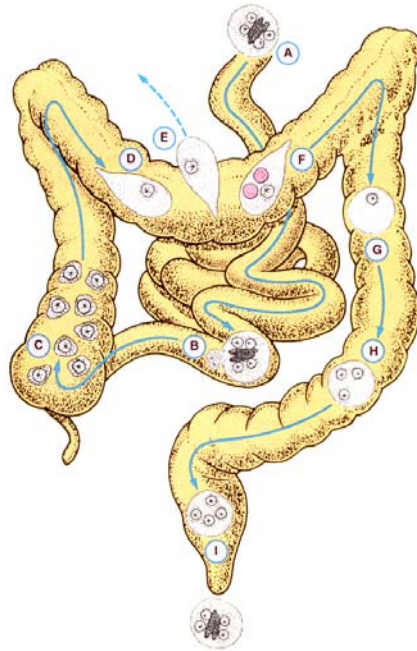


Figura 2. Ciclo de vida de *Entamoeba Histolytica*.

## AMIBIASIS

La amibiasis causada por *Entamoeba histolytica* es catalogada por la Organización Mundial de la Salud como la tercer causa de muerte a nivel mundial causada por parásitos. Esta Organización define a la infección amibiana como la presencia de *Entamoeba histolytica* en una persona, cause o no manifestaciones clínicas de enfermedad.

La amibiasis está ampliamente distribuida en el mundo, siendo la India, Sur y Oeste de África, Lejano Oriente y Sur y Centro América, las áreas con mayor incidencia. Se calcula en 500 millones el número de personas infectadas, llegando a ser letal en buen porcentaje de esta población. Esta es una enfermedad que se relaciona con la pobreza, la ignorancia, malas condiciones sanitarias, de hacinamiento y desnutrición (Espinosa *et al.*, 2000).

Esta parasitosis es un problema de salud pública en los países en desarrollo, como México, donde las condiciones higiénicas y sanitarias son deficientes en una buena parte de la población. La frecuencia de portadores de quistes de *E. histolytica* varía alrededor de 25%; estos portadores representan una fuente de contagio para las personas cercanas a ellos y además contaminan el ambiente que les rodea. Con cerca de cinco millones de personas portadoras asintomáticas de amibas, México se ubica como uno de los países con más alto índice de parasitosis en el mundo, debido al clima, el mal saneamiento ambiental y el contagio entre personas (Gutiérrez *et al.*, 1992). Su incidencia en este país es del 9% de los pacientes con diarrea, siendo (en la mayoría de los casos) perfectamente controlables con la aplicación de la quimioterapia adecuada; sin embargo, este último rubro debe ser tomado con cautela, ya que a últimas fechas nos encontramos con uno de los principales agentes etiológicos que ha logrado desarrollar un impecable sistema para la resistencia de fármacos.

De acuerdo a los síntomas presentados por los individuos infectados, la amibiasis puede ser agrupada como: asintomática, sintomática sin evidencia de invasión tisular y sintomática con evidencia de invasión tisular. La amibiasis sintomática es primariamente una enfermedad intestinal y cuando llega a ser extraintestinal, generalmente involucra al hígado. Sin embargo, el papel de la respuesta inmune

en el control de la enfermedad no está bien establecido, menos aún el singular comportamiento del parásito observado por décadas, que con frecuencia actúa como comensal y más raramente como invasor. La amibiasis intestinal se asocia con una amplia gama de alteraciones anatómicas, que corresponden a condiciones clínicas bien definidas conocidas como colitis amibiana ulcerativa, megacolon tóxico o disentería amibiana fulminante, ameboma o granuloma amibiano y apendicitis amibiana (Espinosa *et al.*, 2000).

El absceso hepático amibiano se debe a la presencia de grandes cantidades de amibas en el hígado, las que llegan ahí por el sistema porta a partir de ulceraciones intestinales, donde aparentemente inducen una pobre respuesta inmune celular. Se ignora si esto se puede generalizar para todos los casos en humanos o simplemente si se debe a que una incipiente respuesta celular ha escapado a su detección en las series de biopsias examinadas.

Entonces, la patología asociada a la infección por trofozoitos de *E. histolytica* puede ser muy variable, desde asintomática hasta formadora de abscesos hepáticos que pueden ser mortales. Esto se debe a factores del huésped, como lo es el estado inmunológico, pero también a factores del mismo parásito. Los trofozoitos de *Entamoeba histolytica* presentan un alto grado de variabilidad fenotípica con diversos grados de virulencia que podría estar relacionada con una variabilidad genética, esto probablemente debido a mecanismos de recombinación. Además, los parásitos requieren cierto grado de flexibilidad para adaptarse a los cambios y agresiones de su medio ambiente (falta de nutrientes, presión selectiva por fármacos o las defensas del huésped). Esta adaptación requiere la activación de rutas moleculares específicas así como de cambios en su material genético. Se ha demostrado que los trofozoitos de *Entamoeba Histolytica* presentan procesos de amplificación del ADN que han sido asociados a eventos de recombinación (Báez Camargo, 1996). Sin embargo poco se sabe sobre los mecanismos involucrados en la regulación de la estabilidad genómica y recombinación homóloga en este parásito.

## RECOMBINACION HOMÓLOGA EN *ENTAMOEBIA HISTOLYTICA*

Recientemente en nuestro grupo de trabajo se identificó la maquinaria que pudiera estar involucrada en el proceso de recombinación homóloga en *Entamoeba histolytica*. Se encontraron 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 , 2006), 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. 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. De forma interesante, se observa que este parásito cuenta al igual que la maquinaria propuesta para el humano, con dos proteínas EhRAD54 y su paróloga EhRAD54b.

Para evaluar la expresión y participación de estas proteínas en el proceso de recombinación homóloga, se desarrolló un modelo de daño al ADN basado en la irradiación con luz UV (150J/m<sup>2</sup> – 8 segundos) de los trofozoitos de *Entamoeba histolytica*. Mediante el uso de ensayos tipo cometa y la inmunodetección de la Histona 2 AX fosforilable, se estableció la formación de ruptura de doble cadena en el ADN de las células irradiadas.

Posteriormente, ensayos de RT-PCR mostraron que los genes antes mencionados presentan una expresión diferencial antes y después del tratamiento con luz UV, lo que sugiere la participación de las proteínas correspondientes en la reparación del ADN por recombinación homóloga en los trofozoitos que sobrevivieron (López – Casamichana *et al.*, 2008).

En este ensayo, se puede observar que la expresión del RNAm del gen *Ehrad51*, es casi imperceptible en los trofozoitos no irradiados, lo que sugiere que este gen no requiere de una expresión constitutiva, siendo necesario el estímulo con luz UV para que este aumente su expresión posterior a los 30 minutos del daño al ADN manteniéndose esta sobreexpresión hasta las 3 horas, posterior a 12 horas del daño genotóxico, los niveles del RNAm correspondientes a este gen disminuyen

considerablemente. No así nuestro blanco de estudio, el gen *Ehrad54* que se encuentra expresado de forma constitutiva pero disminuye su expresión pasados 30 minutos de irradiados los trofozoitos. Esta mínima expresión se mantiene a las 3 y 12 horas posteriores del daño genotóxico. En lo que respecta al gen parálogo *Ehrad54b*, los niveles de RNAm mostraron nula expresión en el ensayo de RT-PCR ante el estímulo con luz UV, lo que sugiere que probablemente este se vea modificado para responder ante otros estímulos.

Estos datos constituyen la primera evidencia del papel de EhRAD51 en el mantenimiento de la integridad genómica y de la presencia de un mecanismo de recombinación homóloga en *E. histolytica* (López-Casamichana *et al.*, 2008).

Estudios recientes elaborados por el Dr. López Camarillo y colaboradores que involucran el uso de Microarreglos, han permitido conocer la respuesta transcripcional del genoma de *Entamoeba histolytica* posterior a la irradiación de trofozoitos con luz UV, observando la sobreexpresión de numerosos genes a los 5 minutos y 3 horas posteriores del daño. En este estudio se observó que 524 genes disminuyen su expresión ante el estímulo con luz UV, de estos, 176 genes disminuyen su expresión a los 5 minutos y 338 genes a las 3 horas posteriores del daño genotóxico, 10 genes mantienen la misma expresión en ambos tiempos. Del mismo modo se observa que 398 genes aumentan su expresión ante tal estímulo, hallando que de estos, 166 genes aumentan su expresión a los 5 minutos y 217 genes a las 3 horas posteriores del daño con luz UV, manteniendo 15 genes la misma expresión en ambos tiempos.

Y es precisamente en este rubro, que el ensayo de microarreglo distingue a la helicasa EhRAD54 como una proteína esencial para el proceso de recombinación homóloga gracias a su sobreexpresión de 1.7 veces más que el control no irradiado a los 5 minutos posterior al daño genotóxico con luz UV. Cabe mencionar que el gen *Ehrad54b*, parálogo de *Ehrad54*, no muestra en el microarreglo expresión alguna, lo que es congruente con los resultados del ensayo de RT-PCR antes mencionados (López-Camarillo *et al.*, enviado).

Es posible que los genes inducidos o reprimidos a los 5 minutos y 3 horas posteriores a la irradiación con luz UV tengan en su promotor una o varias secuencias reguladoras conservadas que controlen de la transcripción en respuesta a este estímulo. En particular, las secuencias que provocan un aumento de la transcripción a los 5 minutos, podrían estar presentes en el promotor del gen *Ehrad54*; pero ausentes en el promotor del gen *Ehrad54b*, explicando la expresión diferencial de estos genes parálogos.

Hasta la fecha se conoce poco acerca de la regulación de la transcripción de *Entamoeba histolytica*. Se ha reportado la presencia de tres motivos importantes, el primero corresponde a una caja TATA (TATTTAAAG/C), llamada así por la riqueza de adeninas y timinas en su secuencia, el segundo motivo corresponde a una secuencia Iniciadora o Inr (AAAAATTCA) y el tercero a un cuadro o caja GAAC (AA/TGAACT) que pueden de manera independiente marcar el inicio y ritmo de la transcripción. Recientemente, al analizar los promotores de genes que regularmente muestran un aumento en su expresión como respuesta a choque térmico, Hackney y colaboradores, identificaron en sólo 4.11% de 7638 secuencias promotoras de *Entamoeba histolytica* la presencia de los 3 motivos antes mencionados. Del mismo modo, se ha reportado la presencia de diferentes secuencias reguladoras río arriba conocidas como URE 1 – 5 que corresponden a secuencias de unión para diferentes factores de transcripción, por ejemplo, el URE 3 (TATTCTATT) y URE 4 (AAAAATGAA) se han descrito como potenciadores de la expresión del gen *fxI* y de la subunidad pesada del gen de lectina *hgl5*, respectivamente. Otro elemento que ha sido identificado es en respuesta a choque térmico, existiendo así el llamado HSE (CNNGAAGAATTC) de las siglas en inglés Heat Shock Element (Romero-Díaz *et al.*, 2007; Hackney *et al.*, 2007). Además, en este mismo estudio de identificaron otras secuencias reportadas en genes con muy alta sobreexpresión llamados M44, M43, M42, M41, M40, M39, M38, M37 (potenciador de genes de histonas), M36, M35, M33, M32, M31, M30, M29 y M27, así como secuencias reportadas en genes con baja o moderada sobreexpresión como lo son M25, M24 (genes Ehssp o stresssensitive protein), M23 (genes Ehssp), M21, M15, M13 y M9 (genes Ehssp) (Hackney *et al.*, 2007).

## JUSTIFICACIÓN

Los trofozoitos de *Entamoeba histolytica* presentan gran variabilidad fenotípica con diversos grados de virulencia y resistencia a drogas, probablemente asociados a una variabilidad genética que pudiera deberse a la existencia de mecanismos de recombinación homóloga muy activos.

Recientemente se ha identificado a la maquinaria de reparación del ADN por recombinación homóloga en este parásito protozoario, y se ha caracterizado la expresión de la Recombinasa EhRAD51 mediante el modelo de daño al ADN por irradiación con luz UV.

La caracterización de la proteína EhRAD54 nos ayudará a dilucidar el mecanismo de recombinación homóloga en este parásito.

# OBJETIVOS

## OBJETIVO GENERAL

Caracterizar estructuralmente al promotor del gen *Ehrad54* , así como analizar la expresión y localización celular de la proteína EhRad54 de *Entamoeba histolytica* en respuesta al daño al ADN.

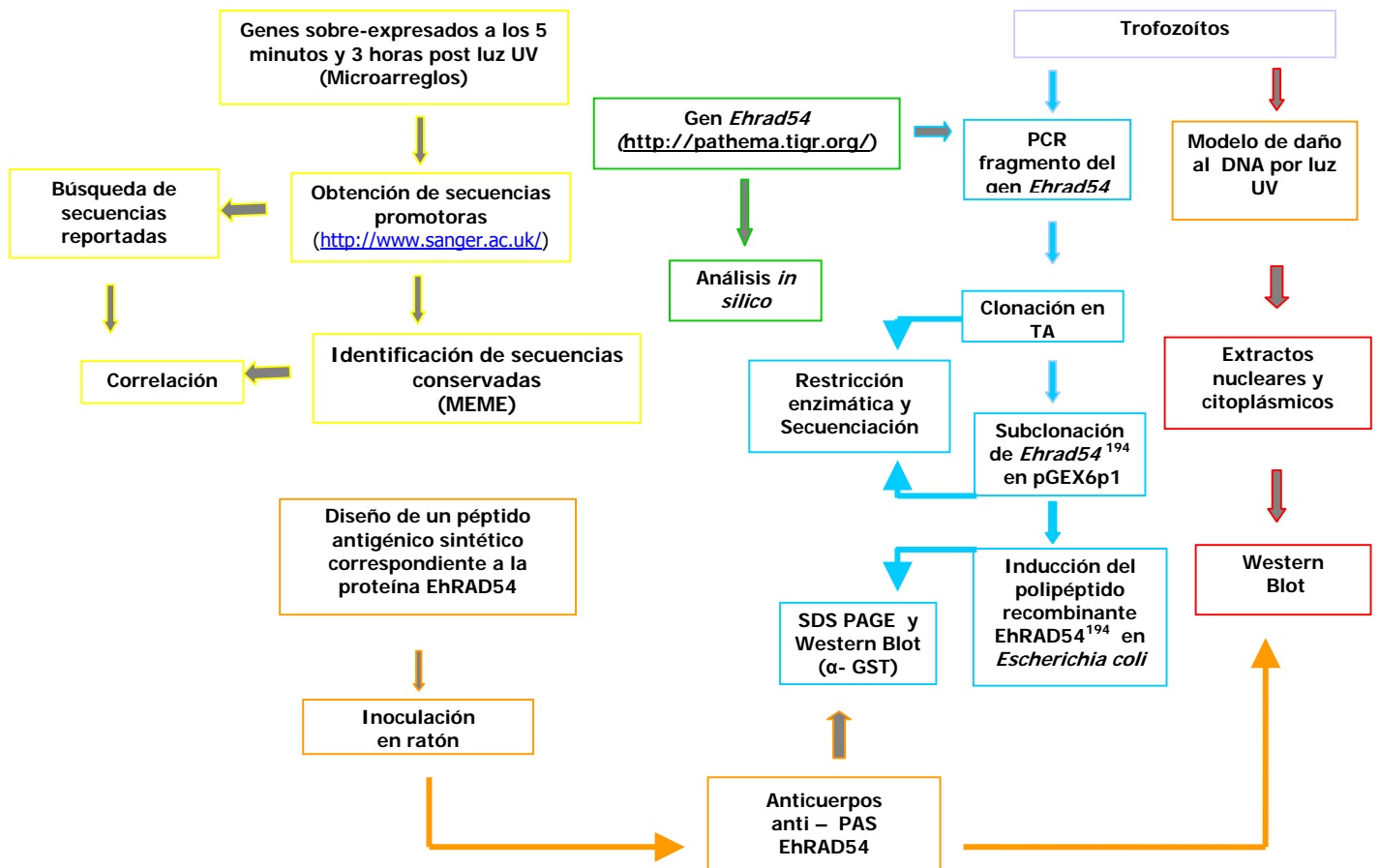
## OBJETIVOS ESPECIFICOS

- 1.- Identificar la presencia de secuencias promotoras que pudieran ser responsables de la sobreexpresión de genes en respuesta al daño del ADN.
- 2.- Realizar un análisis bioinformático de la secuencia de aminoácidos de EhRAD54.
- 3.- Generar anticuerpos específicos contra EhRAD54 utilizando un péptido sintético.
- 4.- Obtener la proteína recombinante para verificar la funcionalidad de los anticuerpos obtenidos.
- 5.- Analizar la expresión y la localización celular de la proteína EhRAD54 en respuesta al daño del ADN.



# ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

Para cumplir con los objetivos propuestos, seguimos la siguiente estrategia experimental.



# METODOLOGÍA

## ANÁLISIS DE PROMOTORES

Se realizó una búsqueda en el banco de datos de *Entamoeba histolytica* (<http://www.sanger.ac.uk/>) para obtener las secuencias promotoras de los genes que en el ensayo de microarreglos mostraron un aumento en su expresión a los 5 minutos, incluyendo al gen *Ehrad54*, y a las 3 horas posteriores al tratamiento con luz UV, buscando además al promotor del gen *Ehrad54b*. Una vez obtenidas las secuencias promotoras, se tomaron 500 nucleótidos río arriba del codón de inicio de la traducción ATG, ya que la mayoría de los estudios previamente realizados en promotores de genes de amiba han mostrado que las secuencias reguladoras se encuentran en una región de aproximadamente 400 nucleótidos río arriba del codón ATG.

Con la finalidad de identificar regiones que pudieran corresponder a secuencias conservadas importantes, se realizó la determinación de la frecuencia nucleotídica y de la entropía de las regiones promotoras. Estos datos fueron obtenidos mediante las herramientas bioinformáticas del programa Bioedit (<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/BioEdit.html>) y graficados utilizando el programa Excel del paquete Office.

Posterior a esto, se realizó una búsqueda "manual" de secuencias reguladoras previamente reportadas en promotores de genes de *Entamoeba histolytica* mediante las aplicaciones del programa Word del paquete Office. También se realizó la búsqueda de motivos conservados utilizando las herramientas del programa MEME (<http://meme.sdsc.edu/meme4/intro.html>), siendo este una opción para descubrir secuencias patrón que se repiten en un de secuencias. Este programa identifica motivos de acuerdo a la conservación de posición así como de la probabilidad de que cada motivo se presente en cada posición de la secuencia o estructura, esto basado en las diferentes matrices que emplea. El trabajo del programa MEME utiliza técnicas de modelado estadístico para elegir automáticamente el mejor empate y el número de ocurrencias, del mismo modo,

proporciona una descripción de los motivos a través de la base de datos JASPAR (<http://jaspar.cgb.ki.se/>).

## **ANÁLISIS *IN SILICO* DE LA SECUENCIA DE AMINOÁCIDOS DE EHRAD54**

Utilizando la secuencia aminoacídica predicha para el gen *Ehrad54* identificado en el locus 85.t00018 del genoma de *Entamoeba histolytica* reportado en <http://www.tigr.org> con actualización en el Pathema EHI 103840 (<http://pathema.jcvi.org/cgi-bin/Entamoeba/PathemaHomePage.cgi>), se realizó una búsqueda de secuencias homólogas en los bancos de datos de diferentes especies por medio del programa BLAST 2.0 (*Basic Local Alignment Search Tool*), que se encuentra en el servidor en línea de ExPASy Proteomics Server (*Expert Protein Analysis System*) (<http://www.expasy.org>).

Se realizó un alineamiento múltiple de las secuencias de aminoácidos en formato FASTA de las especies más representativas de cada grupo: Mamíferos: *H. sapiens*, Invertebrados: *C. elegans*; Plantas: *A. thaliana*; Levaduras: *S. cerevisiae*; Protozoarios: *P. falciparum*, y *E. histolytica*, Ave: *G. gallus*, Anfibio: *X. laevis*, Pez: *D. rerio*, Insecto: *D. melanogaster*, mediante el programa CLUSTALW (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>). Para predecir los dominios estructurales y funcionales conservados en las diferentes proteínas se utilizaron los programas InterProScan ([www.ebi.ac.uk/InterProScan](http://www.ebi.ac.uk/InterProScan)), Prosite (<http://www.expasy.org>) y Pfam (<http://www.sanger.ac.uk>).

Para determinar la relación filogenética entre EhRad54 y proteínas homólogas de diferentes especies, se utilizó el programa *Molecular Evolutionary Genetics Analysis*. MEGA basado en los algoritmos Neighbor-Joining (N-J) y Bootstrap Versión 3.1 (<http://www.megasoftware.net>).

Para predecir la estructura terciaria de EhRAD54 se utilizó el programa Swiss-Model (<http://www.expasy.ch/swissmod/>), que tomó como templatado a la estructura terciaria de una helicasa de la Superfamilia SNF-2 de la archaeobacteria *Solfoglobus solfataricus* con código de acceso 1z6A en el Protein Data Bank (PDB). Posteriormente mediante los programas PyMol

(<http://pymol.sourceforge.net/>) y RasMol (<http://www.umass.edu/microbio/rasmol/getras.htm>), el archivo PDB obtenido fue visualizado y modelado. Para validar la estructura tridimensional predicha se utilizaron los gráficos de Ramachandran y el cálculo de energía basados en el programa Deep-View Swiss Model (<http://www.expasy.ch/swissmod/>), además del cálculo estereoquímico del programa Win Coot. La similitud entre la estructura predicha y el modelo utilizado fue determinada mediante el valor de RMS. Posteriormente se realizó la sobreposición de la estructura terciaria de la proteína EhRAD54 con la de los cristales de la ATPasa de la superfamilia SNF2 de *Solfobolus solfataricus* y la proteína RAD54 de *Danio rerio*, utilizando al programa CCP4 Program Suite 6.0 y sus aplicaciones como Lsqkab (<http://www.ccp4.ac.uk/main.html>) así como el visualizador Pymol (<http://pymol.sourceforge.net/>).

Dado que el programa Swiss Prot no utilizó el extremo amino de EhRAD54 para hacer la predicción, la estructura terciaria de esta región donde se encuentra localizada la secuencia de aminoácidos correspondiente al péptido sintético antigénico (ver más adelante), se obtuvo a través del programa bioinformático LOOPP (<http://cbsuapps.tc.cornell.edu/loopp.aspx>) que toma como templatado diferentes archivos PDB para realizar su mejor predicción. El archivo PDB propuesto por este programa fue visualizado y modelado por el programa bioinformático PyMol.

## **DISEÑO DE UN PÉPTIDO ANTIGÉNICO SINTÉTICO.**

Utilizando las herramientas bioinformáticas del sitio de la Universidad de Harvard (<http://mif.dfci.harvard.edu/tools/antigenic.pl>) para la búsqueda y predicción de determinantes antigénicos, se sometió a análisis a la secuencia de 884 aminoácidos correspondiente a la proteína EhRAD54 de *E. histolytica*. De las secuencias que resultaron antigénicas, se analizaron aquellas que fueran divergentes entre las proteínas parálogas EhRAD54 y EhRAD54b. Las determinantes antigénicas resultantes se analizaron nuevamente quedando solo una determinante antigénica divergente.

Se comprobó mediante un análisis bioinformático con el programa BLAST que esta secuencia no era compartida con la proteína paróloga EhRAD54b de amiba ni con ninguna proteína predicha en el genoma de *Entamoeba histolytica*. Finalmente, se verificó con un alineamiento múltiple utilizando el programa CLUSTALW, que esta secuencia de aminoácidos tampoco estuviese presente en la proteína RAD54 de *Mus musculus*, ya que es este modelo animal el que elegimos para obtener anticuerpos específicos contra EhRAD54.

El péptido así determinado fue sintetizado por la compañía extranjera Genemed Synthesis Inc. ([www.genemedsyn.com](http://www.genemedsyn.com)) acoplada a un sistema de antigenicidad múltiple (MAP) de ocho ramas asimétrico.

### **INMUNIZACIÓN DE RATONES PARA OBTENER ANTICUERPOS**

El péptido sintético fue inoculado en los ratones Balb-C utilizando al adyuvante TiterMax Gold (100 µg de péptido + 50 µl de adyuvante) para obtener anticuerpos específicos anti-EhRAD54. Se utilizaron ratones machos y hembras Balb/c de 8 semanas de nacidos, dejando uno sin inocular como control negativo. Todos los animales se marcaron con perforaciones en las orejas, para poder identificarlos.

El día 0, se sangraron para obtener el suero preinmune. El sangrado se realizó mediante un corte parcial de la región distal de la cola utilizando una hoja de bisturí nueva y estéril. La sangre obtenida se colocó en tubos eppendorf con la ayuda de un bulbo, sin lisar la muestra. La sangre obtenida se incubó a 37°C durante 1hr. El coágulo formado se retiró con un palillo de madera para obtener una mayor cantidad de suero. Se centrifugó a 1,500 rpm durante 5 minutos y se separó el suero de los eritrocitos en tubos eppendorf nuevos. Los sueros fueron almacenados a -20°C hasta su utilización.

Se realizaron tres inmunizaciones intraperitoneales los días 0, 10 y 21. La dosis a utilizar por animal fue de 100 µg de polipéptido en un volumen final de 65 µl, de los cuales la tercer parte correspondió al adyuvante y el resto al péptido antigénico. El día 0, 10 y 21 se inoculó el péptido antigénico sintético EhRAD54

con adyuvante TiterMax Gold, el día 30 se sangraron nuevamente a los ratones para obtener el suero.

Para comprobar la calidad del suero obtenido de los ratones, se realizó un ensayo de Western blot con el péptido sintético EhRAD54 y el polipéptido recombinante EhRAD54<sup>194</sup>. Posteriormente, los sueros se utilizaron para determinar la localización subcelular de la proteína EhRAD54 en los trofozoítos mediante Western blot con extractos nucleares y citoplásmicos de *Entamoeba histolytica*.

#### **AMPLIFICACIÓN POR PCR DE UN FRAGMENTO DEL GEN *Ehrad54*.**

Un fragmento del extremo 5' de 581 pb del gen *Ehrad54* fue amplificado por PCR a partir de ADN genómico de trofozoítos de la cepa HMI:IMSS utilizando los oligonucleótidos sentido y antisentido específicos: *EhRAD54* IR sentido: 5' - CC GGA TCC CCA TCT GTA AGA TTA GCA AA - 3' y el *EhRAD54* IR antisentido: 5' - CC AAG CTT TCT CAC ACT CTT CCT CAG TT -3', que tienen los sitios de restricción para las enzimas *BamHI* y *XhoI*, respectivamente (subrayados).

Las reacciones de PCR se realizaron mezclando 100 ng de ADN genómico, 300 ng de cada oligonucleótido, 2 µl de dNTPs Mix 100mM (Invitrogen), 5 µl de buffer 10X, 0.2 µl de la enzima Taq polimerasa High Fidelity (Invitrogen) a una concentración de 5 U/µl, 4 µl de MgCl<sub>2</sub> 50 mM y 27 µl de agua bidestilada. Se colocó como control negativo una reacción sin ADN genómico.

Los compuestos anteriores ya mezclados se introdujeron en un termociclador programado de la siguiente manera:

- 1 ciclo de 5 min a 94°C
- 30 ciclos con el siguiente programa:
  - 30 segundos a 94°C
  - 30 segundos a la temperatura correspondiente a la T<sub>m</sub> (44.5° C) de los oligonucleótidos
  - 45 segundos a 72°C
- 1 ciclo de 30 min a 72°C.

Para verificar que la amplificación fuera exitosa se analizaron 5  $\mu$ l de cada muestra mediante electroforesis en un gel de agarosa al 2% en amortiguador TBE 1X (Tris-borato, Tris 90 mM, EDTA 2 mM pH 8 y ácido bórico 90 mM) que corrió a 100 V. Se utilizaron los marcadores de peso molecular Lambda-HindIII. Finalmente el gel fue teñido por 5 minutos con Bromuro de Etidio y el ADN se observó en un transiluminador de luz UV. Para cuantificar el amplificado, todas las muestras amplificadas se juntaron y se realizó una dilución 1:10 para analizar en un gel de agarosa al 2% 1, 3 y 5  $\mu$ l de la dilución, así como 2  $\mu$ l de marcadores de peso molecular Lambda-HindIII cuantificado. Comparando la intensidad de las bandas con las del marcador, se determinó la concentración del fragmento de PCR.

### **CLONACIÓN EN EL VECTOR pTZ57R/T**

El fragmento del gen *Ehrad54* amplificado por PCR fue clonado en el vector pTZ57R/T del Kit InsTAclone PCR (Fermentas) diseñado para clonar en un solo paso fragmentos de ADN amplificados por PCR que aunado a ADN polimerasas con actividad de "Proof-reading" (actividad de exonucleasa 3'-5') permiten adicionar en los extremos de los productos amplificados una extensión de adeninas (dA) que, en conjunto con una cadena sencilla terminal de timinas terminales del vector (ddT) permiten que la ligación se lleve a cabo de forma efectiva.

Se realizó la clonación del fragmento al vector InsTAclone incubando a 22°C por toda la noche la siguiente mezcla de reacción: 3  $\mu$ l de Vector pTZ57R/T (0.18 pmol), 25  $\mu$ l fragmento de PCR (0.54 pmol), 6  $\mu$ l de buffer de ligación 5X, 8  $\mu$ l de agua libre de nucleasas y 1  $\mu$ l T4 ADN ligasa (5U).

Posteriormente se transformaron bacterias *Escherichia coli* DH5 *alfa* competentes y bacterias *E. coli* JM107 cada una con 2.5 y 5  $\mu$ l de la mezcla de ligación. Se plaquearon en cajas LB- ampicilina y se incubaron a 37°C toda la noche. Se analizaron colonias positivas resistentes a ampicilina mediante Mini-preparación del ADN plasmídico. Una vez identificadas las clonas transformantes que corresponden a la presencia del vector recombinante (pTZ57R/T - *Ehrad5A*), se expandió la construcción. Los protocolos detallados se describen mas adelante. El mapa del vector pTZ57R/T se muestra en la figura 3.



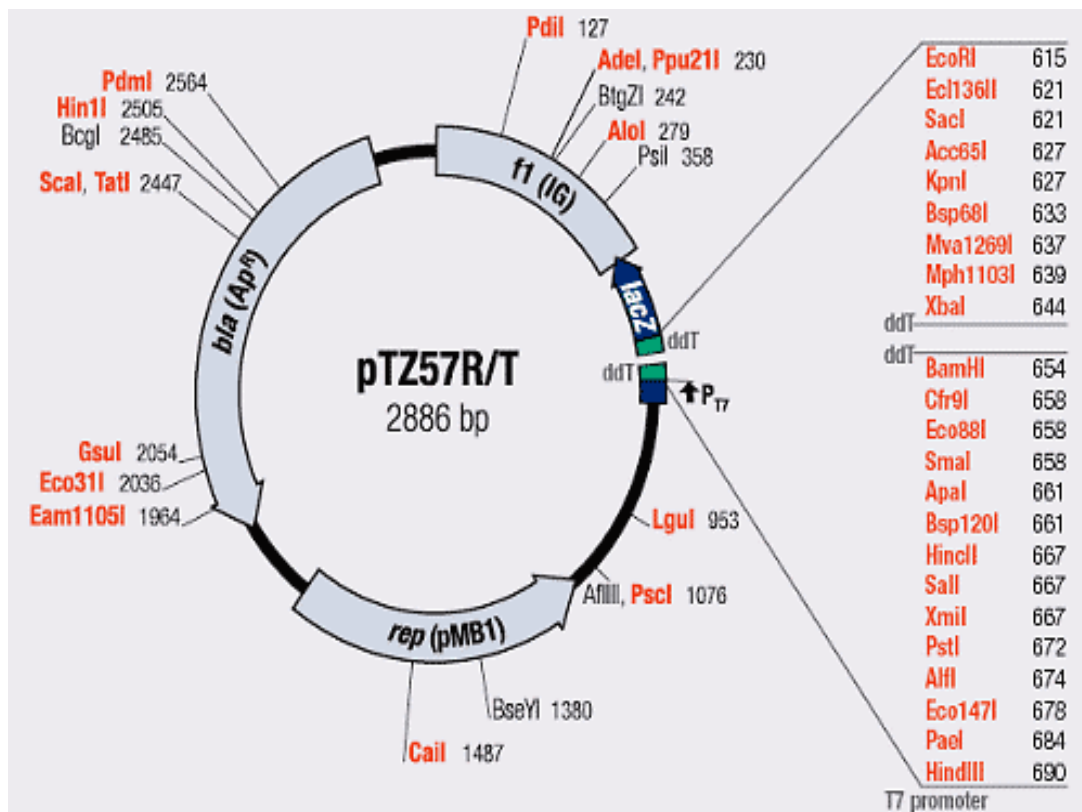


Figura 3. Mapa del Vector pTZ57R/T del Kit InsTAclone PCR de la compañía Fermentas diseñado para clonar fragmentos de ADN amplificados por PCR.

## **SUBCLONACIÓN Y LIGACIÓN DEL FRAGMENTO DEL GEN *Ehrad54* EN EL VECTOR pGEX6p1**

Una vez clonado el fragmento del gen *Ehrad54* en el vector pTZ57R/T y con la intención de expresar la proteína recombinante, fue necesario subclonar el gen *Ehrad54* en el vector de expresión pGEX6p1 diseñado para expresar un alto nivel de proteína recombinante. Además este vector posee un versátil polilinker, una secuencia que codifica Glutathion S – transferasa (GST) que facilitan etiquetar a la proteína y genes de resistencia a fármacos tales como la ampicilina, kanamicina y cloranfenicol para la selección de células transformantes.

La ligación se realizó bajo el siguiente esquema: 50 ng del vector pGEX6p1 linearizado, 150 ng del inserto *Ehrad54*, 7.5  $\mu$ l de amortiguador 5 X ligasa, 1  $\mu$ l de ligasa T4 (1 U/ $\mu$ l Invitrogen) en un volumen final de 35  $\mu$ l. La mezcla se incubó a 16° C toda la noche para obtener una ligación efectiva. Se transformaron bacterias *Escherichia coli* competentes con la mezcla de ligación, se seleccionaron candidatas positivas y se obtuvo su ADN plasmídico con el cual se realizaron ensayos de restricción enzimática y secuenciación automática para corroborar la identidad del fragmento clonado. El mapa del vector pGEX6p1 se muestra en la figura 4.

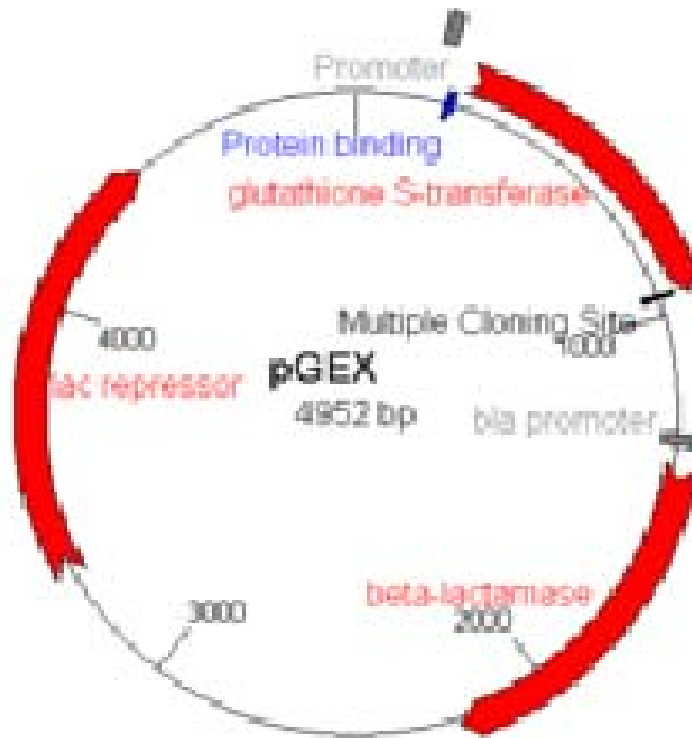


Figura 4. Mapa del Vector pGEX6p1 de la compañía GE Health Care, diseñado para expresar un alto nivel de proteína recombinante además de tener un versátil polilinker, una proteína de unión Glutation S – transferasa (GST) y genes de resistencia fármacos.

## PREPARACIÓN DE BACTERIAS COMPETENTES

### Bacterias competentes congeladas

Se utiliza la cepa de bacteria *E. coli*: *DH5 $\alpha$*  que permite la replicación de plásmidos y *BL21 pLysS DE3* para la expresión de la proteína recombinante. Para obtener células competentes a la transformación, las bacterias se crecieron en cajas Petri con medio LB (Luria-Bertoni)-agar (5g de medio LB, 3.75 g de agar selecto en un volumen total de 250 ml de agua bidestilada) a 37° C toda la noche.

Se recolectaron aproximadamente 10 colonias de bacterias de 2-3 mm de diámetro y se incubaron en un matraz Erlenmeyer con 100 ml de medio LB (20 g de LB en 1 L de agua bidestilada) a 37° C en agitación moderada (225 rpm) hasta que el cultivo alcanzó una densidad óptica de 0.4 – 0.5 a una longitud de onda de 600 nm. Se colectó el cultivo en tubos Falcon de 50 ml y se mantuvo en hielo 15 min. Se centrifugó a 1000 x g (3000 rpm en una centrífuga clínica) durante 15 min a 4° C y posteriormente se eliminó el sobrenadante. Las pastillas se secaron invirtiendo los tubos en papel absorbente.

Las pastillas secas se resuspendieron y se juntaron en una sola, mezclando moderadamente en solución RF1 (RbCl 100mM, MnCl<sub>2</sub>.4H<sub>2</sub>O 50mM, CH<sub>3</sub>COOK 30 mM, CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O 10mM, Glicerol 15%, pH 5.8) cuyo volumen de acuerdo a protocolo es 1/3 del volumen inicial (100 ml). Se incubaron las células en hielo por 5 minutos. Se centrifugaron bajo las mismas condiciones y se secó la pastilla.

Se resuspendieron las células en solución RF2 (Mops 10mM, RbCl 10mM CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O 75mM, Glicerol al 15%, pH 6.8) utilizando 1/12.5 del volumen original de 100 ml. Se incubaron las bacterias en hielo durante 15 min, se hicieron alícuotas en tubos eppendorf de 0.5 ml las cuales fueron congeladas rápidamente en nitrógeno líquido y guardadas a -70° C hasta su utilización.

## **Bacterias competentes frescas.**

Al igual que para las bacterias congeladas, comenzamos a partir de una caja con crecimiento de bacterias *E. coli*: tanto *DH5α* como *BL21 pLysS DE3*, se tomó una asada de las mismas y se crecieron en un tubo de ensayo con tapa tipo rosca que contenía 5 ml de medio LB. Se dejó en agitación a 250 rpm a 37°C toda la noche (12 – 14 horas). De este precultivo se tomaron 400 µl y se inocularon en un matraz Erlenmeyer con 40 ml de medio LB. Se dejaron creciendo a 37°C a 250 rpm hasta alcanzar una densidad óptica ideal de 0.4 a 0.6, el tiempo aproximado es de 2 horas con 30 minutos; la medición de la densidad óptica se realizó a 600 nm. Se colocó el cultivo en un tubo cónico nuevo estéril y se centrifugó a 5000 rpm a 4°C por 10 minutos. Una vez obtenida la pastilla se vació el sobrenadante quitando el exceso del medio con punta estéril. La pastilla se resuspendió de forma sutil con 600 µl de CaCl<sub>2</sub> a una concentración de 50 mM estéril y frío (stock de CaCl<sub>2</sub> · 2 H<sub>2</sub>O J. T. Baker PM 147.02). Se centrifugó a 5000 rpm a 4°C por 10 minutos, se desechó el sobrenadante y se quitó el exceso con punta estéril. Se agregaron 2 ml de CaCl<sub>2</sub> a una concentración de 50 mM estéril y frío resuspendiendo delicadamente la pastilla hasta disolver. Las células tienen una vida útil de una semana y deben refrigerarse a 4°C.

## **TRANSFORMACIÓN DE BACTERIAS COMPETENTES POR CHOQUE TÉRMICO**

A 200 µl de bacterias competentes frescas o 70 µl de células congeladas (*DH5α* o *BL21 pLysS DE3*) se agregaron 5 µl de la mezcla de ligación o de la construcción vector – inserto lograda. La mezcla se incubó en hielo 30 min, después a 42° C durante 90 segundos y nuevamente en hielo por 5 minutos, posteriormente se adicionaron 200 µl de medio LB en condiciones de esterilidad. La transformación fue incubada con agitación a 250 rpm durante 45 minutos a 37° C para después espatular la mezcla con asa de vidrio en condiciones de esterilidad en cajas LB agar con 50 mg/ml de ampicilina. Una vez espatuladas las bacterias se incubaron las cajas a 37° C toda la noche. Al siguiente día, se tomaron varias colonias al

azar, de las cuales se extrajo el ADN plasmídico para verificar la presencia del inserto por PCR y posteriormente secuenciarlo para corroborar la identidad del inserto en el vector.

## **MINIPREPARACIÓN DE ADN PLASMÍDICO**

Para verificar la clonación y subclonación se seleccionaron diez colonias de las bacterias *DH5 $\alpha$*  transformadas con la construcción pTZ57R/T - *Ehrad54* y diez colonias de las bacterias *BL21 pLYsS DE3* transformadas con la construcción pGEX6p1- *Ehrad54*, con las que se inocularon tubos de ensayo con 5 ml de medio LB con ampicilina (50 mg/ml) que se incubaron toda la noche a 37°C a 250 rpm. Se hicieron alícuotas en tubos eppendorf de 1.5ml y se centrifugaron 1 min a 14,000 rpm, desechando el sobrenadante. Se agregó a cada tubo 100  $\mu$ l de solución I (50mM Glucosa, 25mM Tris-Cl pH 8.0, 10mM EDTA pH 8.0) y se agitó vigorosamente en vortex.

Se agregaron 200  $\mu$ l de solución II a cada tubo (0.2 N NaOH, 1% SDS), se agitaron invirtiéndolos cinco veces rápidamente y se incubaron en hielo durante 5 minutos. Posteriormente se agregaron 150  $\mu$ l de solución III fría (60 ml de CH<sub>3</sub>COOK 5M, 11.5 ml de CH<sub>3</sub>COOH y 28.5 ml de H<sub>2</sub>O, la solución resultante será de 3M con respecto al potasio y 5M con respecto al acetato). Los tubos fueron agitados de forma invertida en vortex durante 10 segundos. Se incubaron nuevamente en hielo durante 5 minutos para después centrifugarlos a 14,000 rpm durante 5 minutos. Se recuperó el sobrenadante con mucho cuidado, a éste se le agregó 300  $\mu$ l de etanol al 100%, se mezcló con vortex y se incubó a temperatura ambiente durante 3 minutos para precipitar el ADN.

Se centrifugó nuevamente a 14,000 rpm durante 5 minutos para obtener la pastilla, se retiró el sobrenadante y se invirtió cada tubo sobre papel absorbente. La pastilla se lavó con 300  $\mu$ l de etanol al 70%, se centrifugó a 14,000 rpm durante 5 min, se retiró el sobrenadante y se invirtió nuevamente el tubo. Este paso de lavados con etanol al 70% se repitió 2 veces. La pastilla se dejó secar aproximadamente 1 hr a temperatura ambiente. Se agregaron 30  $\mu$ l de agua bidestilada y 1  $\mu$ l de RNAasa 40 U/ $\mu$ l. Se incubó a 37°C durante 30 min.

El ADN plasmídico obtenido, se analizó por restricción enzimática utilizando las enzimas *Bam*HI y *Xho*I (Invitrogen) y electroforesis en gel de agarosa al 1% en amortiguador TAE 1X. El gel se tiñó en una solución de Bromuro de etidio y se observó en el transiluminador de luz UV. Se tomó una clona positiva al azar para secuenciarla y comprobar así la identidad del inserto clonado.

## **PURIFICACIÓN DEL ADN PLASMÍDICO**

Para la purificación del ADN plasmídico, se utilizaron las columnas y el protocolo de Qiaprep Miniprep Handbook (Qiagen), con el que se obtienen 20 µg de plásmido de un cultivo de 5 ml de bacterias *Escherichia coli* DH5 alfa transformadas con el plásmido pTZ57R/T-*Ehrad54* y *BL21 pLysS DE3* transformadas con la construcción pGEX6p1-*Ehrad54*.

El cultivo fue centrifugado a 14000 rpm durante 15 minutos a 4°C, una vez obtenida la pastilla, esta fue resuspendida en 250 µl de Buffer de lisis P1 (50 mM Tris-Cl pH 8.0, 10 mM EDTA, 100 µg/ml RNasa A) y transferida a un tubo eppendorf de 1.5 ml, posteriormente se adicionaron 250 µl de Buffer P2 (200 mM NaOH, 1% SDS), se mezcla el tubo invirtiéndolo 6 veces para posteriormente incubarlo a temperatura ambiente por 5 minutos. Se adicionaron 350 µl de Buffer N3\* y nuevamente se mezcló invirtiendo suavemente el tubo en 6 ocasiones, se centrifugó 10 minutos a 13000 rpm.

## **RESTRICCIÓN ENZIMÁTICA Y PURIFICACIÓN DE ADN**

Para verificar la inserción del fragmento de PCR en el vector pTZ57R/T, se realizó una digestión enzimática del plásmido recombinante pTZ57R/T -*Ehrad54* para liberar el inserto, utilizando 1 µl de las enzimas *Bam*HI (10 U/µl) (Invitrogen) y 2 µl de *Xho*I (10 U/µl) (Invitrogen), 2 µl de Buffer *Bam*HI (Invitrogen) y 1 µg del plásmido pTZ57R/T - *Ehrad54*. Se incubó toda la noche a 37°C. También, se realizó una digestión enzimática de 1 µg del plásmido de expresión pGEX6p1 (GE-Health Care), en las mismas condiciones para linearizarlo. Una vez que el

fragmento del gen *Ehrad54* fue subclonado en el vector pGEX6p1 se realizaron ensayos de restricción similares para corroborar la presencia del inserto.

Las reacciones de restricción se analizaron por electroforesis en un gel de agarosa TBE al 1%. Los fragmentos de ADN (inserto y pGEX6p1) se purificaron del gel de agarosa-TAE 1X por absorción a perlas de vidrio utilizando el kit Gene Clean II (BIO 101). Las bandas correspondiente al ADN a purificar se cortaron del gel, se pesaron y se mezclaron con 3 volúmenes de NaI 4.5 M a un pH de 6. Para disolver la mezcla agarosa-ADN-NaI, los tubos se incubaron por 10 min a 55°C, enseguida se les agregó 5 µl de perlas de vidrio y se incubaron toda la noche a 4°C. Posteriormente la muestra se centrifugó a 13,000 rpm en una centrífuga Eppendorf por 30 segundos y la pastilla se lavó 3 veces con 500 µl de solución de lavado New Wash preparado a partir de 14 ml de New Wash concentrado (solución de NaCl, Tris y EDTA) y 280 ml de agua destilada. Se dejó secar la pastilla en un baño seco a 42°C. Para eluir finalmente el ADN de las perlas, se resuspendieron en 10 µl de agua estéril y se incubaron por 10 min en baño María a 55°C. Las perlas se centrifugaron a 14,000 rpm por 1 min y se recuperó el sobrenadante que contiene el ADN. El último paso de la purificación se repitió por segunda vez para recuperar una mayor cantidad de ADN.

## **ELECTROFORESIS DE ADN EN GEL DE AGAROSA**

El producto obtenido de la amplificación del fragmento interno de 581 pb del gen *Ehrad54* así como las distintas muestras de ADN obtenidas fueron analizadas mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%, mismo que se realizó utilizando 1 g de agarosa (SeaKem), por cada 100 ml de solución TAE 1X (Tris-acetato 0.04 M (ROI) y EDTA 0.001M (J.T. Baker). La mezcla se fundió a 60°C hasta que la agarosa se incorporó perfectamente a la solución. Posteriormente esta solución se vació en un molde para geles, al cual se le puso el peine adecuado. Una vez solidificado el gel, éste se colocó en la cámara de electroforesis hasta cubrirlo con la solución amortiguadora de corrida TAE 1X. Las muestras se cargaron en una gota de buffer de carga (5µl), el cual se preparó con Formamida al 98% (SIGMA), EDTA 0.5 M (J.T. BAKER), azul de bromofenol al 0.025% (USB) y xilen cyanol al



0.025% (SIGMA). La electroforesis se realizó a 100 V hasta que los dos colorantes del Buffer de carga se separaron dividiendo el gel en tres partes. Para poder observar el ADN, se sumergió el gel completo en una solución de Bromuro de Etidio al 0.01% visible con luz UV a 310 nm y se registró en el Fotodocumentador.

## **MAXI-PREPARACIÓN DE ADN PLASMÍDICO**

Para la realización de este proceso se utilizó el Kit MAXI de Qiagen. A partir del precultivo de 5 ml de medio LB con bacterias *DH5a* transformadas con la construcción *pTZ57R/T-Ehrad54* y *BL21 pLysS DE3* transformadas con la construcción *pGEX6p1-Ehrad54* se tomaron 500 µl para inocular 500 ml de medio LB con 500 µl de ampicilina (50 mg/ml). Este cultivo se dejó creciendo en agitación toda la noche a 250 rpm a 37°C.

Los 500 ml de cultivo se empastillaron en un tubo cónico estéril centrifugándolo a 6000 rpm por 15 minutos a 4°C. Una vez formada la pastilla se decantó el medio y se resuspendió en 10 ml de Buffer P1 refrigerado a 4°C. Una vez disuelta la pastilla se agregaron 10 ml de Buffer P2 (solución de proteasas alcalinas) y se mezcló el tubo invirtiéndolo 6 veces para posteriormente incubarlo a temperatura ambiente por 5 minutos, al ser la lisis efectiva la mezcla de reacción tomó una coloración azul. Se adicionaron 10 ml de Buffer P3 (neutralizante) mezclando inmediatamente por inversión el tubo 6 veces para posteriormente incubarlo en hielo por 20 minutos. Se centrifugó a 5500 rpm por 30 minutos a 4°C. Se removió el sobrenadante que contiene el ADN plasmídico que nuevamente se centrifugó a 5500 rpm a 4°C por 15 minutos. Finalmente se removió el sobrenadante que contiene el ADN plasmídico.

Se equilibró la columna de filtración y a esta se le agregaron 10 ml de Buffer QBT dejando que este bajara por gravedad. Terminado el proceso se agregó a la columna el sobrenadante que contiene del ADN plasmídico, dejándolo caer por gravedad. En un tubo cónico limpio se realizaron dos lavados de 30 ml a la columna con Buffer QC. Se cambió el tubo cónico a uno nuevo estéril donde se eluyó el ADN agregando a la columna 15 ml de Buffer QF.

Se retiró la columna de filtración y se le agregó al eluido 15 ml de Isopropanol a temperatura ambiente para precipitar el ADN. Se mezcló y centrifugó inmediatamente a 5500 rpm por 1 hora y media a 4°C. Se decantó el sobrenadante quitando el exceso con punta estéril. Se localizó y marcó el pellet dejándolo secar. Finalmente se adicionaron 500 µl de agua estéril en los que se resuspende el pellet. El ADN plasmídico expandido fue almacenado a menos 20°C.

### **INDUCCIÓN DE LA EXPRESIÓN DEL POLIPÉPTIDO RECOMBINANTE.**

Las células *BL21 (DE3) plysS* competentes fueron transformadas con la construcción pGEX6p1-*Ehrad54* siguiendo el procedimiento ya comentado. Al siguiente día se picaron las colonias obtenidas de la transformación y se sembraron en 5 ml de medio 2TY realizado con 16 g de triptona (DIFCO), 10 g de extracto de levadura (BIOXON) y 5 g de NaCl (J.T. BAKER) en 1 litro de agua, con 50 µg/ml de ampicilina (SIGMA) y 50 µg/ml de cloranfenicol (SIGMA). Las células fueron crecidas toda la noche en agitación a 37°C. Posteriormente 5 ml de este medio de cultivo se pasaron a matraces que contenían 245 ml de medio 2TY y 50 µg/ml de ampicilina y 50 µg/ml de cloranfenicol. Las bacterias fueron incubadas a 37°C por aproximadamente 90 minutos hasta alcanzar una densidad óptica desde 0.40 a 0.60 a una longitud de onda de 600 nm. Se le agregó isopropil-β-D-thiogalactopiranoside (IPTG) 1mM y se dejó en agitación a 36°C a 225 rpm por una, tres y cinco horas, así como toda la noche de inducción. Al finalizar la inducción se repartió el cultivo en tubos Falcon de 50 ml. Los tubos se centrifugaron por 5 min a 14,000 rpm, se retiraron los sobrenadantes y se agregaron 2 ml de medio 2TY a cada uno, resuspendiendo y juntando los productos de cada tubo. Finalmente, las bacterias se centrifugaron por 1 minuto a 14,000 rpm y se retiró el sobrenadante. Las pastillas obtenidas se guardaron a -20° hasta su utilización. Las proteínas se analizaron por electroforesis en geles desnaturalizantes para proteínas SDS PAGE y ensayos de Western Blot para corroborar la inducción de la expresión del péptido recombinante.

## **CULTIVO DE TROFOZOÍTOS Y SU IRRADIACIÓN CON LUZ-UV C**

En este trabajo, se utilizaron trofozoitos HM1:IMSS para determinar la sublocalización celular de la proteína EhRAD54. Los trofozoítos se cultivaron en medio TYI-S-33 complementando con 20% de suero fetal bovino y 6% de la mezcla de vitaminas a 37° C (Diamond *et al.*, 1978). Los trofozoitos ( $1.5 \times 10^6$ ) crecidos en botellas de cultivo fueron transferidos en platos de cristal e incubados a 37°C. Los trofozoitos adheridos fueron irradiados con luz UV-C de 254 nanómetros en  $150 \text{ J m}^{-2}$  por 8 segundos usando un dispositivo UV 1800 de Stratalinker 1800 – Stratagene (López-Casamichana *et al.*, 2008). Después del tratamiento, las células fueron incubadas en medio fresco en 37°C por 5, 30 min y 3 horas antes de ser cosechados para preparar los ensayos proteicos.

## **OBTENCIÓN DE EXTRACTOS NUCLEARES Y CITOPLÁSMICOS**

El cultivo de trofozoítos con y sin tratamiento con luz UV se colocó en hielo durante 10 minutos para que las amibas se despegaran de la caja y pudieran vaciarse en un tubo Falcon de 50ml. Se centrifugaron durante 7 minutos a 2000 rpm a 4°C decantando el sobrenadante. Se resuspendió la pastilla en 1 ml de PBS y se transfirió a un eppendorf de 1.5 ml. Se centrifugó 15 segundos a 14,000 rpm y se decantó el PBS. Se resuspendió la pastilla en 400  $\mu\text{l}$  de buffer A frío (10mM HEPES pH 7.9; 10mM KCl; 0.1 mM EDTA; 0.1 mM EGTA; 1mM DTT; 0.5m M PMSF) pipeteando suavemente. Se esperó a que las células se hincharan durante 15 minutos a 4°C y se adicionaron 25  $\mu\text{l}$  de solución de Nonidet NP-40 al 10%, y 2  $\mu\text{l}$  de coctel inhibidor de proteasas (PMSF 0.5mM, Benzamidina 2mM, Aprotinina 5  $\mu\text{g/ml}$ , Pepstatina A 5 $\mu\text{l/ml}$ , E64 10  $\mu\text{g/ml}$ , Leupeptina 5  $\mu\text{l/ml}$ ), agitando vigorosamente durante 10 seg. Se centrifugó por 30 segundos y el sobrenadante correspondiente a la fracción citoplásmica (RNA y proteínas) se recolectó (Schreiber *et al.*, 1989).

La pastilla con los núcleos se resuspendió en 50  $\mu\text{l}$  de buffer C frío (20mM HEPES pH 7; 0.4M NaCl; 1mM EDTA; 1mM DTT; 1mM PMSF; 1mM EGTA), y 1  $\mu\text{l}$  del coctel de inhibidores de proteasas y se agitó vigorosamente en vortex durante 20 minutos a 4°C. La muestra se centrifugó 5 minutos a 4°C y se recolectó el

sobrenadante correspondiente a la fracción nuclear. Las fracciones citoplásmicas y nucleares se alicuotaron y se guardaron a -70°C hasta su utilización.

Una alícuota de las fracciones nucleares y citoplásmicas se utilizó para determinar la concentración de proteínas por el método de Bradford y para verificar la integridad de los extractos por SDS-PAGE. Posteriormente, los extractos nucleares y citoplásmicos se analizaron por ensayos de Western blot para determinar la localización subcelular de EhRAD54 en los trofozoítos utilizando los anticuerpos específicos generados en ratón.

## **ENSAYOS DE WESTERN BLOT**

Para conocer la calidad de los anticuerpos anti- PAS EhRAD54 contenidos en el suero de los ratones y la localización subcelular de EhRAD54 en trofozoítos se realizaron ensayos de Western Blot.

Las proteínas separadas por SDS-PAGE al 10% fueron electrotransferidas a membranas de nitrocelulosa en un Buffer de transferencia (Tris Base 0.3%, Glicina 1.4%, metanol 20%) frío, a 400 mA durante 1 hora y 30 minutos en un contenedor con hielo, en el sistema Minitrans Blot (Bio-Rad) en el siguiente orden: base negra (polo negativo, fibra, papel Wathman, gel, membrana de nitrocelulosa, papel Wathman, fibra y base blanca (polo positivo). En cada elemento se evitó la formación de burbujas con una pipeta Pasteur.

La transferencia de las proteínas a la membrana se verificó mediante la tinción con una solución de Rojo de Ponceau (Rojo de Ponceau al 0.1%, ácido acético al 1%), ya teñida la membrana se marcaron con lápiz los bordes del gel, los marcadores y las referencias de nuestras muestras. La membrana se destiñó con agua y se bloqueó durante toda la noche en solución PBS (NaCl 0.8%, KCl 0.02%, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.14%, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.024%, pH 7.4 con HCl), leche descremada al 5% y Tween 0.05% en agitación suave a 4°C. Posteriormente se realizaron 3 lavados con PBS-Tween 0.05% durante 5 minutos con agitación suave a temperatura ambiente.

En el ensayo realizado para conocer la funcionalidad de los anticuerpos anti-PAS EhRAD54, se incubó con el anticuerpo contenido en el suero de ratón a diferentes diluciones durante toda la noche a 4°C en agitación suave. Se lavó con PBS para posteriormente incubarlo con el segundo anticuerpo de cabra dirigido contra la inmunoglobulina G de ratón y marcado con peroxidasa, en una solución de PBS pH 7.4 y 2% de BSA a una dilución 1:2000 durante 2 horas a temperatura ambiente.

Para identificar a la proteína recombinante EhRAD54 se utilizaron anticuerpos anti- GST (GE Health care) a una dilución de 1:2000 y como segundo anticuerpo a una dilución 1:10000 HRP conejo contra IgG de cabra tomando como base a un membrana de nitrocelulosa con la transferencia de extractos bacterianos inducidos a diferentes tiempos.

Para identificar a la proteína EhRAD54 endógena se utilizaron anticuerpos anti – PAS EhRAD54 a una dilución 1:500 y como segundo anticuerpo HRP anti – IgG de ratón a una dilución 1:2000 tomando como base a un membrana de nitrocelulosa con la transferencia de extractos proteicos fraccionados de trofozoitos irradiados y cosechados posteriores al daño con luz UV.

La membrana se secó a temperatura ambiente y se reveló con el kit de quimioluminiscencia ECL plus Western Blotting detection system (Amersham Biosciences). Se mezclaron 2 ml del buffer A (sustrato de ECL plus) con 50 µl de buffer B (solución acridan con dioxano y etanol). Se bañó la membrana con esta mezcla utilizando aproximadamente 0.1 ml/cm<sup>2</sup>, dejando actuar por 5 min. Pasado este tiempo se retiró la solución, se seca agitándola firmemente y se envolvió en una bolsa de plástico transparente perfectamente limpia, cuidando de no dejar burbujas en su interior. Por último se fijó en un cassette de revelado de radiografía, con la cara hacia arriba. Se trabajó en cuarto oscuro con una placa de radiografía (Kodak) sobre la membrana y se cerró el cassette. Los tiempos en los que permaneció la placa de radiografía en el cassette van desde 5 segundos hasta un minuto. Después de retirar la placa del cassette, ésta se puso en un envase que contenía solución de revelado al 20% (Kodak) y se esperó aproximadamente 30 segundos. Después se enjuagó con agua y se pasó a un envase con solución de fijación al 20% (Kodak) en donde se deja por 2 min. La

placa se enjuagó nuevamente con agua, y se dejó colgada para retirar el excedente hasta que secó completamente.

### **ENSAYOS DE DOT – BLOT**

Para confirmar la calidad de los anticuerpos anti- PAS EhRAD54 contenidos en el suero de los ratones se realizaron ensayos de Dot blot. En este ensayo se cortaron membranas de nitrocelulosa para obtener círculos de 0.5 cm de diámetro, estos fueron impregnados justo en el centro de cada círculo con 5 µl del péptido antigénico sintético EhRAD54, se permitió que este se secase completamente en la membrana y posteriormente se incubaron con el anticuerpo contenido en el suero de ratón a diferentes diluciones durante toda la noche a 4°C en agitación suave. Se lavaron con PBS para posteriormente incubarlos con el segundo anticuerpo de cabra dirigido contra la inmunoglobulina G de ratón y marcado con peroxidasa, en una solución de PBS pH 7.4 y 2% de BSA a una dilución 1:2000 durante 2 horas a temperatura ambiente.

Las membranas se secaron a temperatura ambiente y se revelaron con el kit de quimioluminiscencia ECL plus Western Blotting detection system (Amersham Biosciences), como se describió anteriormente.

# RESULTADOS

## IDENTIFICACIÓN DE SECUENCIAS PROMOTORAS CONSERVADAS.

En este trabajo se analizaron las secuencias promotoras (500 pb antes del ATG) de los genes sobreexpresados a los 5 minutos y 3 horas después de la irradiación con luz UV y que presentan un Fold change mayor a 2 en comparación con el control no irradiado, además de los 10 genes involucrados en reparación del ADN y que mostraron un Fold change inferior a 2, es decir, un total de 29 secuencias entre las que se incluyó al gen *Ehrad54*. También se analizó la secuencia del promotor del gen *Ehrad54b*.

Ya que se contaba con estas secuencias lo primero fue conocer su frecuencia nucleotídica y su entropía, ambos parámetros fueron determinados utilizando el programa Bioedit. De manera general podemos observar que estas secuencias son más ricas en adenina (A) y timina (T), que en citocina (C) y guanina (G). En particular, se determinó que contienen un 69% de A y T y un 31% de C y G (Figura 5 A).

Por otra parte, se determinó la entropía en estas secuencias promotoras, entendiendo por entropía como el contenido de información en relación a la posición de cada nucleótido. Como se observa en la figura 4 B hay regiones de baja entropía localizadas principalmente entre nucleótidos cuya posición van de -400 a -100 de acuerdo al ATG, lo que se traduce en un aumento en la cantidad de información, por lo que podemos pensar que estas regiones contienen secuencias reguladoras conservadas; sin embargo, el gráfico no es muy informativo debido al pequeño número de secuencias analizadas (Figura 5 B).

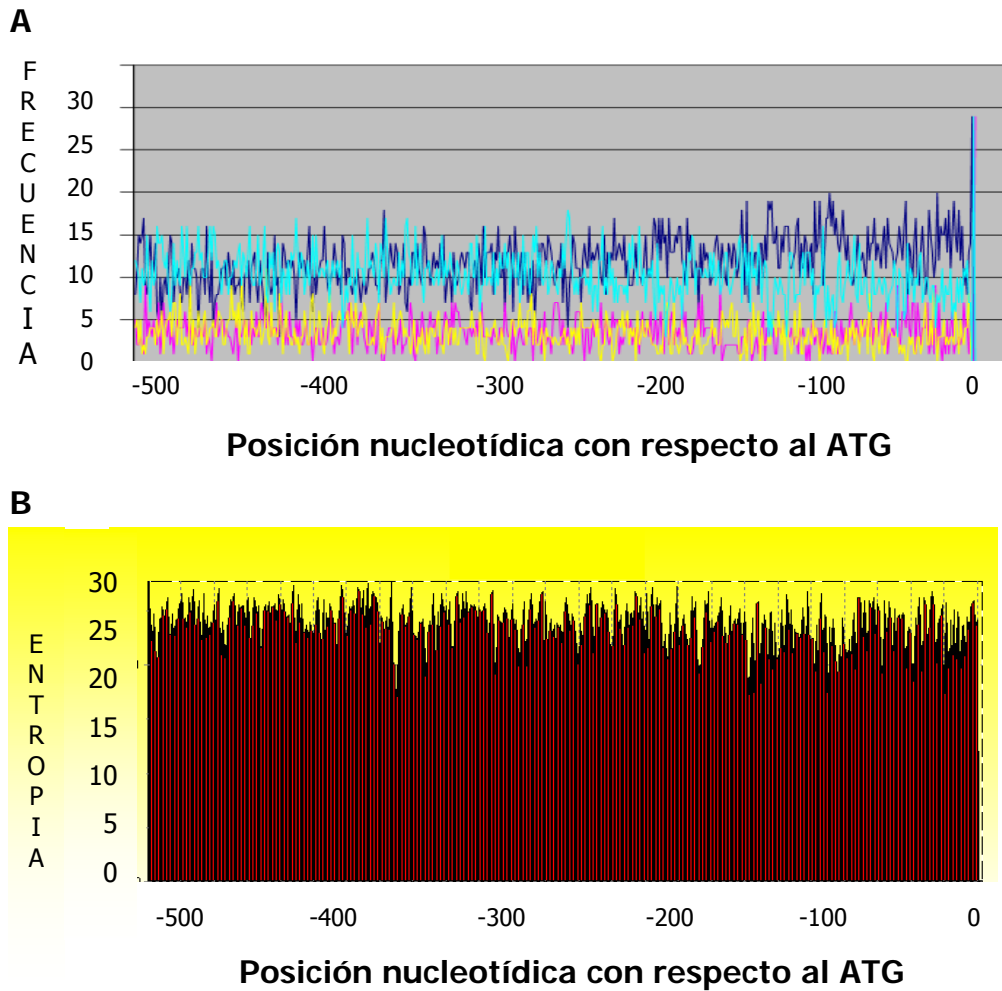


Figura 5. Análisis de la secuencia nucleotídica de los promotores de genes sobreexpresados a los 5 minutos después de la irradiación con luz UV.

A) Frecuencia nucleotídica. B) Entropía.



Lo siguiente fue identificar secuencias reguladoras previamente reportadas en los promotores de genes de *E. histolytica*. Observamos que en solamente tres de las siete secuencias promotoras de genes inducidos a los 5 minutos por el tratamiento con luz UV se encuentran dos de los tres motivos del inicio de la transcripción en este parásito protozoario, a saber, la caja TATA (TATTTAAAG/C) y el elemento Iniciador o Inr (AAAAATTCA), careciendo del elemento GAAC; además una de las secuencias cuenta con el elemento URE 4 (AAAAATGAA), cuatro de las siete secuencias cuentan con el elemento HSE (CNNGAAGAATTC), seis de las siete secuencias tienen por lo menos un motivo reportado como de muy alta sobreexpresión (M43 - GGGTTT, M35 - TTTTCTTTTG, M33 - TT/AA/CTTAACA y M29 - TAATA/GGAAGAGAT) y dos de las siete secuencias analizadas cuentan con un elemento M15 (A/TTTTCTTTG/TC) reportado en genes que muestran una moderada sobreexpresión. De forma interesante podemos mencionar que la presencia de este último motivo condiciona una disminución en las veces de sobreexpresión de los genes, ya que en su generalidad muestran un fold change menor a 2 cuando M15 esta presente (Figura 6).

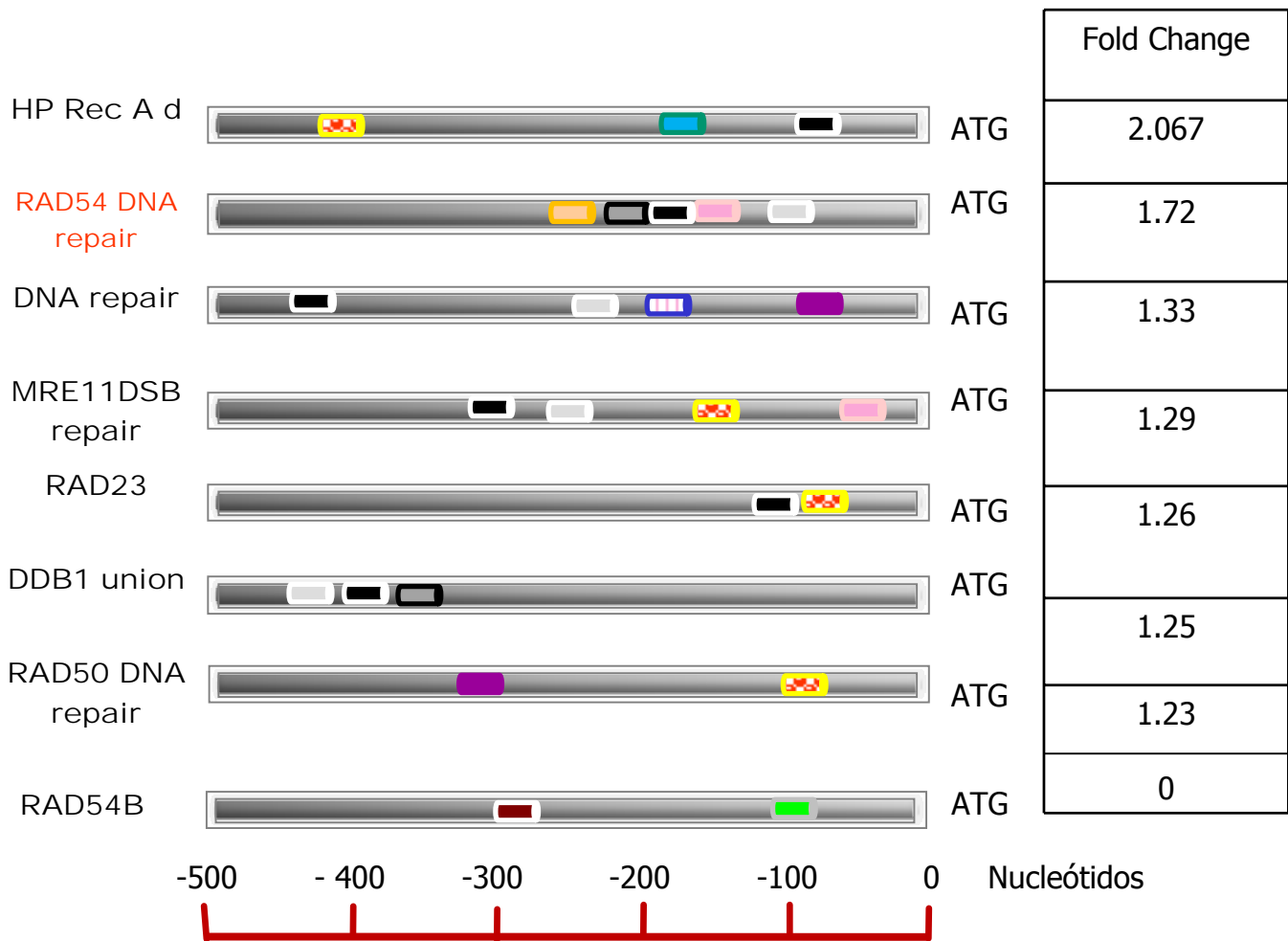
De manera interesante, el promotor del gen *Ehrad54* no contiene ninguno de los elementos reportados como importantes para el inicio de la transcripción, pero contiene tres motivos reportados en genes con elevada sobreexpresión como M43 (GGGTTT), M33 (TT/AA/CTTAACA) y M29 (TAATA/GGAAGAGAT) y un motivo M15 (A/TTTTCTTTG/TC) de moderada sobreexpresión. De la misma manera el promotor del gen parálogo *Ehrad54b* no contiene ninguno de los elementos reportados como importantes para el inicio de la transcripción, pero cuenta con dos motivos diferentes a los ya mencionados, siendo estos M32 (AAACAA) y M21 (ATGATANA), reportados en genes que muestran una elevada y moderada sobreexpresión, respectivamente.

En lo que respecta a las 22 secuencias promotoras de genes inducidos a las 3 horas posteriores de la irradiación de los trofozoitos con luz UV, se encuentra por lo menos alguno de los elementos transcripcionales más importantes, la caja TATA, el elemento Inr así como el cuadro GAAC (AA/TGAACT) en 19 de los 22 promotores, del mismo modo se encuentra en siete de las 22 secuencias el motivo HSE de respuesta a choque térmico, dos elementos de regulación río

arriba, URE 3 y URE 4, reguladores de genes *flx* y *hg/5*, respectivamente en seis de las 22 secuencias analizadas; nueve motivos conservados reportados en genes con elevada sobreexpresión, a saber, M44 (CCACGT), M43 (GGGTTT), M37 (A/TAAACCCT), M35 (TTTTCTTTTGC/TT), M33 (TT/AA/CTTAACA), M32 (ATA/TAAACAAC/AAA), M30 (C/TA/TGTTGA/TTG), M29 (TAATA/GGAAGAGAT) y M27 (CATCTCCA/TCTC/G) en 21 de las 22 secuencias; siete de las 22 secuencias cuentan con uno de los 2 motivos M24 (GAATGATG) y M15 (A/TTTTCTTTG/TC) reportados en genes con moderada sobreexpresión (Figura 7).

Una vez que identificamos en las secuencias promotoras de genes inducidos a los 5 minutos y a las 3 horas posteriores al tratamiento con luz UV, secuencias reguladoras ya reportadas en *E. histolytica*, lo siguiente fue realizar la búsqueda de motivos conservados utilizando las herramientas del programa MEME (<http://meme.sdsc.edu/meme4/intro.html>), nuevamente la búsqueda se dividió en genes sobreexpresados a los 5 minutos y a las 3 horas posteriores del daño con luz UV. Finalmente cada motivo predicho fue descrito mediante la base de datos JASPAR.

De esta forma observamos que el programa MEME predice para los promotores de genes sobreexpresados a los 5 minutos, tres secuencias reguladoras: el MOTIVO 1 (GGAAGAAAAAAGAAAGAA), encontrado en seis de las siete secuencias está relacionado con el sitio de unión del factor de transcripción Staf de *Xenopus laevis* descrito como un activador degenerado que mejora la transcripción de las RNA polimerasas II y III y como una secuencia de unión para el factor de transcripción Pax5 de *Mus musculus* descrito para la regulación de genes asociado con Aniridia y Síndrome de Waardenburg. El MOTIVO 2 (GCAAACGCAGATG) encontrado en dos de los siete promotores analizados, funge como secuencia de unión para los factores de transcripción HMG-IY y Pax5, relacionados con la regulación de genes asociados con Aniridia y Síndrome de Waardenburg y con una región positiva de regulación del gen promotor de plastocianina en *Pisum sativum*, respectivamente. El MOTIVO 3 (TTCTTTTGGTTGA) presente en todas las secuencias analizadas se identifica como una secuencia de unión al factor de transcripción FoxF2 (Rápido crecimiento de la familia de reguladores de transcripción eucariótica) y HMG-IY (Figura 8).



Posición nucleotídica con respecto al ATG

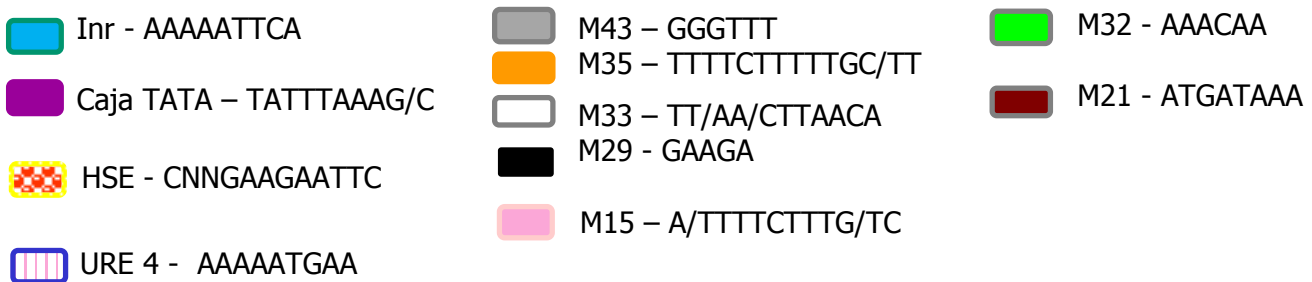


Figura 6. Identificación de secuencias reguladoras reportadas en los promotores de genes inducidos a los 5 minutos posteriores de la irradiación de trofozoitos con luz UV, así como en el promotor del gen *Ehrad54b*.

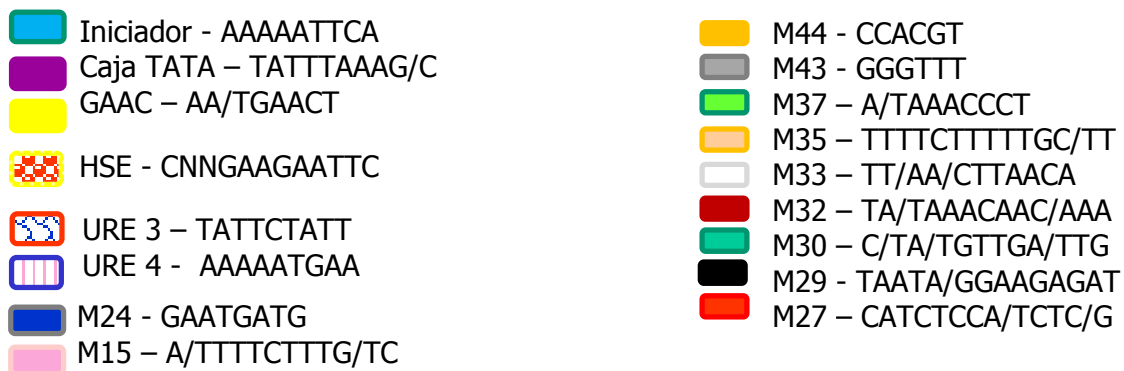
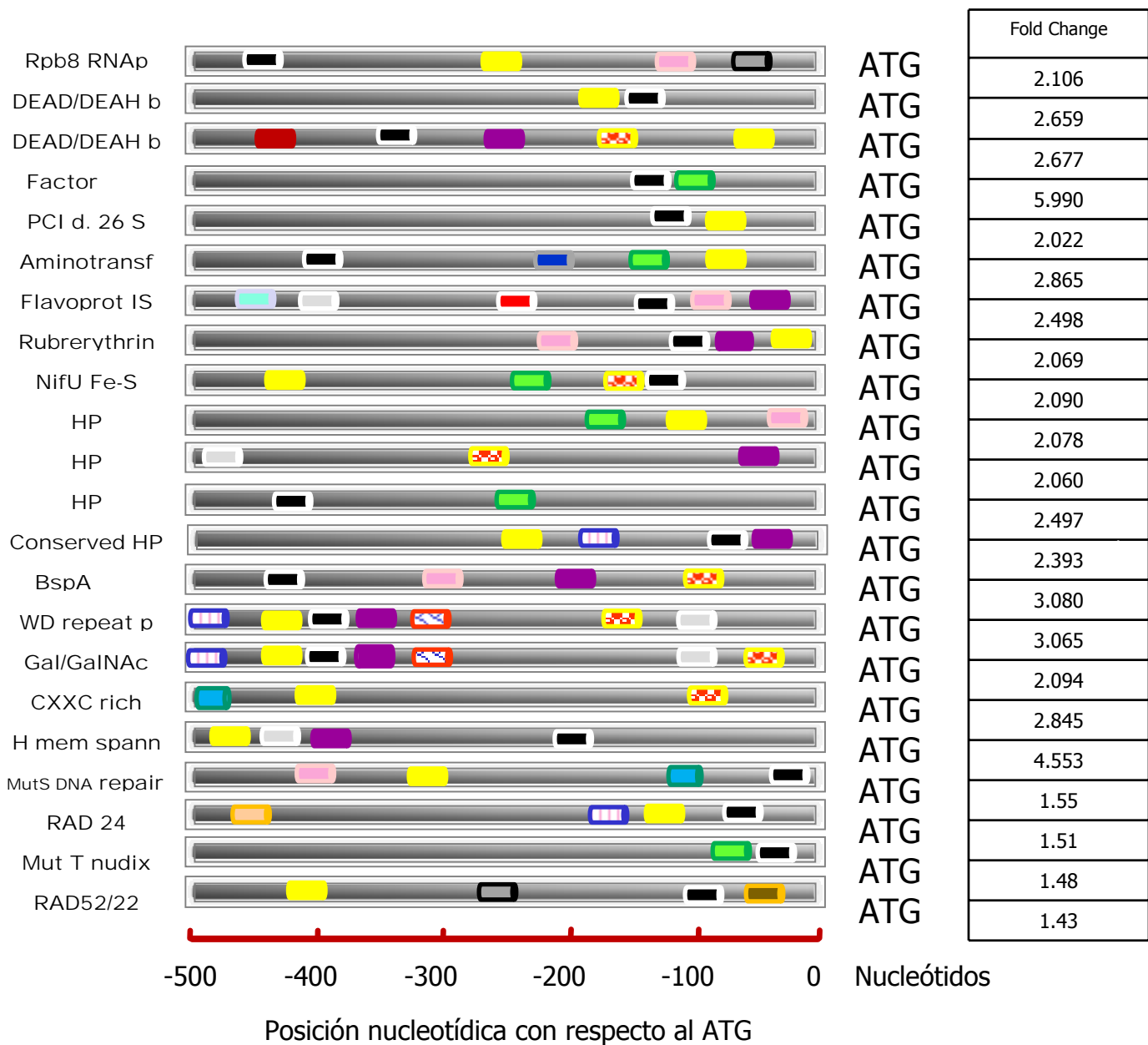


Figura 7. Identificación de secuencias reguladoras reportadas en las secuencias promotoras de genes inducidos a las 3 horas posteriores de la irradiación de trofozoitos con luz UV

De manera particular, el análisis de la secuencia promotora del gen *Ehrad54* muestra los tres motivos 1, 2 y 3 de los genes sobreexpresados a los 5 minutos posterior a la irradiación con luz UV. Estos motivos no se encontraron en el promotor del gen parálogo *Ehrad54b*.

Para las secuencias promotoras de genes sobreexpresados a las 3 horas, el programa MEME predice nuevamente otras secuencias reguladoras: el MOTIVO 4 (AAAGAAAAAAAAAAGAAAAA), encontrado en 20 de las 22 secuencias está relacionado con la unión de los factores de transcripción HMG-IY y Pax5 descritos como una región positiva de regulación del gen promotor de plastocianina y a la regulación de genes asociado con Aniridia y Síndrome de Waardenburg, respectivamente. El MOTIVO 5 (TAGAATAAAAGAAGA) encontrado en la totalidad de las 22 secuencias analizadas, funge como secuencia de unión para el factor de transcripción Squa que induce flexión de ADN y está relacionado con desarrollo de raíz, flores y frutos, así como a otro factor de transcripción HMG-IY (región positiva de regulación del gen promotor de plastocianina en *Pisum sativum*). El MOTIVO 6 (CTATATAACGATTCC) sólo se encuentra en seis de las 22 secuencias promotoras, identificándose como una secuencia de unión a factor de transcripción Ar descrito como ADN consenso que actúa como sitio de unión para el receptor de andrógenos y para una variante de Caja TATA (TBP – TATA box) que permite localizar el inicio de transcripción eucariótica (Figura 9).

Posteriormente se relacionaron las secuencias reguladoras predichas por el programa MEME en ambos grupos promotores y las secuencias reguladoras previamente reportadas en *E. histolytica*, de lo anterior ha resultado interesante el hallazgo de que el MOTIVO 1 (GGAAGAAAAAAAAAGAAAGAA), identificado en seis de los siete promotores de genes inducidos a los 5 minutos, y el MOTIVO 5 (TAGAATAAAAGAAGA) presente en todos los promotores de genes inducidos a las 3 horas, coinciden con el motivo M29 (TAATA/GGAAGAGAT) identificado en 28 de las 29 secuencias analizadas. Estos tres motivos comparten la secuencia GAAGA con el elemento de choque térmico HSE (CNNGAAGAATTC). Y ninguno de ellos esta presente en el promotor del gen *Ehrad54b*.

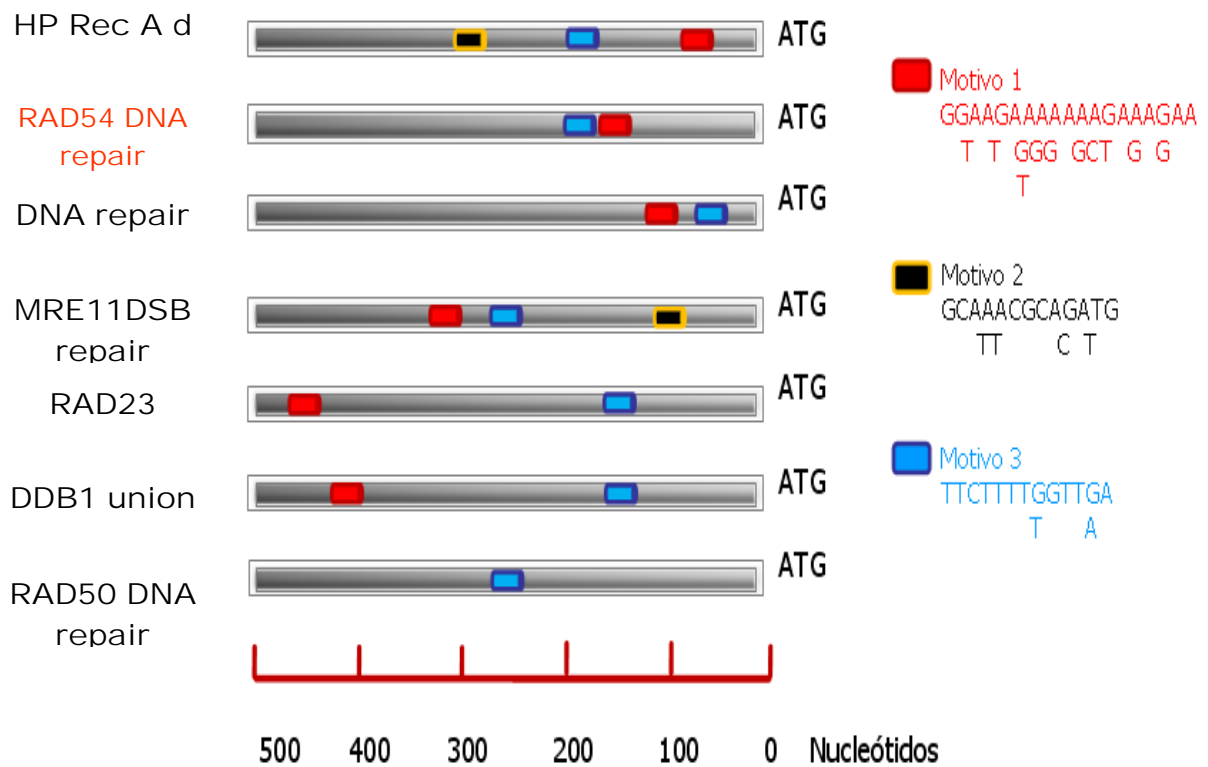


Figura 8. Identificación de secuencias reguladoras predichas por el programa MEME (<http://meme.sdsc.edu/meme4/intro.html>) en secuencias promotoras de genes inducidos a los 5 minutos posteriores de la irradiación de trofozoitos con luz UV.

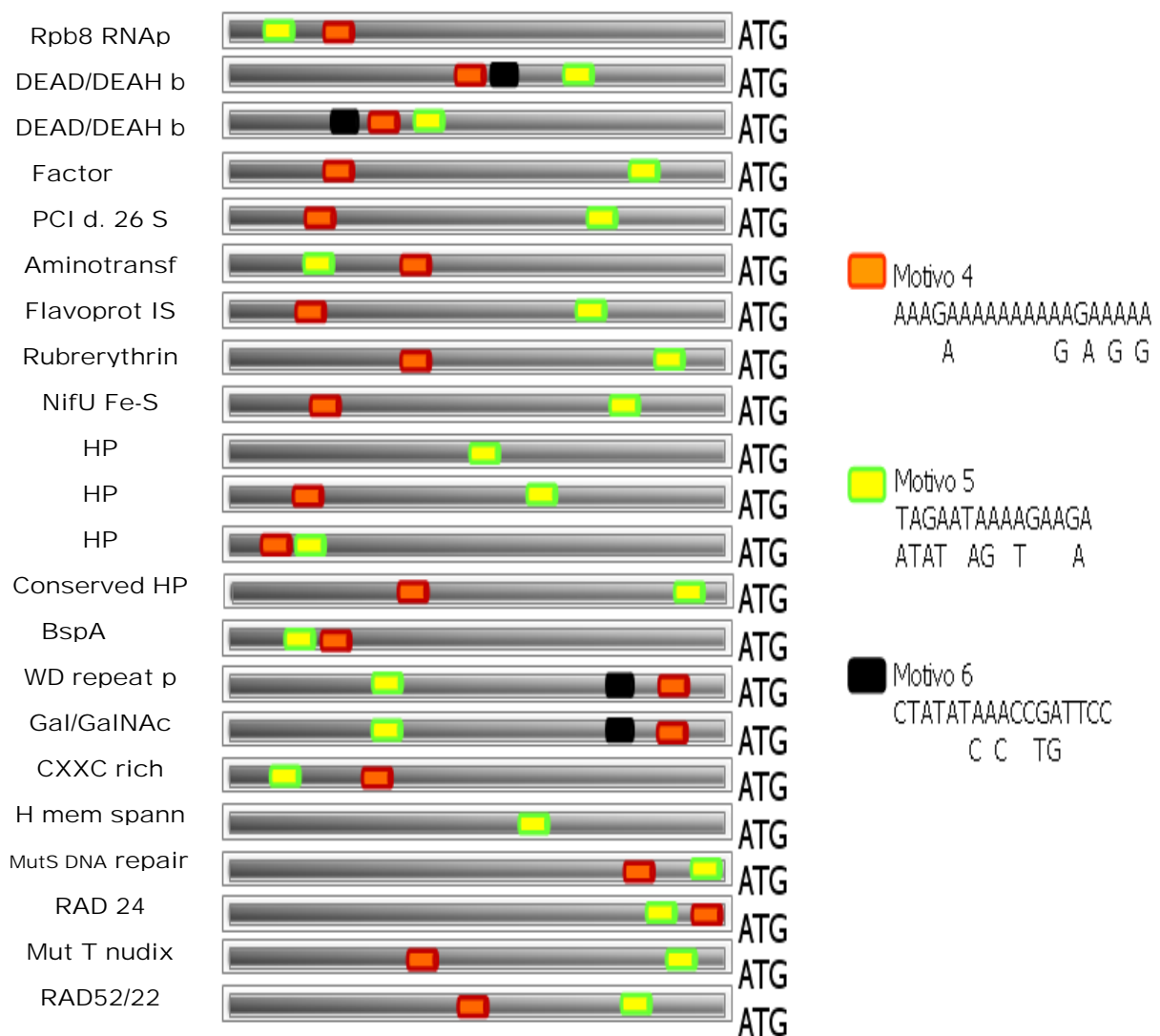


Figura 9. Identificación de secuencias reguladoras predichas por el programa MEME (<http://meme.sdsc.edu/meme4/intro.html>) en las secuencias promotoras de genes inducidos a las 3 horas posteriores de la irradiación de trofozoitos con luz UV.

## ANÁLISIS IN SILICO DE LA PROTEÍNA EHRAD54.

Como se comentó anteriormente el genoma de *Entamoeba histolytica* contiene un gen localizado en el locus EHI 103840 de 2655 pares de bases que codifica para una posible EhRAD54, que resulta ser el objeto de este trabajo. También posee otro gen de 2130 pares de bases con el locus EHI 114930 que codifica para una posible EhRAD54b (López – Casamichana *et al.*, 2008).

El análisis de la secuencia de 2655 pb mostró que contiene un marco de lectura abierto que codifica para una proteína de 884 aminoácidos (Figura 10), con un peso molecular predicho de 100163 Da y con un punto isoeléctrico predicho de 8.61. Por otra parte, el análisis de la secuencia de la proteína paróloga EhRAD54b de 2130 pb mostró que contiene un marco de lectura abierto que codifica para una proteína de 710 aminoácidos con un peso molecular predicho de 80310 Da

La comparación de secuencias de aminoácidos de las proteínas EhRAD54 y EHRAD54b muestra que presentan un 36% de identidad y 55% de homología. Sin embargo, EhRAD54 presenta una región en el extremo amino terminal que no se encuentra en la proteína paróloga, por lo que se utilizará esta región divergente para la generación de anticuerpos específicos contra EhRAD54 (Figura 11).



|            |            |            |            |            |            |     |
|------------|------------|------------|------------|------------|------------|-----|
| MKRSQAPSVR | LAKRGVKEED | IKLAFKFGCH | AIDQLLNKGT | FEQKTEIEEQ | GKTKQLNMDE | 60  |
| ENNGGAKNEV | VKENGPKLYY | WCIFKPKNKD | PKPGILEVSF | DKLLLFDMEA | KQTGSVDITR | 120 |
| GEVYEIELAD | KENKENHIKV | ETQTIKIKNK | EIIIDTGKCF | VMSQKEVKVL | ISFPAEKYVN | 180 |
| GSIFLQKPPT | EEECEKIVQK | KEEKKKTVFV | GRVLLSKKAK | GFVVPYKNAV | IQRKRHEPLF | 240 |
| NPNEPDAVVL | YQPTVTSRKE | VAVVVDPLL  | LKLRPHQKAG | VKFMVDCVMG | LKQGFKGNGC | 300 |
| ILADGMGLGK | TIQAVTLIWT | LLRQGPNGEP | TCKKVMVAP  | SSLVGNWENE | FKKWLGDAAP | 360 |
| RVVGVSCSGA | KTDQAISDMD | FGYAEIMVIS | YDQLRIHIDK | IEKIKGWGLL | ICDEGHRLKN | 420 |
| ADIKSSQAVN | RVPTKRRVIL | SGTPIQNELG | EFYAMVSFVN | PDVLGSLSAF | KRIYEETIMK | 480 |
| SRQFDCTPEE | KYAGNQRSKE | LTRLTKLFIL | RRTSKVNQKY | LPPKVQHVVV | CSLTPLQKKI | 540 |
| YTALCNLKNK | PKGKDEKKS  | QFQILTALKK | VSNHPWLIQD | FVKTFPEVLD | GILPKGDALW | 600 |
| DMELSGKTAF | LAKLLAFLRK | HKEKIVIVSN | YTETLNFIAH | HCKKCGYPYI | QLDGSVAATK | 660 |
| RTQMVNRFNN | PELDEFIFLL | SSKAGGCGLN | LVGGANLVMF | DPDWNPANDE | QAMGRVWRDG | 720 |
| QKKKCHIYRT | LSAGTVEEKM | YQRQIKKLEL | AGKVEGGDD  | NDESTFDDKQ | LKELCAYKDT | 780 |
| ACETHDLLGC | TCGAGSRQSI | NWAKSDGKLE | VLKKEWKHFN | GKKPLEDDVL | RELDSTISF  | 840 |
| LFSKEDEQLK | DDGNEEVVEE | KMPGEEEEEV | EEDLKMKEES | EEEL       |            | 884 |

Figura 10 : Secuencia de la proteína EhRAD54 de 884 aminoácidos obtenida del banco de datos del proyecto de secuencia del genoma de *Entamoeba histolytica* (<http://www.tigr.org>) y del servidor Pathema (<http://pathema.tigr.org>). Los números a la derecha corresponden a la posición de los residuos respecto a la primer metionina.

```

EhRAD54      MKRSQAPSVRLAKRGVKEEDIKLFKFGCHAIDQLLNKGTFEQKTEIEEQ
EhRAD54B    -----MWAKNSPKKQKTFNDGFIVVNS
              * . . . : * : : . : . .

EhRAD54      GKTQQLNMDENGGAKNEVVKENGPKLYWCIFKPKNKDPKPGILEVFSF
EhRAD54B    NNIGLIHDEEDKVIKVNIMKEISP-----
              . : . : : * : * : : * . *

EhRAD54      DKLLLFDMKQGTGSVDITRGEVYEIELADKENKENHIKQVETQTIKIKNK
EhRAD54B    -----

EhRAD54      EIIIDTGKCFVMSQKEVKVLISFPAEKYVNGSIFLQKPPTEEECEKIVQK
EhRAD54B    --ETIGGDSIILAGKVIIEEEVPEQYLSGKFLH-----ETAITITQP
              * . . : : * : : . . * . * : * . * : * : * . * . * . *

EhRAD54      KEEKKKTVFVGRVLLSKKAGFVVPYKNAVIQRKRHEPLFNPNEPDAVVL
EhRAD54B    KFELKKTALGNP I KKKKVS-----LYNKENP-----
              * * * * . : . : . * . . . . * : * : : *

EhRAD54      YQPTVTSRKEVAVVVDPLLGLKLRPHQKAGVKFMYDCVMGLKQGFKGNCG
EhRAD54B    FAYCIDDKKEPAILIDPYIGKFLRPHQIEGVKFMYHCIMRGGE---CGC
              : . : * * * : : * : * * * * * * * * * . * : * *

EhRAD54      ILADGMGLGKTIQAVTLIWTLLRQGPNGEPTCKKVMVAPSSLVGNWENE
EhRAD54B    ILADEMGLGKTLQTTILWTVYKQCN-----IKKIVIVCPQSLIGNWEKE
              * * * * * * * * * : * * * * * * * * * : *

EhRAD54      FKKWLGDAAPRVVGVSCSGAKTDQAISDMDFGYAEIMVISYDQLRIHIDK
EhRAD54B    FKKWLG-VERISVQTGSSDSSMKEKVNDFIRDYIPVLIISYEQVRSHVET
              * * * * . * . . * . . : : * : * : : * * * * * * * : .

EhRAD54      IEKIKGWLLICDEGHLKNADIKSSQAVNRVPTKRRVILSGTPIQNELG
EhRAD54B    LKTK-IGLIVCDEGHRILKNLMSKTNSSLKALGGSRHIIILSGTPVQNGLE
              : * * * * : * * * * * * * * * * . : : : . : * * * * * * * * *

EhRAD54      EFYAMVSFVNPVLDGSLSAFKRIYEEPIMKSRQFDCTPEEKYAGNQRKE
EhRAD54B    DFYSLIEFCSPGCLGTLSSFKRVFAIPIQKADGNASIEEIQLGTERAKE
              : * * : : * . * . * * * * * * * : * * * : : . : * * * . * : * *

EhRAD54      LTRLTKLFILRRTSKVNQKYLPPKVQHVVFCSLTPLOKKIYALCNLKNK
EhRAD54B    LTNKLNQVLRRTSQVNEKYLDPKTEIVLFIKPSYLIKLYKIMLKELEK
              * * . : : * * * * * * * * * * . : * * . : * * * . : : : *

EhRAD54      PKGKDEKSCQFQILTALKKVSNHPWLIQDFVKTFFPEVLGILP---KGD
EhRAD54B    ---KLLDQCSALKYIQLFTKLCNHPSLISKYLTTEEKISLNENDEKCIKGI
              * . . . . : : : . : * . * * * . . . . . * : * *

EhRAD54      ALWDMELSGKTAFLAKLLAFLRKHKEKIVIVSNYETETLNFIAHHCKKCG-
EhRAD54B    SLNEESSNKFNITIQFIKEILIKSKEKVVLSNYTKTLDLFEIYFKQEEE
              : * : . . . . : : : * * * * * * * * * * : : * :

EhRAD54      -----YPYIQLDGSAATKRTQMVNRFNPNPELDEFIFLLSSKAGGCGLN
EhRAD54B    YKQKKIFPNYLRDLGKTSQKQRDIIVEKINDKSSNYNILLSSKAGGVGLN
              : * * * * . : . * : * : : . : * * * * * * * * *

EhRAD54      LVGGANLVMFDPDWNPNANDEQAMGRVWRDQKKKCHIYRTL SAGTVEEKM
EhRAD54B    LIGCSRLLIFDPDWNPAKDKQAMARIWRDQKKAMIYRMLCTGTIEEKI
              * * . : * : * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

EhRAD54      YQRQIKKLELAGKVVEGGDDNDESTFDDKQLKELCAYKDTACETHDLLGC
EhRAD54B    YQRQLQNQISESIEEHLEMGKSLSVEQLMKIPELNTNTICDTHDLLQC
              * * * * : * : : . : * : . : * : : * : . : * * * * * *

EhRAD54      TCGAGSRQSIWAKSDGKLEVLKREWKHFNGKPLEDDVLRDLDSKTI SF
EhRAD54B    DCCNG----GYKTEEDTLHLIPKMKKEIKSIDPLISTIEGINKMVSMLF
              * * . : . . . * . : * : : . . * . : . : *

EhRAD54      LFSKEDQLKDDGNEEVVEEKMPGEEEEVEEDLKMKEESEEL
EhRAD54B    VNEFHNKQKMK-----
              : . . : * .

```

Figura 11: Comparación de las secuencias aminoacídicas de las proteínas parálogas EhRAD54 y EhRAD54b. Se ubican subrayadas las secuencias correspondientes a la posición de los oligonucleótidos sentido y antisentido específicos para amplificar un fragmento interno de 581 pb correspondiente a una región divergente del extremo amino terminal de EhRAD54.

Para verificar la identidad de la proteína EhRAD54 predicha, se realizó una búsqueda de secuencias homólogas en las bases de datos existentes, usando el programa BLAST de ExPASy Proteomics Server ([www.expasy.org](http://www.expasy.org)). Los resultados se muestran en la tabla 1 organizados de manera descendente de acuerdo al valor E de cada una de las proteínas relacionadas con EhRAD54.

La proteína EhRAD54 presenta una gran similitud con las proteínas RAD54 de otros organismos eucariontes, desde protozoarios hasta humanos, manteniendo altos porcentajes de identidad y de homología con cada uno de ellos. El valor de E de *e-174* nos permite identificar a la proteína RAD54 de la amiba unicelular *Dictyostelium discoideum* como la proteína que guarda mas similitud con EhRAD54 de amiba. La proteína RAD54 de *Saccharomyces cerevisiae* al presentar un valor de *e-113* es la proteína menos similar a EhRAD54b de *Entamoeba histolytica*.

EhRAD54 presenta mayor porcentaje de homología con la proteína ortóloga de *Drosophila melanogaster* (61%) mientras que el menor lo mantiene con las proteínas de *Xenopus laevis* y *Gallus gallus* (54%).

Por otra parte, la proteína EhRAD54 de *E. histolytica* comparte los mayores porcentajes de identidad con proteínas de *Arabidopsis thaliana*, *Trypanosoma brucei* y *Danio rerio* siendo este del 43%. Del mismo modo las proteínas de *Xenopus laevis* y *Gallus gallus* comparten el menor porcentaje de identidad con EhRAD54 que corresponde a un 37%. (Tabla 1).

De manera relevante, la proteína paróloga EhRAD54b con el código XM\_645236 mantiene un valor E de *e-117*, una homología de 55% y una identidad de 36% con respecto a EhRAD54, confirmando que son proteínas parálogas.

*Tabla 1.* Identificación de proteínas homólogas a EhRAD54 en otros organismos utilizando el algoritmo BLAST.

| ORGANISMO                       | PROTEINA                             | NUMERO DE ACCESO <sup>a</sup> | VALOR E | HOMOLOGIA % | IDENTIDAD % |
|---------------------------------|--------------------------------------|-------------------------------|---------|-------------|-------------|
| <i>Dictyostelium discoideum</i> | Proteína con dominio SNF2 (RAD54)    | Q54RP8                        | e-174   | 59          | 42          |
| <i>Leishmania major</i>         | Proteína RAD54                       | Q4QAQ7                        | e-139   | 58          | 42          |
| <i>Gallus gallus</i>            | Proteína RAD54                       | Q9DG67                        | e-135   | <b>54</b>   | <b>37</b>   |
| <i>Trypanosoma brucei</i>       | Proteína RAD54                       | Q385M5                        | e-133   | 59          | <b>43</b>   |
| <i>Danio rerio</i>              | RAD54 like                           | Q7ZV09                        | e-132   | 60          | <b>43</b>   |
| <i>Homo sapiens</i>             | Proteína RAD54                       | Q9Y620                        | e-129   | 58          | 41          |
| <i>Xenopus laevis</i>           | MGC81308                             | Q6INQ9                        | e-129   | <b>54</b>   | <b>37</b>   |
| <i>Drosophila melanogaster</i>  | Homólogo RAD54                       | O76460                        | e-126   | <b>61</b>   | 41          |
| <i>Caenorhabditis elegans</i>   | Proteína hipotética (RAD54)          | Q9XW40                        | e-125   | 59          | 39          |
| <i>Arabidopsis thaliana</i>     | Proteína RAD54                       | Q0PCS3                        | e-124   | 60          | <b>43</b>   |
| <i>Entamoeba histolytica</i>    | Proteína RAD54b de reparación de ADN | XM_645236 *                   | e-117   | 55          | 36          |
| <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | RAD 54 like                          | P32863                        | e-113   | 56          | 39          |

<sup>a</sup> Swiss Prot & TrEMBL

\* Gen Bank

Utilizando las secuencias de aminoácidos de las proteínas RAD54 homólogas de otros organismos, se realizó un alineamiento múltiple con EhRAD54 de *Entamoeba histolytica* utilizando el programa bioinformático CLUSTALW ([www.ebi.ac.uk/clustalw](http://www.ebi.ac.uk/clustalw)). Este programa nos permite conocer regiones altamente conservadas evolutivamente, orientándonos acerca de las probables funciones de las proteínas alineadas. Así podemos confirmar que la proteína EhRAD54 de amiba cuenta con los 7 dominios característicos de la superfamilia de helicasas SNF2 (I, IA, II, III, IV, V, VI) destacando en el dominio II el motivo DEGH tan característico y conservado en esta familia (Figura 12). Del mismo modo podemos observar la alta conservación de nueve aminoácidos en su extremo amino terminal, a saber MRRSLAPSQ ( M K R S Q A P S V en amiba) llamado motivo Q, que de acuerdo a la literatura fungen como parte fundamental para llevar a cabo la remodelación de la cromatina (Alexiadis *et al.*, 2004).

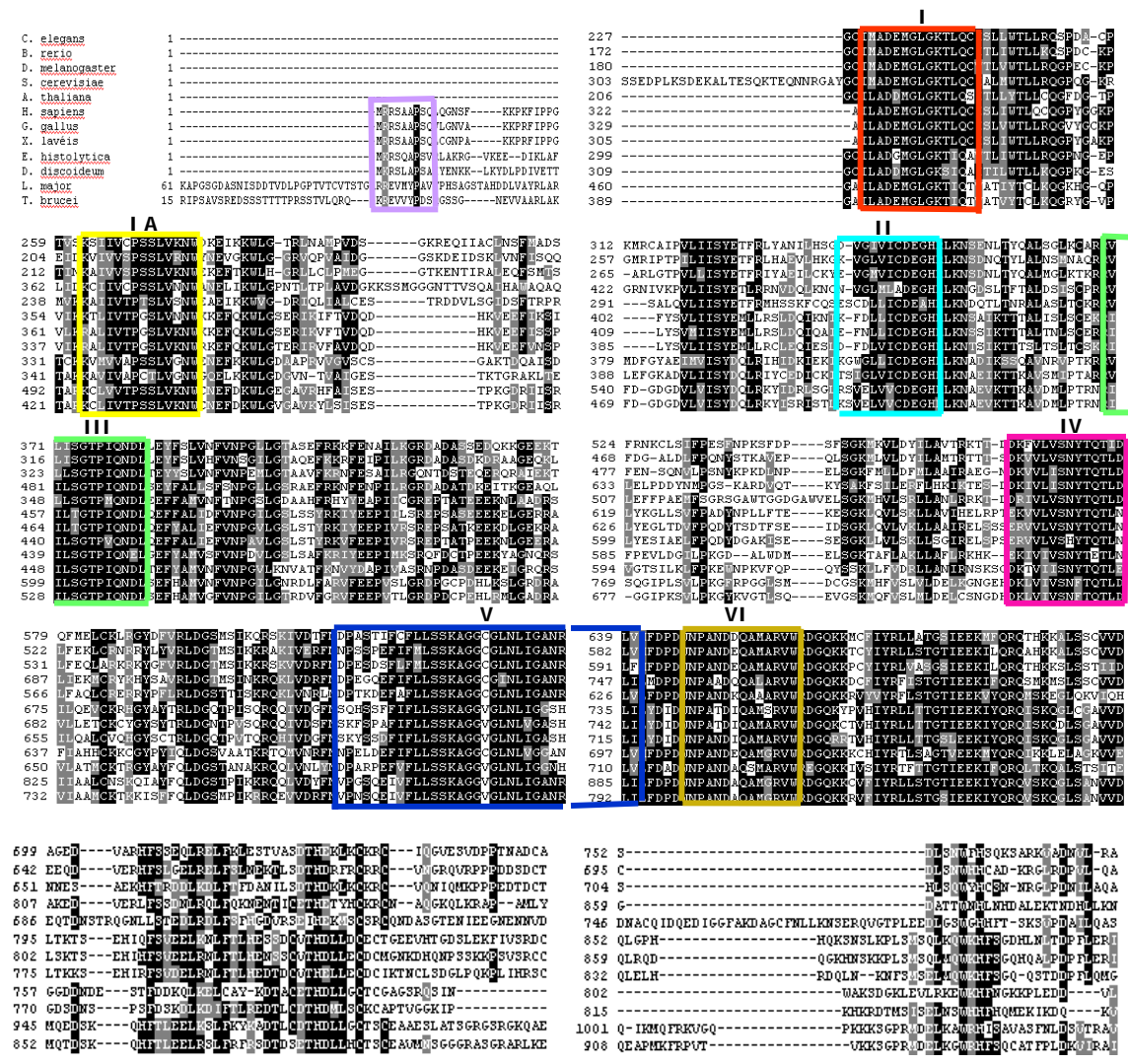


Figura 12 : Comparación de secuencias de aminoácidos de proteínas RAD54.

Los siete dominios SNF2 se encuentran marcados con números romanos y encerrados con distintos colores (I azul rojo, IA amarillo, II azul, III verde, IV rosa, V azul marino, VI mostaza). Los números a la izquierda, corresponden a la posición de los aminoácidos en relación a la primer metionina en cada proteína.

Posteriormente se realizó la predicción de los dominios funcionales y estructurales de la EhRAD54 usando los programas InterproScan (<http://www.ebi.ac.uk/InterProScan>), Prosite (<http://www.expasy.ch/prosite>) y Pfam (<http://www.sanger.ac.uk/Software/Pfam>), representados esquemáticamente en la figura 13.

Así sabemos que EhRAD54 de *E. histolytica* cuenta con un dominio Helicasa C en su extremo carboxilo terminal comprendido entre la posición de aminoácidos 641 – 720, que en proteínas homólogas de otros organismos le permite unirse al ATP, un dominio ResIII (270 – 446 aa) que corresponde a la tercer clase de endonucleasas de restricción con requerimientos de ATP, un dominio de helicasa constituido por los siete dominios SNF2 (276 – 578 aa) que se muestran en la Figura 6, destacando el motivo DEGH (412 – 417 aa) altamente conservado que a proteínas homólogas de otros organismos les permite realizar funciones tales como la hidrólisis del ATP así como llevar a cabo el intercambio de cadenas homólogas en el proceso de recombinación, lo que recibe el nombre de reacción de D-loop (Alexiadis *et al.*, 2004). Los dominios antes mencionados también se localizan en proteínas RAD54 de *Homo sapiens* y *Sacharomyces cerevisiae* de 910 y 898 aminoácidos, respectivamente.

De forma característica, EhRAD54 cuenta con un dominio ribosomal L30 comprendido entre la posición de aminoácidos 183 – 245 en su extremo amino terminal. Esta reportado que las proteínas L30 y S5 de las subunidades ribosomales 50 S y 30 S, respectivamente de *Bacillus stearothermophilus* cuenta con un dominio putativo ribosomal L30 que le permite funciones involucradas en transcripción y traducción del ADN a RNA (Figura 13).

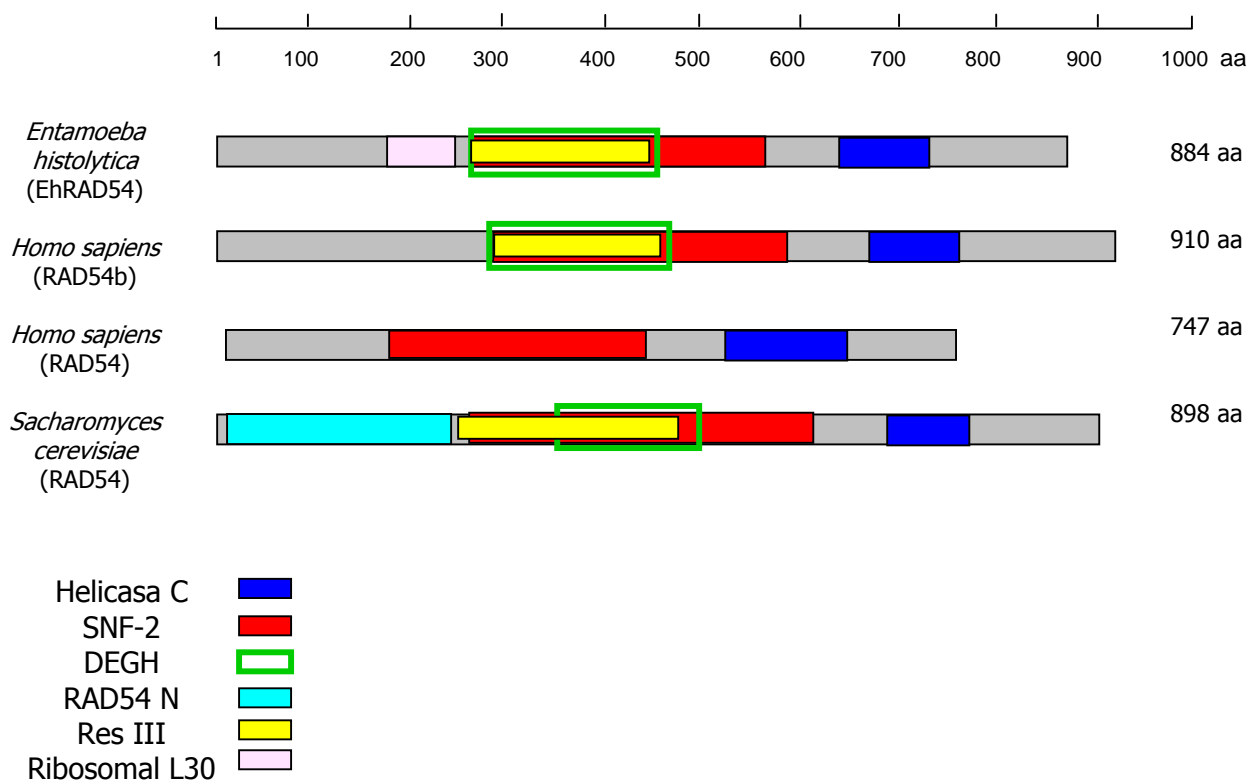


Figura 13 : Representación de los dominios funcionales y estructurales de EhRAD54 de *Entamoeba histolytica*, así como de RAD54b y RAD54 de *Homo sapiens* y *Sacharomyces cerevisiae*, respectivamente, mediante el uso de los programas InterproScan (<http://www.ebi.ac.uk/InterProScan>), Prosite (<http://www.expasy.ch/prosite>) y Pfam (<http://www.sanger.ac.uk/Software/Pfam>).



## ANÁLISIS FILOGENÉTICO DE LA PROTEÍNA EHRAD54B DE *ENTAMOEBA HISTOLYTICA*

Las secuencias de proteínas ortólogas RAD54 previamente alineadas se analizaron con el programa MEGA 3.1 que mediante los algoritmos Neighbor- Joining y Bootstrap nos ha permitido construir el árbol filogenético de esta familia para conocer la conservación, diferenciación y cercanía o lejanía evolutiva de proteínas homólogas de diversos organismos.

En el árbol filogenético predicho se observan dos unidades taxonómicas operacionales (UTO) principales claramente separadas que divergen de una proteína ancestro común, la primera que parte de *Dictyostelium discoideum* hasta *Homo sapiens* y la segunda de *Arabidopsis thaliana* hasta *Drosophila melanogaster* (Figura 14). Ubicándonos en la primer UTO identificamos a EhRAD54 de *Entamoeba histolytica* con cercanía evolutiva a proteínas RAD54 de otros parásitos protozoarios entre los que se encuentran *Leishmania major* y *Trypanosoma brucei*, compartiendo mayor cercanía por divergir de la misma rama evolutiva con la amiba de vida libre *Dictyostelium discoideum*. En esta misma UTO ubicamos a proteínas RAD54 de *Xenopus laevis*, *Gallus gallus* y *Homo sapiens* que a pesar de divergir de dos sub-UTO a partir de *Entamoeba histolytica*, sus ramas evolutivas son particularmente cercanas a ella, siendo más divergente la proteína RAD54 de *Homo sapiens*.

En lo que respecta a proteínas localizadas en la segunda UTO principal, se observa que la proteína EhRAD54 de *Entamoeba histolytica* a pesar de encontrarse en una UTO diferente de las de *Arabidopsis thaliana*, *Sacharomyces cerevisiae*, *C. elegans*, *Braquidanio rerio* y *Drosophila melanogaster*.

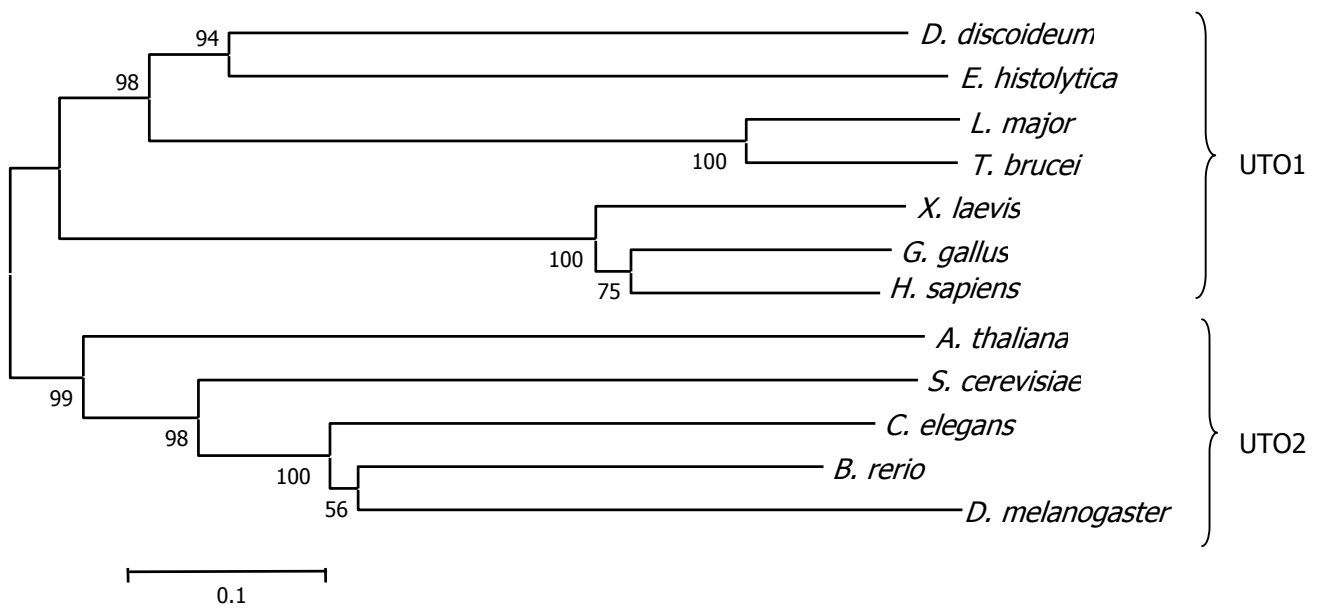


Figura 14: Árbol filogenético de proteínas de la familia RAD54.

EhRAD54 de *Entamoeba histolytica* es evolutivamente cercana a las proteínas RAD54 de parásitos protozoarios. Los números corresponden a la cantidad de veces que el algoritmo analizó la probabilidad de que estas estructuras se encontraran evolutivamente cercanas. La escala corresponde al mínimo valorable evolutivo.

La estructura tridimensional de la proteína EhRAD54 fue predicha mediante el programa Swiss – Model (<http://swissmodel.expasy.org//SWISS-MODEL.html>) y visualizada mediante el programa PyMol (<http://pymol.sourceforge.net>).

El programa utilizó como templado a la helicasa de la Superfamilia SNF2 con actividad de ATPasa de *Solfoglobus solfataricus*, una Archaeobacteria con el código de acceso 1z6A en el Protein Data Bank (PDB). Como se observa en la figura 15, EhRAD54 de *E. histolytica* posee la típica estructura bilobulada perteneciente a la Superfamilia de helicasas SNF2, esta estructura divide al dominio de helicasa en dos partes, a saber DH1 (Dominio de Helicasa 1) y DH2 (Dominio de Helicasa 2) ubicados en los extremos carboxilo y amino terminal, respectivamente (Thoma *et al.*, 2005). Como se observa la similitud estructural entre el templado y el modelo de EhRAD54 es evidente, lo que sugiere que las funciones entre ambas proteínas sean iguales. Es importante destacar que el modelaje de la proteína comenzó a partir del aminoácido 273 y terminó en el 758, modelando 485 residuos de los 884 aminoácidos que conforman a la proteína EhRAD54 completa. Los primeros 272 aminoácidos que corresponden al extremo amino – terminal, así como 125 aminoácidos que componen el extremo carboxilo – terminal de la proteína EhRAD54 no logran ser modelados por los servidores disponibles al carecer de un templado previamente reportado que facilite su predicción.

Para validar la estructura tridimensional predicha para EhRAD54 es necesario recurrir a los gráficos de Ramachandran, al cálculo de energía (Deep View/Swiss-Pdb Viewer utilizando el algoritmo Gromos96) y al análisis estereoquímico (Win Coot), ya que nos permiten conocer la calidad del modelo predicho. El gráfico de Ramachandran evalúa los ángulos dihedros psi y phi de cada uno de los aminoácidos de la estructura modelada, indicando si estos son estéricamente favorables para su plegamiento permitiendo la formación de estructuras secundarias tales como hélices alfa, hojas beta plegadas, loops, etc. (Figura 16).

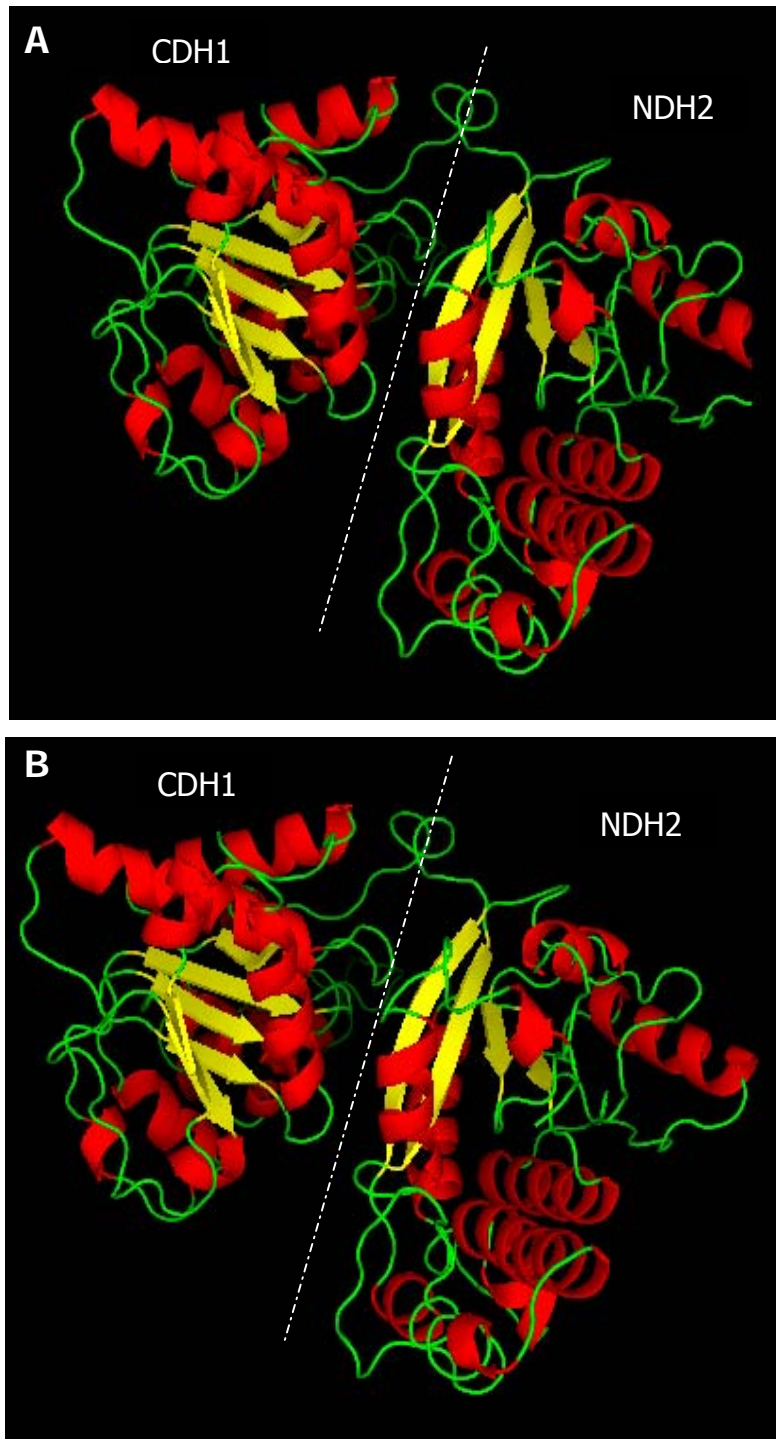


Figura 15 : Comparación estructural entre el templado de la proteína ATPasa SNF2 de *Solfoglobus solfataricus* (A) y el modelo predicho de la proteína EhRAD54 de *Entamoeba histolytica* (B) . Se utilizó el programa bioinformático de predicción Swiss – Model y el visualizador PyMol. En color rojo se muestran las hélices alfa, en color amarillo las hojas beta plegadas y en color verde los loops.

En color vino se muestran las conformaciones que son estéricamente permitidas (regiones completamente permitidas), en color lila donde los átomos tienen gran proximidad (regiones cercanas a las permitidas) y de color rosa donde las conformaciones son estéricamente favorables (regiones aceptadas), excepto para la glicina y prolina marcadas como un triángulo relleno y vacío de color amarillo, respectivamente, las regiones no permitidas se marcan en color negro. La glicina es fundamentalmente un residuo diferente por no poseer una cadena lateral y por su carencia de carbono beta, ya que la ausencia de este permite que la glicina se desplace mas allá de los bordes de  $-180^\circ$  y  $180^\circ$ , produciéndose así impedimentos estéricos en el gráfico de Ramachandran. Por otra parte, la prolina también produce incompatibilidades estéricas debido a la inflexibilidad en su anillo de pirrolidina (Ho *et al.*, 2005). El cuadrante superior izquierdo grafica las hojas beta plegadas, el cuadrante superior derecho e inferior izquierdo representa las hélices alfa que giran a la izquierda y derecha respectivamente. Así podemos observar que 317 residuos (65.36%) corresponden a regiones completamente permitidas, 118 residuos (24.33%) corresponde a regiones cercanas a las permitidas, 32 residuos (6.6%) corresponden a regiones aceptadas y 18 residuos (3.71%) corresponde a regiones no permitidas. Lo anterior valida al modelo tridimensional predicho para la proteína EhRAD54 ya que presenta menos del 5% de regiones no permitidas. Esto confirma que las estructuras secundarias predichas se encuentran espacialmente dispuestas de forma correcta en los modelos y que esta estructura es posible en la naturaleza.

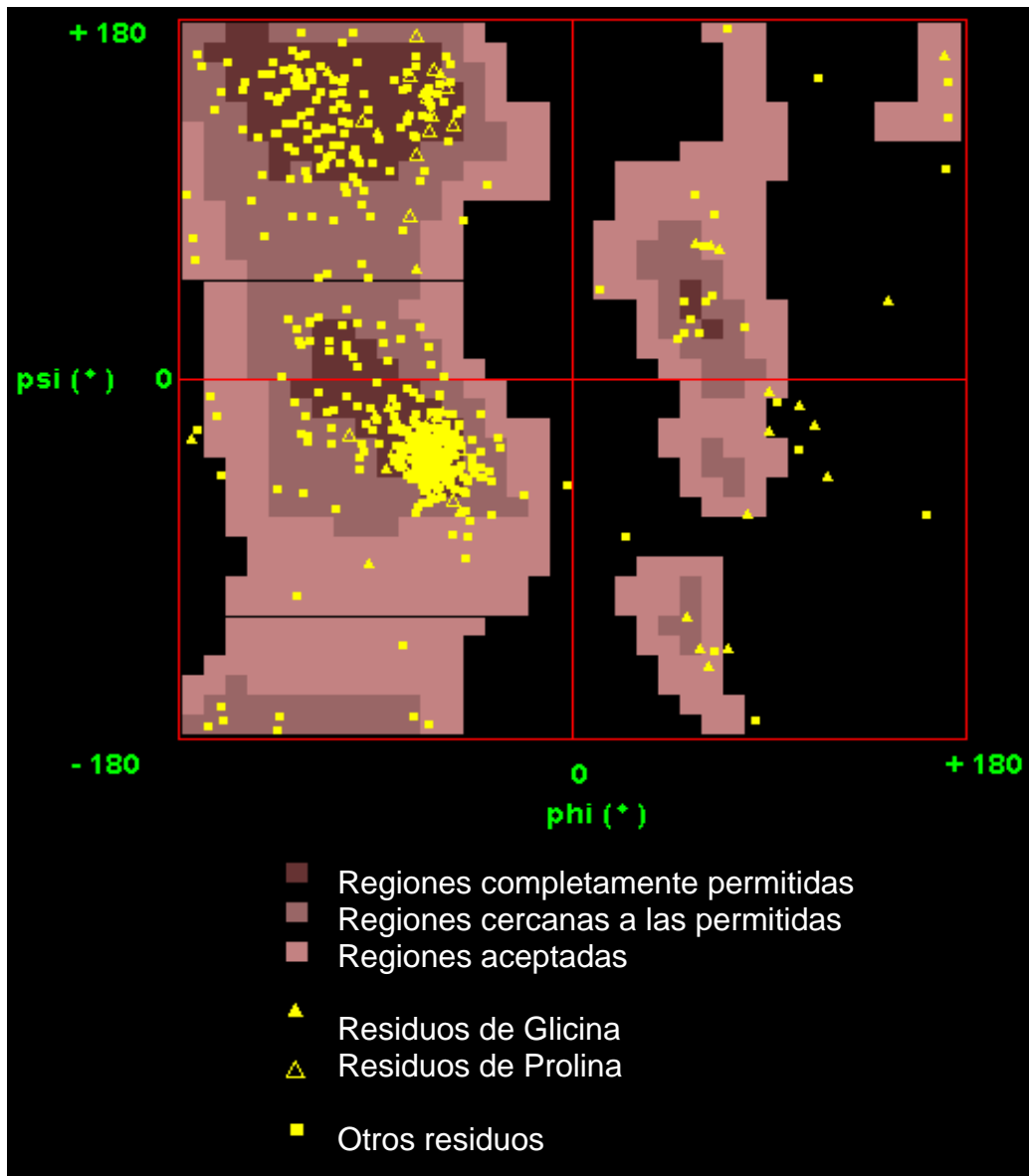


Figura 16 : Gráfico de Ramachandran.

Se muestran en color vino las regiones completamente permitidas (65.36%), en color lila las regiones cercanas a las permitidas (24.33%), de color rosa las regiones aceptadas (6.60%), excepto para la glicina y prolina marcadas como un triángulo relleno y vacío de color amarillo respectivamente, las regiones no permitidas se marcan en color negro (3.71%).

El cálculo de energía basado en los campos de fuerza (Deep View/Swiss- Pdb Viewer) nos orienta a determinar que tan favorecida puede llegar a ser la conformación de la estructura terciaria predicha. La mayoría de las estructuras cristalográficas predichas se encuentran en un rango de -10000 y -15000 KJ/mol. Para EhRAD54 de *Entamoeba histolytica* el cálculo de energía total se encuentra en -11065.246 KJ/mol mientras que la energía total del templado 1z6A de *Solfoglobus* es de -11231.58 KJ/mol. Lo anterior nos sugiere que el modelo para *Entamoeba histolytica* es un modelo energéticamente válido y favorecido.

El análisis estereoquímico basado en las herramientas del programa Win Coot analiza las posibles desviaciones que presenta el modelo tridimensional predicho utilizando la orientación correcta de los residuos que conforman a la proteína. Para la predicción del modelo de EhRAD54 de *Entamoeba histolytica*, sólo el 1% de la estereoquímica es errónea (porcentaje obtenido del análisis de 487 residuos donde 5 de ellos son equivocados) ya que presenta ligeras desviaciones de los valores ideales de las cadenas laterales, entre ellos se encuentra la planaridad de una Arginina y algunos ángulos omega de cuatro residuos de la cadena principal.

Posteriormente, para confirmar la coincidencia entre la estructura tridimensional predicha para la proteína EhRAD54 de *E. histolytica* y el templado de *Solfoglobus solfataricus* se realizó la sobre posición de ambas estructuras utilizando la Suite de programas CCP4 Program Suite 6.0 y sus aplicaciones como Lsqkab (<http://www.ccp4.ac.uk/main.html>) así como el visualizador Pymol (<http://pymol.sourceforge.net/>). Este programa nos proporciona el valor RMS que entre más cercano a cero se encuentre mayor coincidencias estructurales habrá entre los modelos. Este valor resultó para la sobre posición de ambas estructuras de 1.903 Å, lo que nos confirma un buen empate entre ambas estructuras (Figura 17). Seguido de esto, se realizó la sobre posición de la estructura terciaria de la proteína EhRAD54 con la única proteína RAD54 ya cristalizada perteneciente a *Danio rerio* (pez cebra), en este caso el RMS entre ambas estructuras es de 2.38151 Å (Figura 18). Finalmente entre el modelo de ATPasa SNF2 de *Solfoglobus solfataricus* utilizado de templado y el cristal de RAD54 de *Danio rerio* se obtiene un valor RMS es de 3.12 Å (Figura 19).

Lo anterior confirma que la proteína EhRAD54 de *E. histolytica* tiene estructuralmente similitud con proteínas de la Superfamilia SNF2, específicamente con proteínas RAD54.

Para predecir la estructura terciaria de los 272 residuos del extremo amino faltantes en el modelo antes predicho, que además es donde se localiza la secuencia de aminoácidos empleada para el diseño del péptido sintético antigénico, se utilizaron las herramientas bioinformáticas del programa LOOPP (<http://cbsuapps.tc.cornell.edu/loopp.aspx>). El programa analizó los primeros 300 aminoácidos de la proteína y tomó como templado para la predicción a las proteínas con código de acceso al PDB b.40.4.9.1, 1EQN, b.110.1.1, 2BG9, 1GO3, dando como resultado una probable estructura secundaria compuesta del 11.45% de hélices alfa, 24.10% de hojas beta plegadas y el 64.46% de loops (Figura 20).

Esta predicción se comprobó mediante la visualización del archivo de coordenadas PDB mediante el programa PyMol, que como se observa en la figura 21 está formada en su mayor parte por loops, cuatro alfa hélices y dos hojas beta plegadas en anti-paralelo. Del mismo modo contiene del aminoácido 92 al 106 la secuencia probable para el diseño del péptido sintético antigénico, compuesto por un loop en su mayor parte expuesto al solvente y formado por los aminoácidos Lisina (Lys - K) 92 a la Leucina (Leu - L) 96, y una hoja beta plegada con regiones internas poco expuestas que va desde el ácido glutámico (Glu - E) 97 a la Fenilalanina (Phe - F) 106.



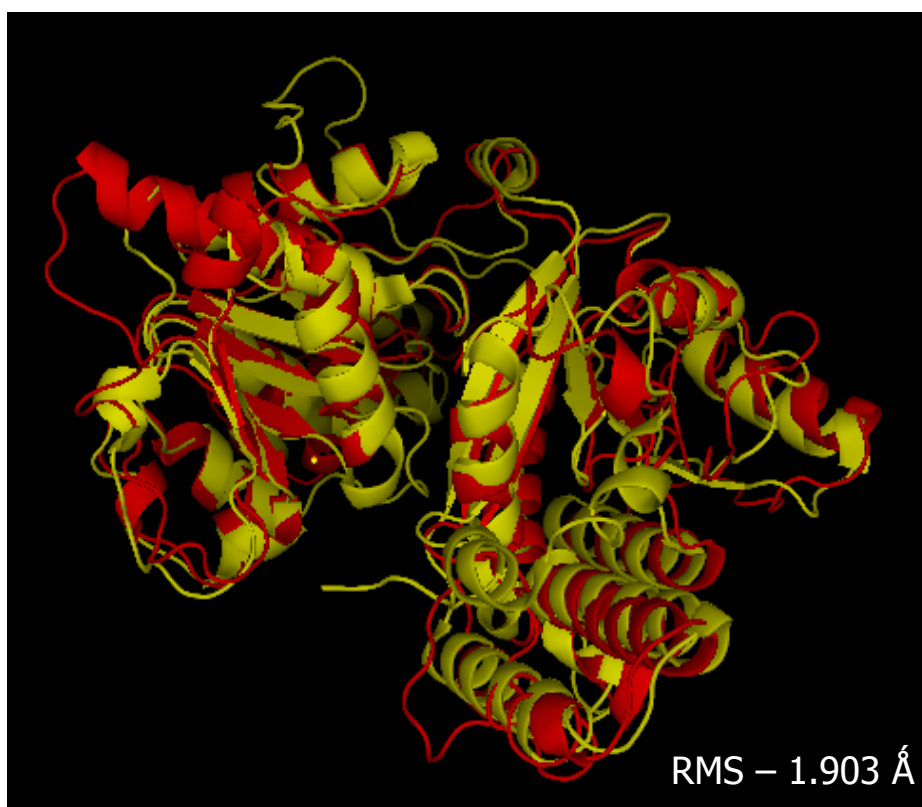


Figura 17. Sobreposición de la Estructura terciaria predicha para la proteína EhRAD54 con el templado de ATPasa de la superfamilia SNF2 de *Solfoglubus solfataricus*. En color rojo se muestra la estructura terciaria predicha para la proteína EhRAD54 de *E. histolytica*, en color amarillo se muestra a la proteína de *Solfoglobus solfataricus* ATPasa SNF2, tomada como templado para la predicción de EhRAD54.

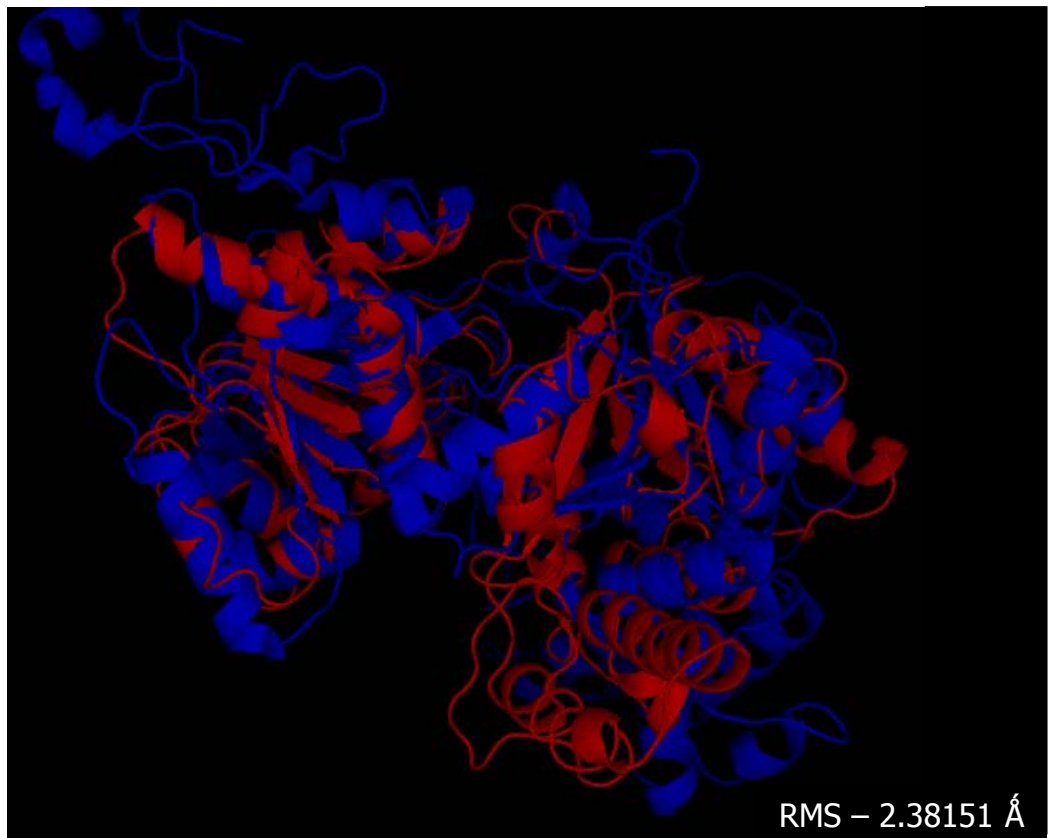


Figura 18. Sobreposición de la Estructura terciaria predicha para la proteína EhRAD54 con el cristal de la proteína RAD54 de *Danio rerio*.

En color rojo se muestra la estructura terciaria predicha para la proteína EhRAD54 de *E. histolytica*, en color azul se muestra a la única proteína RAD54 cristalizada correspondiente a *Danio rerio*.

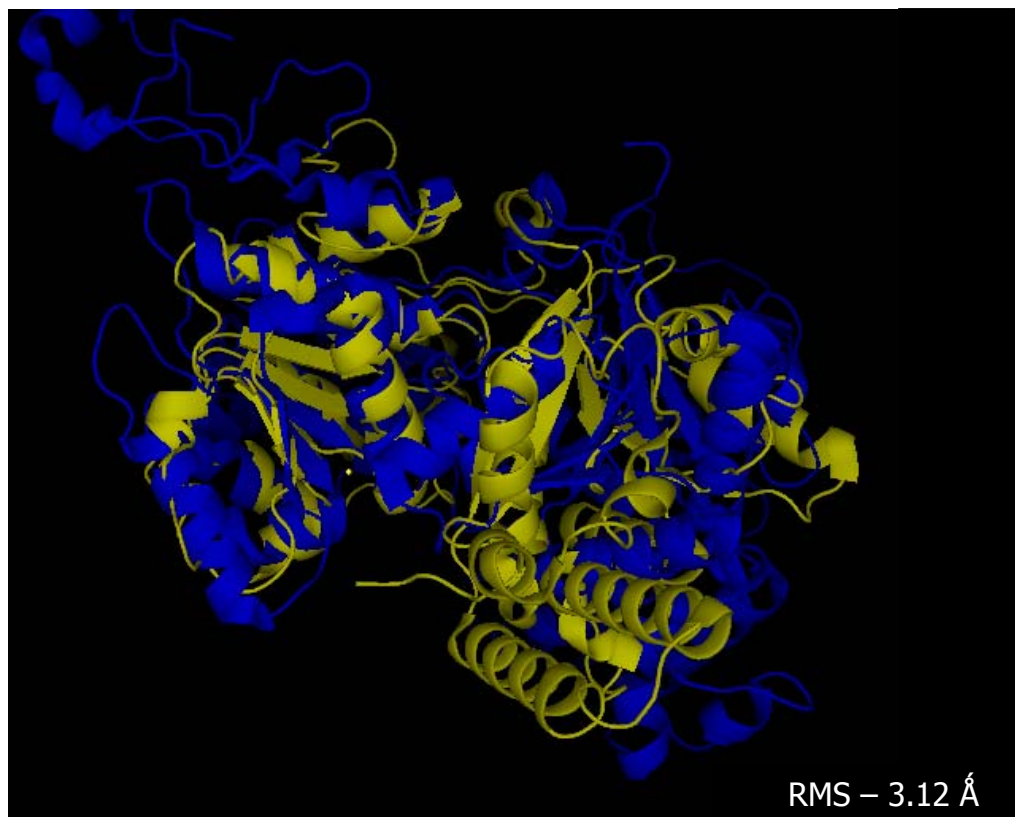


Figura 19. Sobreposición de la Estructura del templado de ATPasa de la superfamilia SNF2 de *Solfolubus solfataricus* con el cristal de la proteína RAD54 de *Danio rerio*. En color amarillo se muestra a la proteína de *Solfoglobus solfataricus* ATPasa SNF2 y en color azul a la proteína RAD54 cristalizada de *Danio rerio*.

```

> 1 60
MKRSQAPSVRLAKRGVKEEDIKLAFKFGCHAIDQLLNKGTFEQKTEIEEQGKTKQLNMDE
CCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCC

> 61 120
ENNGGAKNEVVKENGPKLYWCIFKPKNKDPKPGILEVVSFDKLLLFDM EAKQTGSVDITR
CCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCC

> 121 180
GEVYEI ELADKENKENHIK VETQTIKIKNKEIIIDTGKCFVMSQKEVKVLISFPAEKYVN
CCCCCCHHHHCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCC

> 181 240
GSIFLQKPPTEEECEKIVQKKEEKKKTVFVGRVLLSKKAKGFVVPYKNAVIQRKRHEPLF
CCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCC

> 241 300
NPNEPDAVVLYQPTVTSRKEVAVVVDPLLGLKLRPHQKAGVKFMYDCVMGLKQGFKGNGC
CCCCCCEEECCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCC

END_SECTION

```

Figura 20. Estructura secundaria predicha por el programa LOOPP (<http://cbsuapps.tc.cornell.edu/loopp.aspx>) para el extremo amino terminal de la proteína EhRAD54 de *Entamoeba histolytica*.

Del aminoácido 92 al 106 y en color rojo se encuentra localizada la secuencia que funge como péptido sintético antigénico para la futura obtención de anticuerpos específicos anti-EhRAD54. Los números corresponden a la posición de los aminoácidos con respecto a la primer metionina. En color azul se muestra la estructura predicha con el siguiente código: H – hélices alfa, E – hoja beta plegada, C –loop.



Figura 21: Estructura terciaria predicha del extremo amino terminal de la proteína EhRAD54 (aminoácidos 1 – 300). En color rojo se muestran las hélices alfa, en color verde los loops y en color amarillo las hojas beta plegadas.

## DISEÑO DE UN PÉPTIDO SINTÉTICO ANTIGÉNICO DE 15 RESIDUOS

La secuencia de 15 aminoácidos fue diseñada usando las herramientas bioinformáticas del sitio de la universidad de Harvard (<http://mif.dfci.harvard.edu/tools/antigenic.pl>) para la búsqueda y predicción de determinantes antigénicos. Se identificaron en la secuencia de 884 residuos correspondiente a la proteína EhRAD54, 34 determinantes antigénicos mostradas en la figura 22, las cuales fueron sometidas a un alineamiento múltiple mediante el programa CLUSTALW (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>) para localizar siete determinantes antigénicos divergentes entre las proteínas EhRAD54 y EhRAD54b. Estas fueron sometidas a un nuevo análisis bioinformático para obtener una determinante antigénica divergente real de 15 aminoácidos (KPGILEVSFDKLLLF) comprendido entre la posición 92 y 106 de la proteína EhRAD54 (Tabla 2).

Se comprobó mediante un análisis bioinformático con el programa BLAST que esta secuencia no es compartida con la proteína paróloga EhRAD54b de amiba ni con ninguna proteína predicha en el genoma de *Entamoeba histolytica*. Finalmente, se verificó con un alineamiento múltiple que esta secuencia no está presente en la proteína RAD54 de nuestro modelo animal, *Mus musculus* (datos no mostrados).

Por otra parte como se muestra en la figura 23, utilizando la predicción terciaria del programa LOOPP (<http://cbsuapps.tc.cornell.edu/loopp.aspx>) y la visualización por el programa PyMol, la superficie del modelo del extremo amino - terminal de la proteína EhRAD54 que resultó divergente a la proteína paróloga EhRAD54b, se observa el péptido antigénico sintético (color azul) que corresponde a una región expuesta al solvente en su mayor parte, formado por un loop integrado por los aminoácidos Lisina (Lys -K) 92 a la Leucina (Leu - L) 96 y parte de una hoja beta plegada que va desde el ácido glutámico (Glu - E) 97 a la Fenilalanina (Phe - F) 106.

La secuencia de 15 aminoácidos fue sintetizada por la compañía extranjera Genemed Synthesis Inc. ([www.genemedsyn.com](http://www.genemedsyn.com)) acoplada a un sistema de antigenicidad múltiple (MAP) de ocho ramas asimétrico.

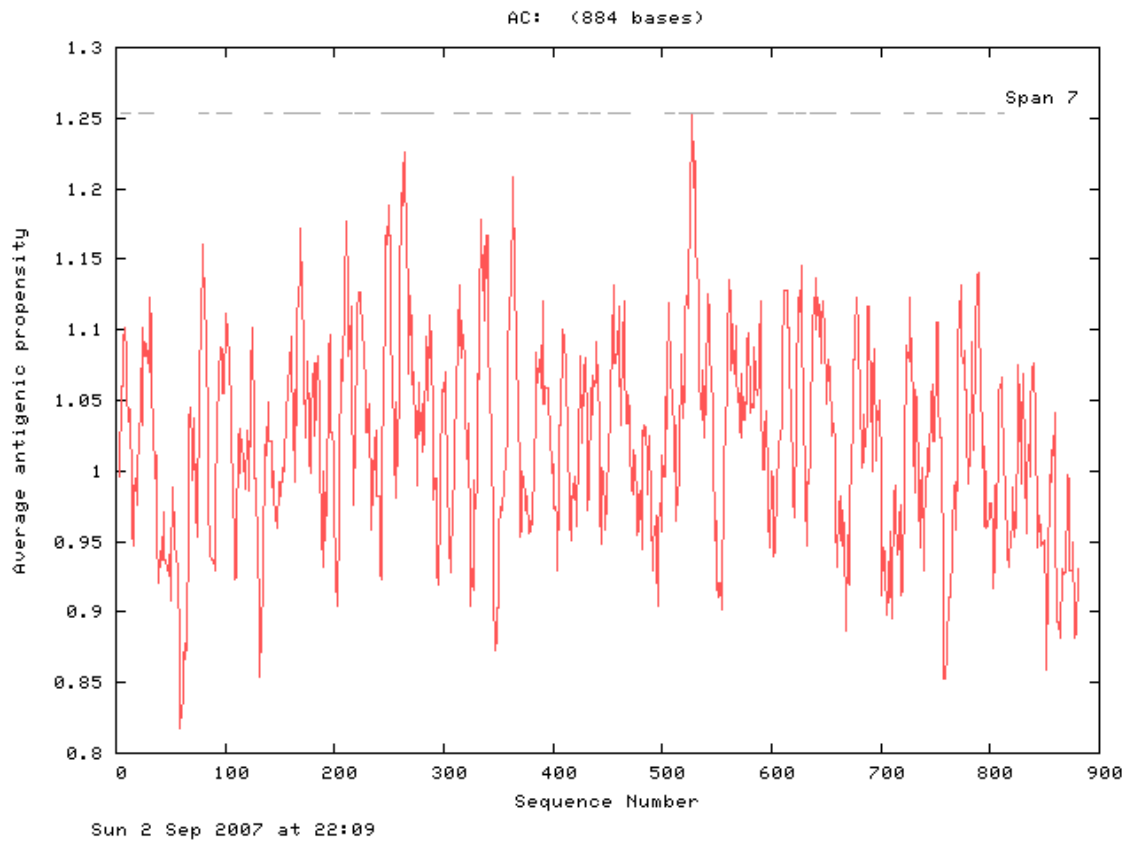


Figura 22: Identificación de las determinantes antigénicas de la secuencia de 884 residuos correspondiente a la proteína EhRAD54 por las herramientas bioinformáticas del sitio de la Universidad de Harvard (<http://mif.dfci.harvard.edu/tools/antigenic.pl>).

Tabla 2. Análisis de las determinantes antigénicas de la proteína EhRAD54 de *Entamoeba histolytica*.

| n  | Posición inicial | Secuencia                                 | Posición final | Determinantes para cada fragmento |
|----|------------------|---|----------------|-----------------------------------|
| 1  | 5                | QAPSVRLAK                                 | 13             | 0                                 |
| 2  | 21               | IKLAFKFGCHAIDQ                            | 34             | 0                                 |
| 3  | 76               | PKLYYWCIF                                 | 84             | 0                                 |
| 4  | 92               | KPG ILEVSFD KLLLF                         | 106            | 1                                 |
| 5  | 136              | NHIKVET                                   | 142            | 0                                 |
| 6  | 154              | IDTGKCFVMS                                | 163            |                                   |
| 7  | 165              | KEVKVLISFPAEK                             | 177            |                                   |
| 8  | 179              | VNGSIFLQK                                 | 187            |                                   |
| 9  | 205              | KKTVFVGRVLLS                              | 216            |                                   |
| 10 | 219              | AKGFVVPYKNAVIQ                            | 232            | 0                                 |
| 11 | 244              | EPDAVVLYQPTV                              | 255            | 0                                 |
| 12 | 257              | SRKEVAVVDPDLLGLLRP                        | 275            |                                   |
| 13 | 277              | QKAGVKFMYDCVMG                            | 290            |                                   |
| 14 | 309              | GKTIQAVTLIWTLLR                           | 323            |                                   |
| 15 | 331              | TCKKVMVAPSSLV                             | 344            |                                   |
| 16 | 356              | GDAAPRVVGVSCSG                            | 369            |                                   |
| 17 | 382              | GYAEIMVISYDQLRIHI                         | 398            |                                   |
| 18 | 406              | GWGLLICDE                                 | 414            |                                   |
| 19 | 423              | IKSSQAVNR                                 | 431            |                                   |
| 20 | 434              | TKRRVILSG                                 | 442            |                                   |
| 21 | 450              | GEFYAMVSFVNPDLGSLSAFK                     | 471            |                                   |
| 22 | 503              | RLTKLFIL                                  | 510            |                                   |
| 23 | 516              | VNQKYLPPKVQHVVFCSLTPLQKKIYTALCNL          | 547            |                                   |
| 24 | 557              | KKSCQFQILTALKKVSNHPWLIQDFVKTFFPEVLGDGILPK | 595            |                                   |
| 25 | 606              | GKTAFLAKLLAFLR                            | 619            |                                   |
| 26 | 622              | KEKIVIVSN                                 | 630            |                                   |
| 27 | 635              | LNFAIHHCKKCGYPYIQLDGSVAA                  | 658            |                                   |
| 28 | 673              | LDEFIFLLSSKAGGCGLNL                       | 691            |                                   |
| 29 | 693              | GGANLVM                                   | 699            |                                   |
| 30 | 722              | KKKCHIYRT                                 | 730            |                                   |
| 31 | 743              | RQIKKLELAGKVVE                            | 756            |                                   |
| 32 | 770              | QLKELCAYKD                                | 779            |                                   |
| 33 | 781              | ACETHDLLGCTCGA                            | 794            |                                   |
| 34 | 807              | GKLEVLRL                                  | 813            |                                   |

Se utilizaron las herramientas bioinformáticas del sitio de la universidad de Harvard

(<http://mif.dfci.harvard.edu/tools/antigenic.pl>) para la predicción de determinantes antigénicas.

De color rojo se encuentran las determinantes que corresponden a las regiones divergentes entre las secuencias de las proteínas EhRad54 y EhRad54b. De color azul una determinante antigénica real de 15 residuos comprendida entre la posición 92 y 106 de EhRAD54.



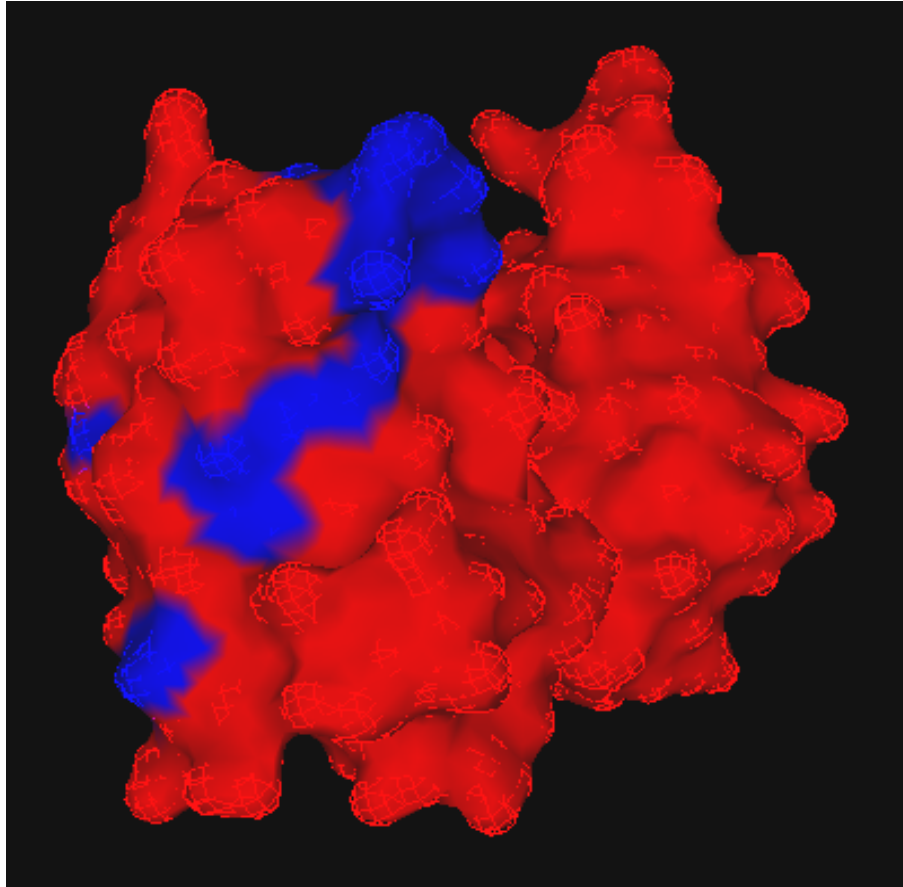


Figura 23: Superficie del extremo amino-terminal de la proteína EhRAD54 de *Entamoeba histolytica*.

En color azul el péptido antigénico compuesto por 15 residuos que en su mayoría se encuentra expuesto al solvente mediante un loop.

## **INMUNIZACIÓN DE RATONES BALB-C PARA LA OBTENCIÓN DE ANTICUERPOS**

Para obtener anticuerpos policlonales específicos contra el péptido sintético EhRAD54 se utilizaron cinco ratones Balb/C de 8 semanas de nacidos. Cuatro de ellos se inocularon con 100 µg del péptido más 50 µl de adyuvante TiterMax Gold, el quinto se mantuvo sin inocular como control negativo. Para verificar que los anticuerpos policlonales obtenidos reconocían al péptido sintético (PAS) se realizaron ensayos de Dot blot, utilizando la técnica de goteo de péptido sintético directamente sobre la membrana de nitrocelulosa, posterior al bloqueo se utilizó el anticuerpo anti-péptido sintético a una dilución 1:1000 y 1:2000 de los ratones 1 y 2. Como controles negativos los sueros pre-inmunes de los mismos ratones a una dilución 1:2000. Como control negativo se utilizó a la proteína PTB de humano (procesamiento del RNAm - spliceosoma) identificada por el anticuerpo primario anti-histidinas. Como se observa en la figura 24 la identificación del anticuerpo hacia el péptido sintético es evidente, dando una menor señal con el suero pre-inmune.

Por otra parte, se realizaron ensayos de Western blot probando los sueros inmunes del ratón 1 y 2, observando que el anticuerpo reconoce al PAS-EhRAD54 (Figura 25) en diluciones que van desde 1:500, 1:1000 y 1:2000. Como controles negativos se encuentran los carriles 1 y 5 correspondientes a los sueros pre-inmunes de ambos ratones, respectivamente, a una dilución de 1:500. La proteína PTB humana etiquetada con un tracto de histidinas, en su extremo carboxilo-terminal se identifica en el carril 9 como control positivo por el anticuerpo anti-histidinas.

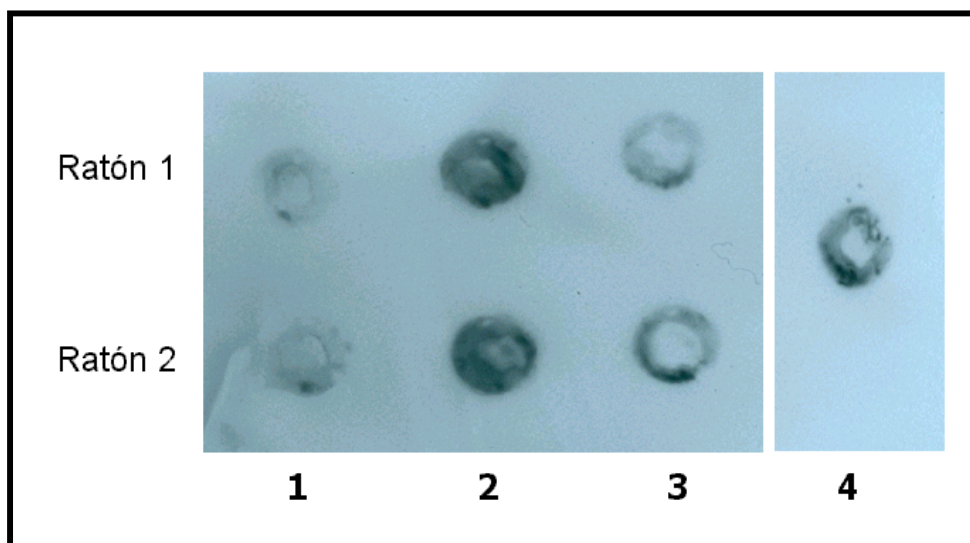


Figura 24. Inmunodetección del péptido sintético EhRAD54 por el anticuerpo anti- PAS EhRAD54.

Carril 1. Suero pre-inmune (controles negativos) a una dilución 1:2000.

Carril 2. Suero inmune (dilución 1:1000).

Carril 3. Suero inmune (dilución 1:2000).

Carril 4. Control positivo: reconocimiento de la proteína recombinante PTB por el anticuerpo anti – histidina.

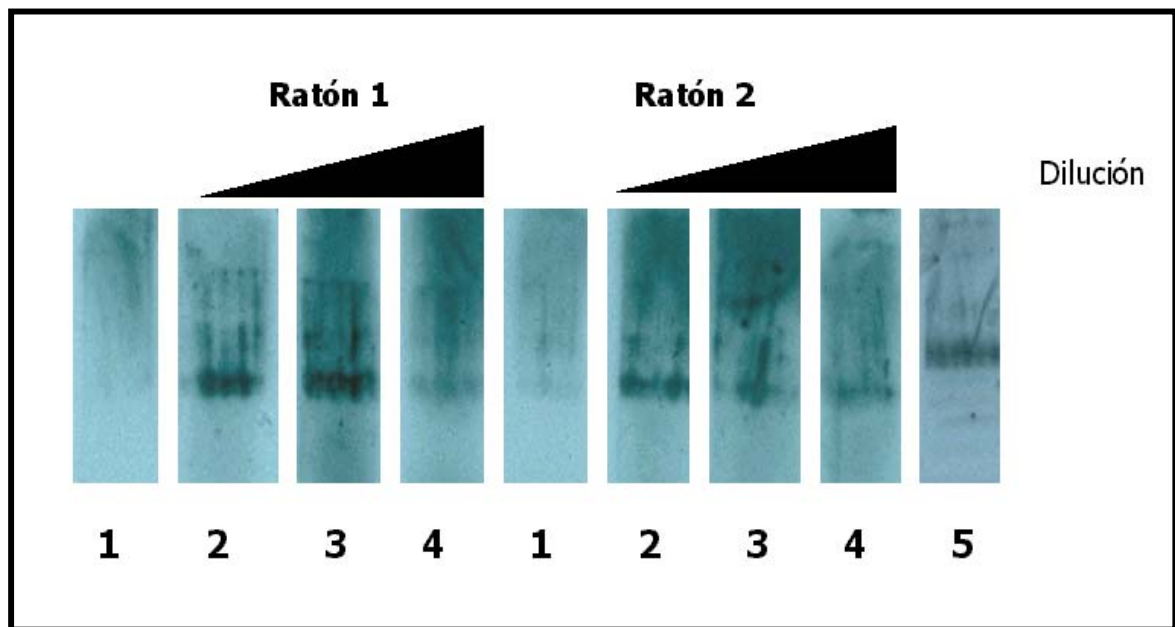


Figura 25. Inmunodetección del péptido sintético EhRAD54 por el anticuerpo anti – PAS EhRAD54.

Carril 1, Suero pre-inmune (control negativo) a una dilución 1:500.

Carriles 2, 3 y 4, Suero inmune 1:500, 1:1000 y 1:2000, respectivamente.

Carril 5, Control positivo: reconocimiento de la proteína recombinante PTB por el anticuerpo anti – histidina.

## OBTENCIÓN DE POLIPÉPTIDO RECOMBINANTE EHRAD54-GST PARA COMPROBAR LA FUNCIONALIDAD DE LOS ANTICUERPOS ESPECÍFICOS.

El fragmento de 581 pb del extremo 5' del gen *Ehrad54* de *Entamoeba histolytica* se amplificó a partir de ADN genómico de trofozoitos mediante una reacción de PCR, utilizando oligonucleótidos específicos sentido y antisentido con los sitios de corte de las enzimas *Bam*HI y *Xho*I respectivamente. En la figura 26 se observa el amplificado como banda única correspondiente al fragmento del gen *Ehrad54* de 581 pares de bases.

El producto de PCR fue clonado en el vector pTZ57R/T del Kit InsTAclone PCR de la compañía Fermentas, diseñado para clonar fragmentos de ADN amplificados por PCR. Para corroborar que la clonación se realizó exitosamente se realizó un ensayo de restricción enzimática utilizando a las enzimas *Bam*HI y *Xho*I, cuyo resultado se muestra en la figura 27. Se observa en los carriles 2, 3, 4 y 5 la liberación del fragmento de 581 pb correspondiente al fragmento del gen *Ehrad54*. En el carril 6 como control negativo se observa la construcción pTZ57R/T -*Ehrad54* sin restringir.

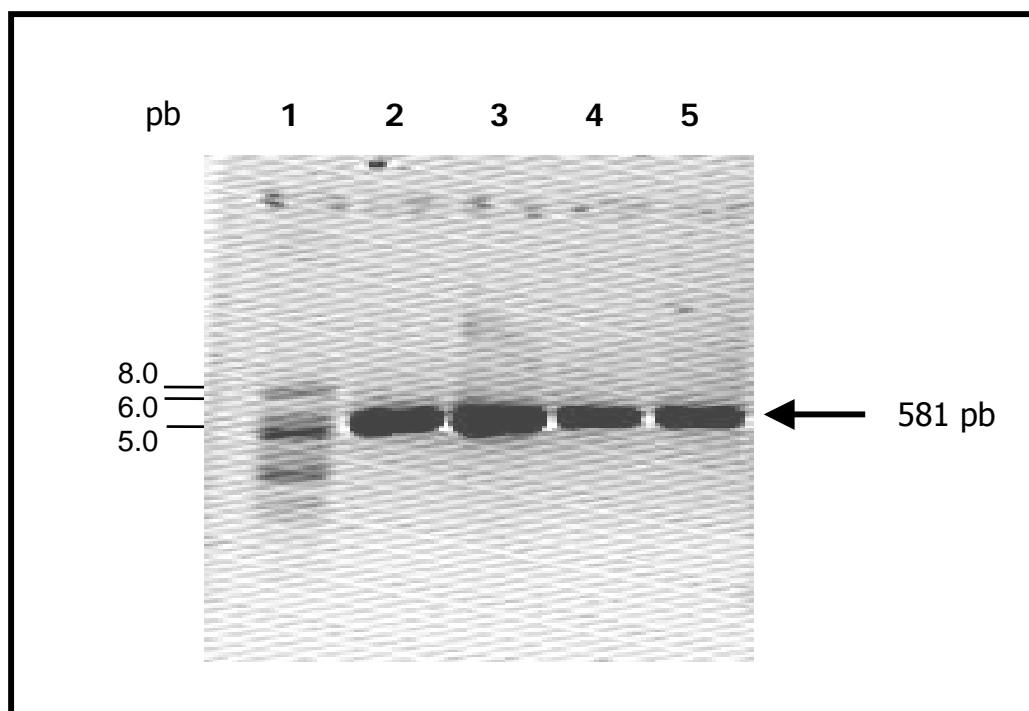


Figura 26. Amplificación de 581 pb correspondientes al fragmento del gen *Ehrad54* de *Entamoeba histolytica*. Gel de agarosa 1X teñido con bromuro de etidio.

Carril 1. Marcadores de tamaño molecular de 1 Kb.

Carril 2, 3, 4 y 5. Banda única correspondiente al amplificado de 581 pares de bases.

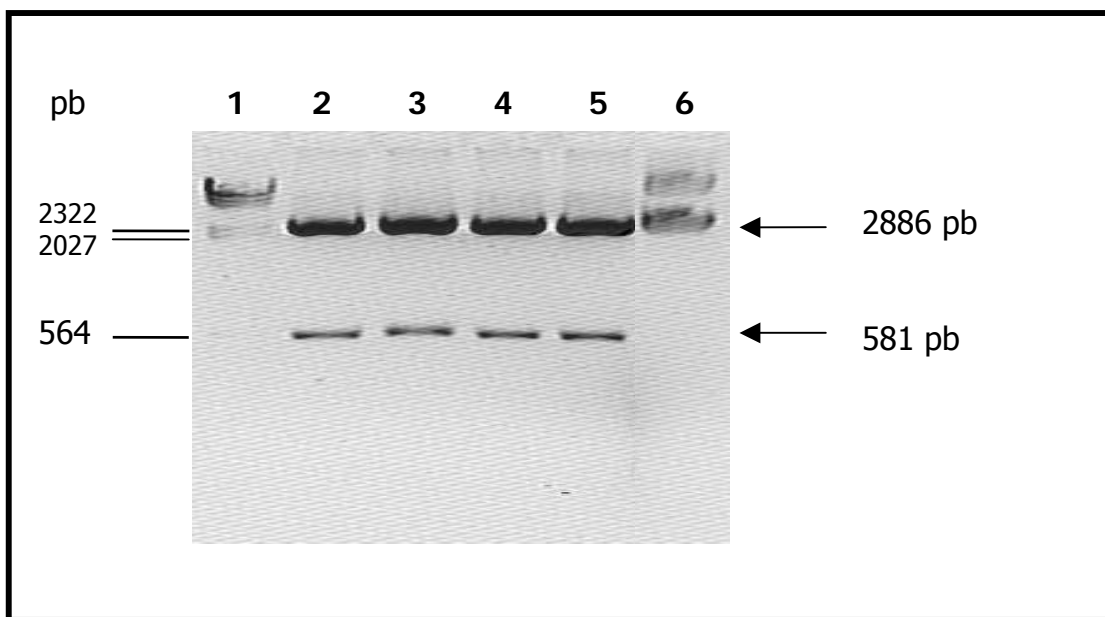


Figura 27. Restricción enzimática de la construcción pTZ57R/T-*Ehrad54* .

Gel de agarosa 1X teñido con bromuro de etidio.

Carril 1. Marcadores de tamaño molecular Lambda-HindIII.

Carriles 2, 3, 4 y 5. Banda única correspondiente a la liberación del fragmento de de 581 pares de bases correspondiente al gen *Ehrad54*.

Carril 6. Construcción pTZ57R/T-*Ehrad54* sin restringir.

Posteriormente, por restricción enzimática con las enzimas *Bam*HI y *Xho*I se liberó el fragmento del gen *Ehrad54* y conjuntamente se linearizó el vector pGEX6p1 (GE Health Care). Mediante el análisis electroforético en un gel de agarosa al 1% TAE 1X y se observó que la resticción enzimática se llevó a cabo correctamente. El vector pGEX6p1 linearizado presentó un tamaño molecular de 4952 pb, mientras que el vector pTZ57R/T linearizado presentó un tamaño molecular de 2886 pb. Por otro lado se observa el fragmento del gen *Ehrad54* liberado, que presentó un tamaño molecular esperado de 581 pb (figura 28-A). Se cortó la banda correspondiente al gen y al vector linearizado y se purificaron utilizando el kit de Gene Clean II (descrito en materiales y métodos). Como se muestra en la figura 28-B con el ADN purificado se realizó una electroforesis en un gel de agarosa al 1% TAE 1X para verificar la integridad del ADN purificado y estimar la concentración de cada uno de los fragmentos *Ehrad54* y pGEX6p1 usando 1, 3 y 5 microlitros de una dilución de 1:10. La reacción de ligación del gen *Ehrad54* en el vector pGEX6p1 se realizó usando una relación 1:3 (vector: inserto).



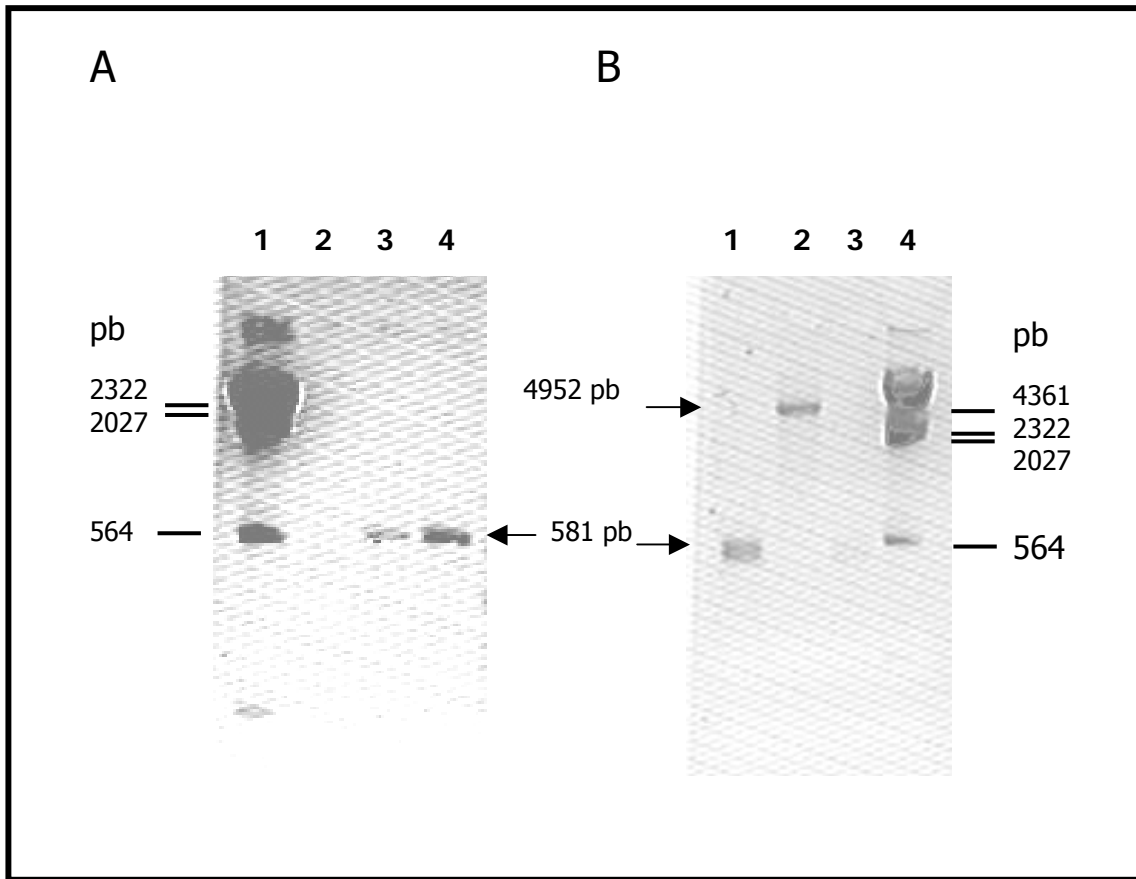


Figura 28. Corrimiento electroforético en gel de agarosa TAE 1% del fragmento del gen *Ehrad54* y del vector pGEX6p1 restringidos y purificados con fines de cuantificación.

A: Dilución 1:10 del fragmento del gen *Ehrad54*, con fines de cuantificación.

Carril 1, Marcador de tamaño molecular Lambda – HindIII.

Carriles 2, 3 y 4; 1, 3 y 5 microlitros, respectivamente, de la dilución 1:10 del fragmento de 581 pb del gen *Ehrad54*.

B: Relación 1:3 vector pGEX6p1 – inserto *Ehrad54*.

Carril 1, Fragmento del gen *Ehrad54* (10 microlitros) purificado, restringido y purificado nuevamente a partir de la amplificación de PCR.

Carril 2, Vector pGEX6p1 (2 microlitros) linearizado y purificado con un tamaño de 4952 pb.

Carril 3, Producto liberado (10 microlitros) de la construcción pTZ57R/T -*Ehrad54* purificado.

Carril 4, Marcador de tamaño molecular Lambda – HindIII.

Con base en los resultados anteriores, se transformaron bacterias competentes *E. coli* (*DH5a*) con 10 microlitros de la mezcla de ligación y se obtuvo el ADN plasmídico para verificar la presencia del vector pGEX6p1-*Ehrad54*. Para liberar el inserto se realizó una digestión utilizando las enzimas *Bam*HI y *Xho*I , se realizó una electroforesis de los productos de la digestión en gel de agarosa al 1% en TAE 1X (Figura 29). Los resultados muestran que la ligación fue exitosa ya que cuatro de cinco clonas analizadas fueron positivas, mostrando la liberación del inserto con el tamaño esperado de 581 pb y al plásmido lineal de 4.9 kb. Se tomó al azar una clona positiva para secuenciarla y comprobar así la identidad del inserto clonado. El análisis de la secuencia de ADN mostró que corresponde al gen *Ehrad54* predicho.

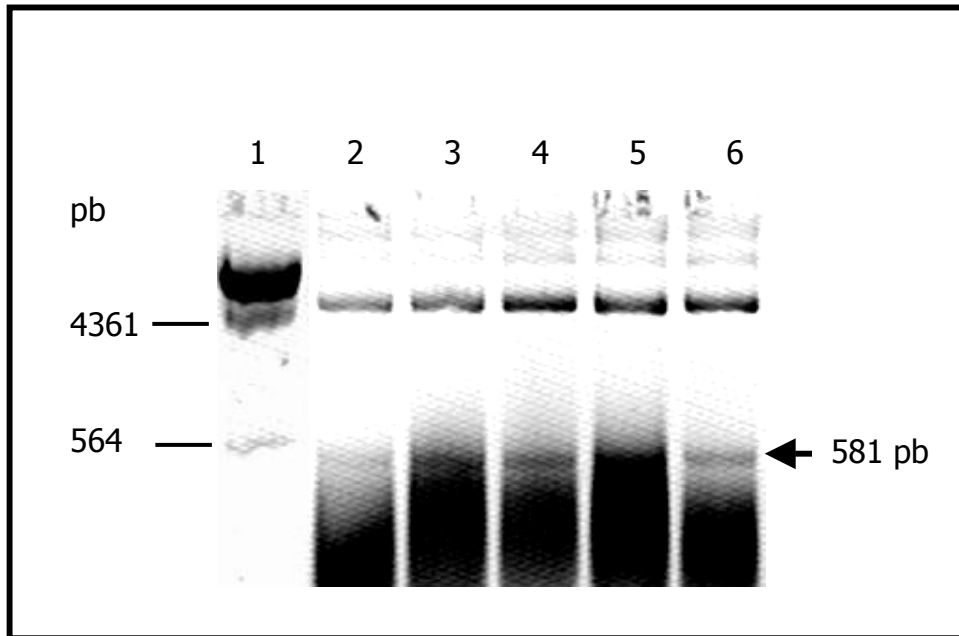


Figura 29. Restricción enzimática de la construcción pGEX6p1-*Ehrad54*.  
Gel de agarosa TAE 1%. Carril 1. Marcadores de tamaño molecular Lambda-HindIII.  
Carriles 3, 4, 5, 6 y 7. Clonas positivas con liberación de inserto correspondiente  
al gen *Ehrad54* de 581 pb.  
Carril 2. Clona negativa sin liberación de inserto.

Para inducir la expresión de la proteína recombinante EhRAD54-GST se transformaron bacterias *E.coli* BL21 (DE3) pLysS con el plásmido pGEX6p1-*Ehrad54* y se indujo la expresión de la proteína EhRAD54- GST con IPTG 1mM durante 1, 3 y 5 horas así como toda la noche a 36°C en agitación a 225 rpm. Los 581 pb correspondientes al fragmento del gen *Ehrad54* codifican para una proteína de 21.5 kDa que sumados a los 26 kDa de la proteína GST codificada por el vector darán como resultado la sobreexpresión de una proteína recombinante de 47.5 kDa. Una vez transcurrido este tiempo, el cultivo con las bacterias transformadas se empastilló y se lisó para obtener las proteínas totales con las cuales se realizó una electroforesis (SDS-PAGE al 10%). Después de teñir con azul de Coomassie, se observó la sobreexpresión de una proteína de 47.5 kDa en los extractos de las bacterias inducidas por 3 y 5 horas (Figura 28 A), la cual no aparece en el control de proteínas totales de bacterias no inducidas. Como control se observa la inducción de la proteína de unión GST de 26 kDa que resulta de la transformación de bacterias *E.coli* BL21 con 1 µl del vector pGEX6p1 circular sin inserto (Figura 30 A).

Para comprobar la identidad de la proteína expresada, se realizó un ensayo de Western blot con extractos proteicos totales de las bacterias transformadas e inducidas con IPTG, utilizando un anticuerpo monoclonal anti-GST. El anticuerpo reconoció a una proteína que presenta un peso aparente de ~ 47.5 kDa, el cual corresponde al peso molecular esperado para la EhRAD54-GST (Figura 30 B). También se puede observar el reconocimiento inespecífico de algunas proteínas bacterianas. Como control negativo se usaron extractos proteicos totales de bacterias transformadas sin inducir. Como control positivo se muestra el reconocimiento de la proteína GST con un peso aproximado de 26 kDa por el anticuerpo anti – GST (Figura 31 B).

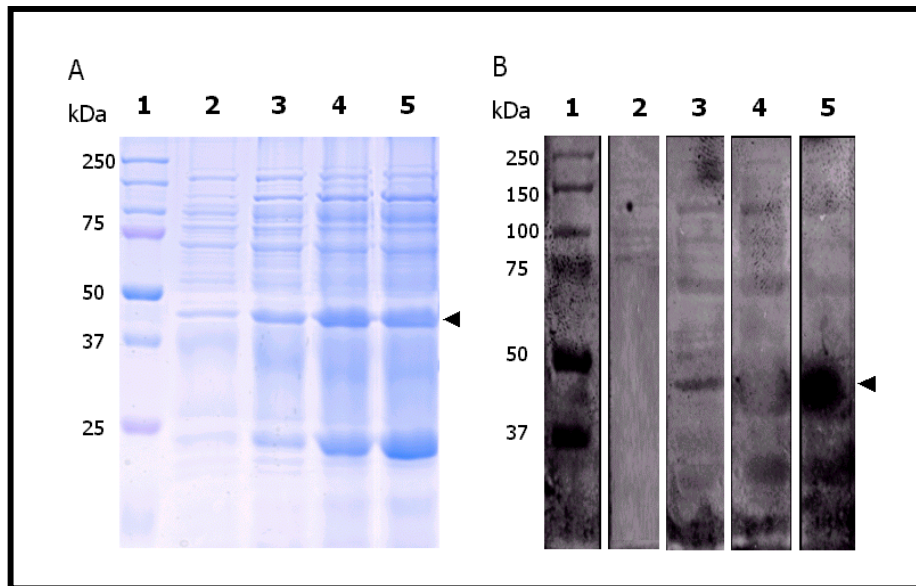


Figura 30. Inducción de la proteína recombinante EhRAD54 - GST de *Entamoeba histolytica*.

A) Corrimiento electroforético en gel de acrilamida al 10% . Carril 1: Marcadores de peso molecular Dual Color. Carril 2. Extractos totales de bacterias BL21 pLysS DE3 transformadas totales sin inducir. Carril 3. Extractos bacterianos a una hora de inducción. Carril 4. Extractos bacterianos a tres horas de inducción. Carril 5. Extractos bacterianos a cinco horas de inducción.

B) Inmunodetección por Western Blot de la proteína EhRAD54 - GST de 47.5 kDa. La flecha indica la localización de la proteína recombinante EhRAD54 – GST en el peso molecular esperado de 47.5 kDa.

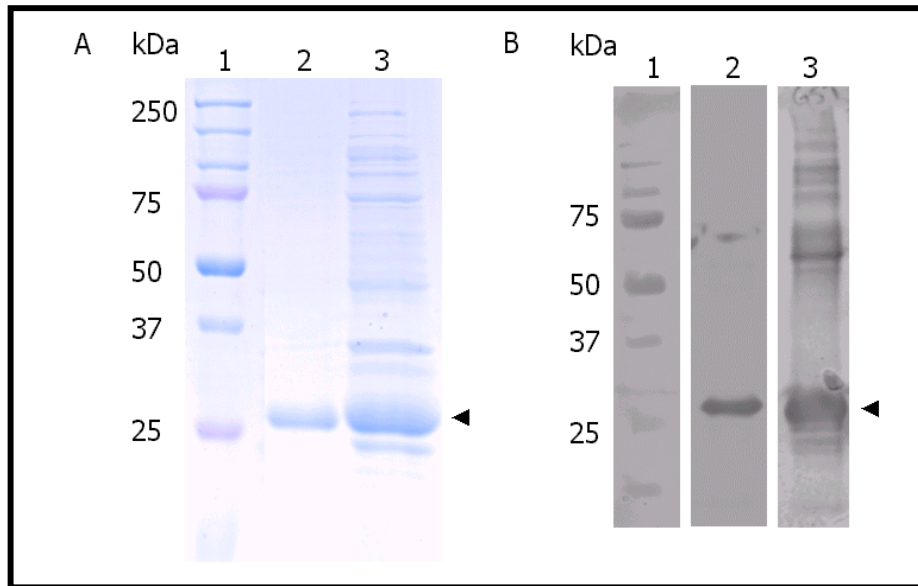


Figura 31. Inducción de la proteína de unión GST.

A) Corrimiento electroforético en gel de acrilamida al 10%.

Carril 1: Marcadores de peso molecular Dual Color. Carril 2. Proteína GST purificada. Carril 3. Extractos bacterianos posteriores a 3 horas de inducción.

B) Inmunodetección por Western Blot de la proteína GST de 26 kDa.

La flecha indica la localización de la proteína GST en el peso molecular esperado de 26 kDa.

Una vez que se tenía estandarizada la expresión de proteína recombinante EhRAD54-GST por bacterias *BL21 pLysS DE3* transformadas con la construcción pGEX6p1-*Ehrad54*, lo siguiente fue corroborar el reconocimiento de la misma por el anticuerpo anti-péptido sintético EhRAD54. Para lo anterior se realizó un ensayo de Western blot, previo corrimiento electroforético en gel de acrilamida al 10% y su respectiva transferencia a membrana de nitrocelulosa utilizando los mismos extractos bacterianos inducidos y sin inducir que en el ensayo anterior, esta vez utilizando como primer anticuerpo al anti-péptido sintético en una dilución de 1:500 y como segundo anticuerpo un cabra anti – IgG de ratón a una dilución de 1:2000. El resultado se muestra en la figura 32. Se observa reconocimiento de la banda de 47.5 KDa anteriormente observada en los extractos bacterianos. Esto indica que el anticuerpo anti-PAS EhRAD54 reconoce a la proteína recombinante EhRAD54-GST de *Entamoeba histolytica*.

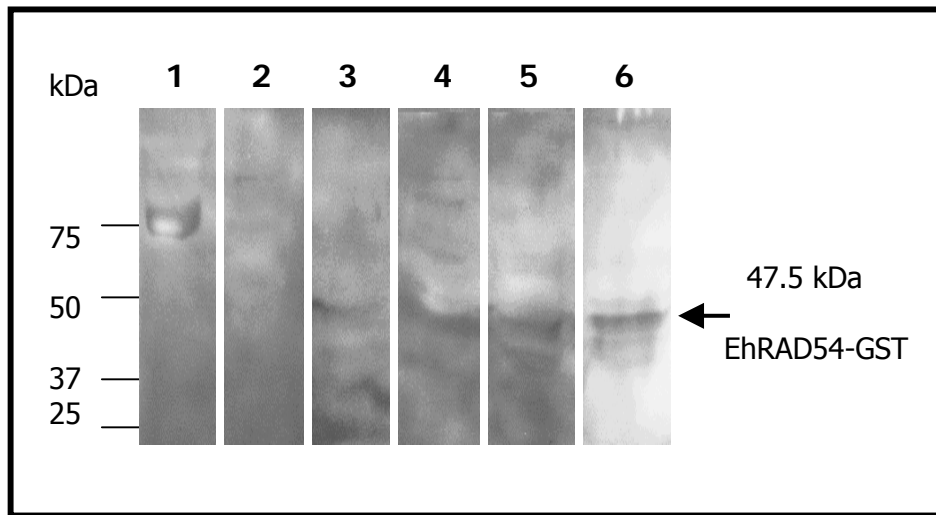


Figura 32. Inmunodetección de la proteína recombinante EhRAD54-GST de *Entamoeba histolytica* por el anticuerpo específico anti – PAS EhRAD54. Carril 1. Marcador de peso molecular Dual Color. Carril 2. Extractos de bacterias BL21 pLysS DE3 transformadas totales sin inducir como control negativo. Carril 3. Extractos bacterianos a una hora de inducción. Carril 4. Extractos bacterianos a tres horas de inducción. Carril 5. Extractos bacterianos a cinco horas de inducción. Carril 6. Extractos bacterianos inducidos toda la noche.



## **INMUNODETECCIÓN DE LA PROTEÍNA EHRAD54 EN TROFOZOITOS DE *ENTAMOEBIA HISTOLYTICA* EN RESPUESTA AL DAÑO AL ADN**

Para estudiar la expresión y localización subcelular de la proteína nativa EhRAD54 de *Entamoeba histolytica* en respuesta al daño al ADN, se obtuvieron extractos nucleares (EN) y citoplásmicos (EC) de trofozoítos a los de 5 y 30 minutos después de la irradiación con luz UV y sin irradiar. Los extractos se cuantificaron por el método de Bradford y se verificó la integridad de los mismos por medio de un SDS-PAGE al 10%, que teñido con azul de coomasie nos permite observar el bandeo característico de las fracciones citoplásmica y nuclear (datos no mostrados). Posteriormente se realizó un ensayo de Western blot utilizando el suero anti-PAS EhRAD54 de ratón previamente obtenido. Como control positivo, se utilizó el anticuerpo policlonal de conejo anti-EhRAD51 previamente obtenido por la Dra. Mavil López Casamichana (López-Casamichana *et al.*, 2008). Para identificar a la proteína EhRAD54 se utilizó el primer anticuerpo obtenido en ratón a una dilución 1:500 y el segundo anticuerpo de cabra anti – IgG de ratón a una dilución 1:2000. Para la proteína EhRAD51 se utilizó el primer anticuerpo obtenido en conejo a una dilución 1:500 y el segundo anticuerpo de cabra anti – IgG de conejo a una dilución 1:4000. Como control del fraccionamiento nuclear y citoplásmico de los extractos proteicos amibianos se realizaron ensayos de WB utilizando anticuerpos anti-actina a una dilución de 1:1000 y como segundo anticuerpo un anti-IgG de ratón (Figura 33, panel C).

Como se observa en panel A de la figura 33, la proteína EhRAD54 endógena es débilmente detectada en fracciones citoplásmicas y nucleares de trofozoitos sin irradiar. Sin embargo su detección se hace más evidente en extractos nucleares y citoplásmicos de trofozoitos irradiados y cosechados posterior a los 5 minutos del tratamiento con luz UV. En lo que respecta a los extractos nucleares y citoplásmicos de trofozoitos irradiados y cosechados posterior a los 30 minutos del daño genotóxico la proteína se vuelve imperceptible.

La proteína EhRAD51 utilizada como control positivo muestra un patrón similar al ya reportado (López-Casamichana *et al.*, 2008) (figura 33, panel B), ya que se observa su mayor expresión en las fracciones citoplásmica y nucleares de trofozoítos irradiados y cosechados al paso de 30 minutos de la irradiación con luz UV, siendo menos perceptible en fracciones citoplásmicas y nucleares de trofozoítos no irradiados e irradiados y cosechados a los 5 minutos posteriores al daño.

En el panel C de la figura 33, se observa la inmunodetección de la proteína mayoritariamente citoplásmica, Actina, lo que confirma que no hay contaminación entre ambos extractos.

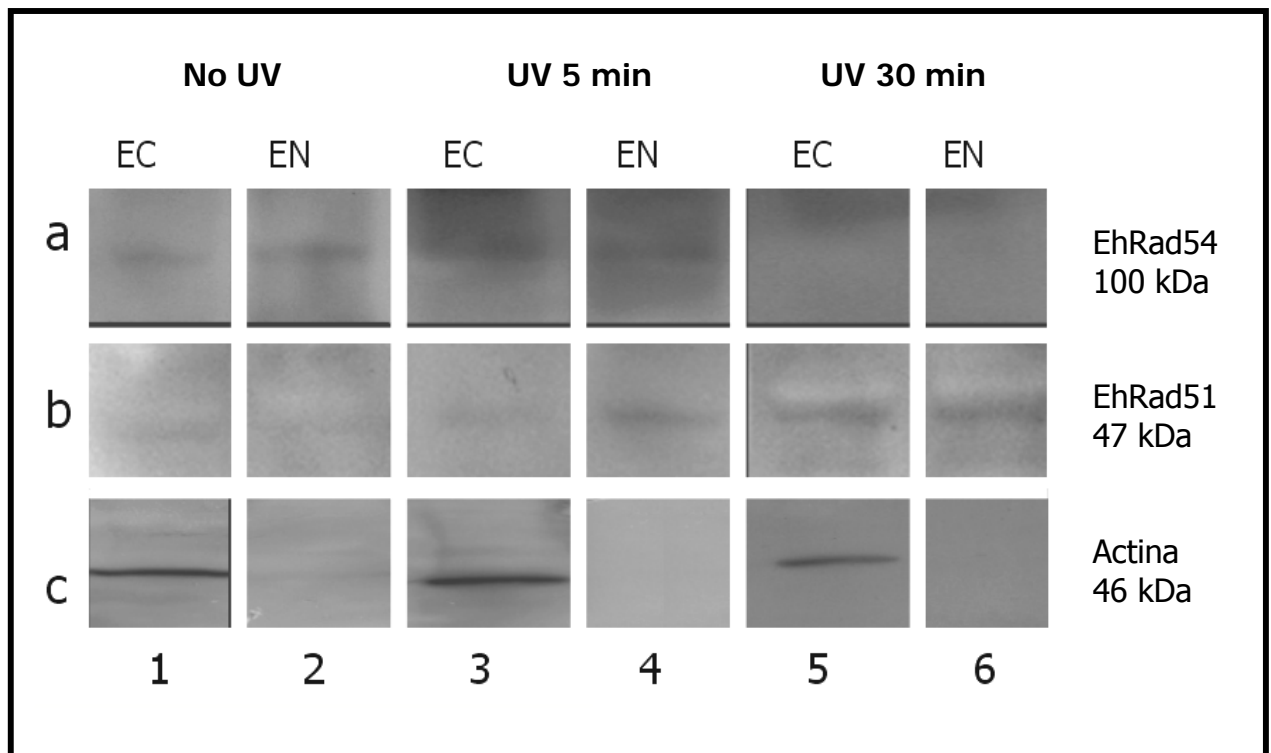


Figura 33. Inmunodetección de la proteína endógena EhRAD54 por Western blot usando los anticuerpos policlonales anti-PSA EhRAD54.

A. Inmunodetección de la proteína endógena EhRAD54.

B. Inmunodetección de la proteína endógena EhRAD51 (control positivo).

C. Inmunodetección de la proteína actina como control de fraccionamiento proteico.

Carril 1 y 2. Extractos citoplásmicos y nucleares de trofozoitos sin irradiar.

Carril 3 y 4. Extractos citoplásmicos y nucleares de trofozoitos irradiados con luz UV y cosechados después de 5 minutos del daño genotóxico.

Carril 5 y 6. Extractos citoplásmicos y nucleares de trofozoitos irradiados con luz UV y cosechados después de 30 minutos del daño genotóxico.

## DISCUSIÓN

Los parásitos protozoarios son capaces de modificar su fenotipo, en particular en aspectos relacionada con la variación antigénica, multirresistencia a drogas y virulencia, para poder sobrevivir en el huésped. Particularmente, los trofozoítos de *Entamoeba histolytica*, el parásito responsable de la amibiasis humana, catalogada por la OMS en el año 2000 como la tercer causa de muerte por parásitos a nivel mundial y uno de los principales problemas de salud en México, presentan varios grados de virulencia en el huésped, incluyendo una infección asintomática, una disentería o amibiasis intestinal caracterizada por cuadros inespecíficos de diarrea e inflamación abdominal, y la formación de abscesos hepáticos que pueden ser mortales al producir shock séptico, infección secundaria a otros órganos, perforación con peritonitis y formación de fístulas (Sánchez-Pobre *et al.*, 2004). El hecho de que exista esta variedad de formas clínicas refleja una gran plasticidad del genoma del parásito con rearrreglos genómicos para modificar la expresión genética, probablemente asociados a eventos de recombinación homóloga durante la replicación del ADN.

Recientemente, nuestro grupo de trabajo reportó la identificación de la posible maquinaria de RH en *Entamoeba histolytica*. También estandarizó un modelo de irradiación de trofozoitos con luz UV para producir DSB en ellos, lo que induce la activación de procesos de recombinación homóloga para desencadenar los mecanismos de restauración de la integridad del ADN y así, la sobrevivencia de los parásitos (López-Casamichana *et al.*, 2008). Mediante ensayos de RT-PCR y microarreglos, se observó que la expresión génica de la maquinaria de RH en *E. histolytica* no es coordinada. Particularmente, el gen *Ehrad54* se expresa de forma constitutiva, aumentando su expresión ante el estímulo de luz UV a los 5 minutos posteriores al daño del DNA, mientras que el gen parálogo *Ehrad54b* no parece transcribirse bajo estas condiciones experimentales (López-Casamichana *et al.*, 2008; López-Camarillo *et al.*, enviado). Esto sugiere que *Ehrad54* podría ser un marcador de respuesta temprana en el mecanismo de RH en *E. histolytica*. También sugiere la presencia de secuencias reguladoras conservadas que permiten la inducción de la transcripción en respuesta al estrés, como lo es la luz

UV. En particular, estas secuencias podrían estar presentes en el promotor del gen *Ehrad54* y ausente en el del gen *Ehrad54b*, explicando la expresión diferencial de estos genes parálogos.

En este trabajo, caracterizamos estructuralmente a los promotores de los genes sobreexpresados en respuesta al daño al ADN en el ensayo de microarreglos (López-Camarillo *et al.*, enviado), incluyendo al del gen *Ehrad54*. También incluimos al promotor del gen parálogo *Ehrad54b*. Los promotores contienen mayoritariamente adenina y timina, lo que concuerda con la literatura que reporta que el genoma de *E. histolytica* es rico en adeninas y timinas, con aproximadamente un 78% (Sterling *et al.*, 2004).

De manera interesante, secuencias reguladoras aparentemente básicas para la transcripción de *E. histolytica* como son: la caja TATA, el elemento Inr y el elemento GAAC (Singh y Rogers, 1997), sólo se encontraron en el 37%, 10% y 53% de las secuencias analizadas, respectivamente, lo que es congruente con los datos reportados recientemente por Hackney y colaboradores (2007). Lo anterior muestra que la información obtenida a partir del análisis de un pequeño número de genes no siempre puede generalizarse. El conocimiento del genoma de *E. histolytica* permite analizar un mayor número de genes y así obtener datos más veraces, en particular con respecto a la frecuencia de secuencias reguladoras como la caja TATA, el elemento Inr y el elemento GAAC. También sugiere que *E. histolytica* podría contar con otros elementos reguladores, además de los ya mencionados, para dar inicio al proceso de transcripción.

La presencia del elemento de choque térmico HSE en 11 de las 29 secuencias analizadas, sugiere que el estímulo nocivo de la luz UV podría considerarse como un factor de estrés para los trofozoítos, favoreciendo la unión de un factor de transcripción al elemento HSE para aumentar la transcripción de proteínas involucrados en la sobrevivencia del parásito, incluyendo genes de la maquinaria de RH para la reparación del ADN. Sin embargo, este elemento está ausente en 18 promotores, lo que indica que otras secuencias intervienen para regular la transcripción en respuesta al daño al ADN.

Una de estas secuencias podría ser el elemento M29, ya que se encontró en todos los promotores analizados. Además coincide con los MOTIVOS 1 y 5, también encontrados en todos los promotores, ya que ambos contienen la secuencia GAAGA. En particular, el motivo M29 y el MOTIVO 1 están presentes en la región promotora del gen *Ehrad54* pero no en el promotor del gen parálogo *Ehrad54b*, lo que podría explicar la expresión diferencial de ambos genes en respuesta al daño al ADN. También es posible que los motivos presentes en el promotor del gen *Ehrad54b* sean activados en respuesta a otro estímulo o bajo otras condiciones. Otra secuencia podría ser el MOTIVO 3 presente en todos los promotores de genes inducidos a los 5 minutos post irradiación. Este motivo pudiera ser el responsable de la respuesta transcripcional temprana en respuesta al daño al ADN. Por otra parte, casi todos los promotores de genes inducidos a las 3 horas post irradiación contienen el MOTIVO 4 que pudiera regular la transcripción en eventos más tardíos en respuesta al daño genotóxico.

Para conocer más acerca de la regulación de los eventos moleculares de la RH en *E. histolytica*, nos enfocamos al estudio de la proteína codificada por el gen *Ehrad54*. El gen localizado en el locus EHI103840 en el Pathema (<http://pathema.jcvi.org/cgi-bin/Entamoeba/PathemaHomePage.cgi>) codifica una proteína de 884 aminoácidos (100 kDa), cuya secuencia mantiene altos porcentajes de identidad y homología con proteínas RAD54 de otros organismos y está filogenéticamente relacionada con las mismas. Esta proteína cuenta con los motivos estructurales y funcionales (SNF2, 1 dominio de helicasa con 7 motivos conservados incluyendo al motivo DEGH) característicos de esta familia de proteínas. Además la estructura tridimensional modelada presenta un plegamiento con la típica estructura bilobulada de las proteínas RAD54, la cual divide al dominio de helicasa en dos partes, a saber DH1 (Dominio de Helicasa 1) y DH2 (Dominio de Helicasa 2) ubicados en los extremos carboxilo y amino terminal, respectivamente (Thoma *et al.*, 2005). En el lóbulo que corresponde al dominio DH1 se localizan cuatro de los siete motivos característicos de la superfamilia de helicasas SNF2: I - CIMADEMGLGKTLQ, Ia - KPEIDKVI VVSPSSLVRNW , II - VGLVICDEGHR y III - RRVLISGTPIQN, mientras que en el segundo lóbulo (DH2) encontramos a los motivos IV - DKVVLVSNYTQTLDL, V FMLSSKAGGCGLNLIG y VI LVMFDPDWNPANDEQAM ARVW (Thoma *et al.*, 2005).

El motivo ResIII identificado en la proteína EhRAD54 es característico de las endonucleasas de restricción tipo III, las cuales son hetero – oligoméricas, y proteínas multifuncionales compuesta de dos subunidades, Res y Mod. La subunidad Mod reconoce secuencias de ADN metiltransferasa específicas, esto equivale funcionalmente a las subunidades M y S de las endonucleasas de restricción I. Res es requerida para restringir, sin embargo no posee actividad enzimática por si sola. En bacterias, las enzimas tipo III reconocen secuencias cortas asimétricas de 5 a 6 pb de longitud y escinden de 25 a 27 pb río abajo de esta para formar pequeños extremos cohesivos de cadena sencilla; requieren la presencia de dos sitios de reconocimiento no metilados orientados inversamente para que la restricción ocurra. Las enzimas tipo III pertenecen a la subfamilia beta de metiltransferasas adenina N-6, conteniendo siete motivos característicos de esta familia incluyendo el motivo I, el sitio de unión AdoMet (FXGXG), y el motivo IV siendo esta la región catalítica (S/D/N (PP) Y/F) (Thoma *et al.*, 2005). La presencia del motivo ResIII, podría explicar que las proteínas RAD54 carezcan de la función de helicasa a pesar de tener el motivo SNF2, y actúan como translocasas de ADN.

Todos estos datos sugieren que la proteína codificada por el gen *Ehrad54* podría ser una RAD54 y que pudiera desempeñar una función similar a la ya reportada para estas proteínas en otros organismos, principalmente destacando su participación en el evento de RH para reparar DSB.

Para investigar su posible participación en el mecanismo de RH en *E. histolytica*, evaluamos la expresión y localización celular de la proteína EhRAD54 en respuesta al daño al ADN. Para lo anterior, se diseñó un péptido antigénico sintético (PAS) de 15 residuos correspondiente a una secuencia del extremo amino terminal de la proteína EhRAD54, para inocularlo en ratones y obtener anticuerpos específicos contra la proteína EhRAD54 de *E. histolytica*. Estos anticuerpos reconocieron de manera específica al polipéptido recombinante EhRAD54-GST DE 47.5 kDa en ensayos de Western Blot, confirmando la funcionalidad de los anticuerpos.

La inmunodetección de la proteína EhRAD54 endógena de 100 kDa en extractos nucleares de trofozoítos no irradiados indica que el gen *Ehrad54* se expresa de manera constitutiva, lo que es congruente con los resultados de la RT-PCR (López Casamichana *et al.*, 2008). Esto sugiere que la proteína participa en eventos de recombinación del ADN, probablemente durante la replicación del ADN contribuyendo así a la variabilidad genética de los trofozoítos. El aumento de la expresión de la proteína EhRAD54 a los 5 minutos después de la irradiación coincide con la sobreexpresión del gen *Ehrad54* observada en el ensayo de microarreglos (López Camarillo *et al.*, enviado), confirmando que la proteína EhRAD54 podría participar en etapas tempranas del proceso de reparación del ADN por RH, probablemente asociada a la proteína EhRAD51. El hecho de no detectar a la proteína EhRAD54 a los 30 minutos posteriores al daño genotóxico sugiere que esta proteína se degrada después de haber cumplido su función de estabilizar al núcleofilamento y contribuir a la búsqueda de la homología interactuando con EhRAD51. Otra hipótesis podría hacer referencia a un posible enmascaramiento del epítipo de la proteína EhRAD54 por algún complejo proteico, estos elementos pudieran ser las proteínas EhRAD55 y EhRAD57, sin embargo esta hipótesis implica que la interacción de estas proteínas es resistente al proceso de desnaturalización de la electroforesis.

Basándonos en los resultados anteriores, se propone un modelo hipotético (Figura 34) para la reparación temprana de DSB en *E. histolytica* mediante la proteína EhRAD54: cuando se genera DSB en el genoma de *E. histolytica*, la maquinaria del grupo de epistasis EhRAD52, comenzaría su acción para reparar el ADN. Lo anterior, podría involucrar la adhesión de la proteína EhRAD51 a la cadena sencilla de ADN, y es precisamente en este paso, donde la proteína EhRAD54 podría cumplir su función en las primeras etapas de reparación (5 minutos), asociándose al núcleofilamento estabilizándolo y favoreciendo la búsqueda de homología. Posterior a esto, se proponen dos opciones, que la proteína EhRAD54 se degrade después de cumplir con esta función o que forme parte de un complejo proteico mayor donde intervengan más proteínas del grupo de epistasis



como lo son EhRAD55 y EhRAD57 (30 minutos), sin embargo, se necesita ahondar más en este mecanismo para confirmar alguna de nuestras hipótesis. Como resultado, se llevaría a cabo la correcta reparación del ADN mediante RH, contribuyendo no sólo a mantener la integridad del genoma sino a su consecuente variabilidad.

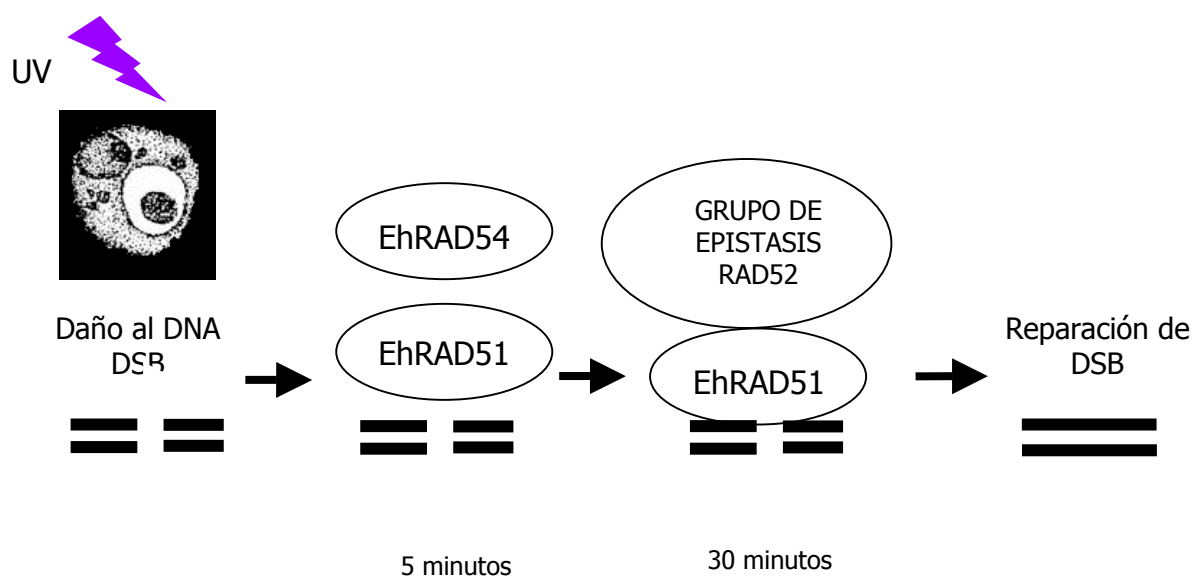


Figura 34. Modelo hipotético del papel de la proteína EhRAD54 en la reparación de DSB mediante el proceso de recombinación homóloga. EhRAD54 interacciona con la recombinasa EhRAD51 en tiempos tempranos para reparar DSB.

## CONCLUSIONES

- 1.- Se identificaron secuencias reguladoras conservadas en las regiones promotoras de genes de *E. histolytica* inducidos por el daño al DNA.
2. Las secuencias reguladoras identificadas en el promotor del gen *Ehrad54* no están presentes en el promotor del gen *Ehrad54b*, lo que pudiera explicar el comportamiento diferente de estos genes parálogos.
- 3.- El gen *Ehrad54* codifica para una proteína que presenta todas las características estructurales de la familia RAD54.
- 4.- Utilizando un péptido antigénico sintético, se generaron anticuerpos específicos contra la proteína EhRAD54 de *E. histolytica*, los cuales fueron capaces de inmunodetectar al polipéptido EhRAD54-GST recombinante, confirmando su funcionalidad.
5. La expresión constitutiva de la proteína EhRAD54 en extractos nucleares de trofozoítos sugiere su participación en eventos de recombinación durante la replicación del ADN.
6. Su sobreexpresión en extractos nucleares de trofozoítos irradiados y cosechados a los 5 minutos posteriores del daño con luz UV, sugiere su posible participación en la reparación del ADN por RH.

## PERSPECTIVAS

Este trabajo tiene dos perspectivas principales: la validación de las secuencias identificadas en los promotores de los genes inducidos en respuesta al estímulo con luz UV y el conocimiento del papel que juega la proteína EhRAD54 de *Entamoeba histolytica* en el proceso de RH. En particular, consideramos que es necesario:

1. Verificar si existen proteínas nucleares de trofozoítos capaces de reconocer las secuencias reguladoras conservadas en los promotores.
2. Realizar ensayos de coinmuno-localización de EhRAD54 con la proteína EhRAD51, en los trofozoítos.
3. Realizar ensayos de coinmuno-precipitación para verificar la interacción entre EhRAD54 y EhRAD51.
4. Realizar los ensayos funcionales (ensayo de ATPasa, interacción con el ADN, formación de D-loop, entre otros) que permiten confirmar que la proteína de amiba es una RAD54 que participa en el proceso de RH en este parásito.

## REFERENCIAS

1. Akiyama Koichi, Yusa Kosuke, Hashimoto Hideharu, Poonepalli Anuradha, Prakash Hande Manoor, i KakazuNaok, Takeda Junji, Tachibana Makoto and Shinkai Yoichi. **Rad54 is dispensable for the ALT pathway.** Journal compilation by the Molecular Biology Society of Japan. 2006. pp: 1305–1315.
2. Barrón González MP, Villarreal Treviño L, Reséndez Pérez D, Mata Cárdenas BD, Morales Vallarta MR. **Entamoeba histolytica: cyst-like structures in vitro induction.** Elsevier, 2008. Vol. 31 , I. 2 ,pp. 162 – 168.
3. Catlett Michael G. and Forsburg Susan L. **Schizosaccharomyces pombe Rdh54 (TID1) Acts with Rhp54 (RAD54) to Repair Meiotic Double-Strand Breaks.** Molecular Biology of the Cell. 2003. Vol. 14, pp: 4707–4720.
4. Conway Lcolin. **Two Pathways of Homologous Recombination in Trypanosoma brucei.** Molecular Microbiology. 2002. Vol.45. No.6, 1687 – 1700.
5. Dirksen Eef H. C., W. H. Pinkse Martin, Rijkers Dirk T. S., Cloos Jacqueline, Liskamp Rob M. J., Slijper Monique, and Heck Albert J. R. **Investigating the Dynamic Nature of the Interactions between Nuclear Proteins and Histones upon ADN Damage Using an Immobilized Peptide Chemical Proteomics Approach.** Journal of Proteome Research 2006, No. 5, pp: 2380-2388.
6. Espinosa Castellano y Martínez Palomo. **Pathogenesis of Intestinal Amebiasis: From Molecules to Disease** Clinical Microbiology Reviews. 2000. pp. 318 – 331.
7. Essers Jeroen, Hendriks Rudolf W, Swagemakers Sigrid M. A., Troelstra Christine, Jan de Wit, Bootsma Dirk, Hoeijmakers Jan H. J., and Kanaar Roland. **Disruption of Mouse RAD54 Reduces Ionizing Radiation Resistance and Homologous Recombination.** Cell. 1997. Vol. 89. 195 – 204.
8. Golub Efim I., Kovalenko Oleg V., Gupta Ravindra C, Ward David C. and Radding Charles M. **Interaction of human recombination proteins Rad51 and Rad54.** Nucleic Acids Research, 1997, Vol. 25, No. 20. pp: 4106 – 4110.
9. Gutiérrez G. **Entamoeba histolytica: un desafío vigente.** Salud Pública. México 1992; Vol. 34(3):335-341.
10. Ho Bosco K and Brasseur Robert. **The Ramachandran plots of glycine and pre-proline.** BMC Structural Biology, 2005. 5:14.
11. Jaco Isabel, Muñoz Purificación, Goytisolo Fermín, Wesoly Joanna, Bailey Susan, Taccioli Guillermo, and Blasco María A. **Role of Mammalian Rad54 in Telomere Length Maintenance.** Molecular and Cellular Biology. 2003, Vol. 23, No. 16. p. 5572–5580.
12. Jaco Isabel, Muñoz Purificación, Goytisolo Fermín, Wesoly Joanna, Bailey Susan, Taccioli Guillermo, and Blasco María A. **Role of Mammalian Rad54 in Telomere Length Maintenance.** Molecular and Cellular Biology. 2003. Vol. 23, No. 16. pp: 5572–5580.

13. Jaskelioff Mariela, Van Komen Stephen, Krebs Jocelyn E., Sung Patrick, and Peterson Craig L. **Rad54p Is a Chromatin Remodeling Enzyme Required for Heteroduplex ADN Joint Formation with Chromatin.** The Journal Of Biological Chemistry. 2003. Vol. 278, No. 11, pp. 9212–9218.
14. Jiang Hua, Xie Yueqing, Houston Peter, Stemke-Hale Katherine, Mortensen Uffe H., Rothstein Rodney and Kodadek Thomas. **Direct Association between the Yeast Rad51 and Rad54 Recombination Proteins.** The Journal of Biological Chemistry. 1996. Vol. 271, No. 52, Issue of December 27, pp. 33181–33186.
15. Kanaar Roland, Troelstra Christine, Swagemakers Sigrid M.A., Essers Jeroen, Smit Bep, Franssen Jan-Huib, Pastink Albert, Bezzubova Olga Y., Buerstedde Jean-Marie, Clever Beate, Heyer Wolf-Dietrich and Hoeijmakers Jan H.J. **Human and mouse homologs of the *Saccharomyces cerevisiae* RAD54 DNA repair gene: evidence for functional conservation.** Current Biology 1996, Vol 6. No. 7. pp: 828–838.
16. Kim Perry M., Paffett Kimberly S., Solinger Jachen A, Heyer Wolf-Dietrich and Nickoloff Jac A. **Spontaneous and double-strand break- induced recombination, and gene conversion tract lengths, are differentially affected by overexpression of wild-type or ATPase-defective yeast Rad54.** Nucleic Acid Research. 2002. Vol. 30. No.13. 2727 – 2735.
17. Kohzaki Masaok, Hatanaka Atsushi, Sonoda Eiichiro, Yamazoe Mitsuyoshi, Kikuchi Koji, Vu Trung Nguyen, Szüts Dávid, Sale Julian E., Shinagawa Hideo, Watanabe Masami and Takeda Shunichi. **Cooperative Roles of Vertebrate Fbh1 and Blm ADN Helicases in Avoidance of Crossovers during Recombination Initiated by Replication Fork Collapse.** MCB Accepts. 2007.
18. Lisby Michael and Rothstein Rodney. **Localization of Checkpoint and Repair proteins in Eukaryotes.** Biochimie 87. 2005. 579 – 589.
19. López-Casamichana M., Orozco E., Marchat L.A. and López-Camarillo C., **Transcriptional profile of the homologous recombination machinery and characterization of the EhRAD51 recombinase in response to DNA damage in *Entamoeba histolytica*.** BMC Molecular Biology. 2008, 9, 35.
20. Marchat L.A., Orozco E., Guillen N., Weber C. and López-Camarillo C. **Putative DEAD and DExH box RNA helicases families in the protozoan *Entamoeba histolytica*.** Gene (in press).
21. Mazin Alexander V., Alexeev Andrei A., and Kowalczykowski Stephen C. **A Novel Function of Rad54 Protein Stabilization of the Rad51 Nucleoprotein Filament..** The Journal Of Biological Chemistry 2003. Vol. 278, No. 16. pp. 14029–14036.

22. Mazin Alexander V., Bornarth Carole J., Solinger Jachen A, Heyer Wolf-Dietrich, and. Kowalczykowski Stephen C. **Rad54 Protein Is Targeted to Pairing Loci by the Rad51 Nucleoprotein Filament.** 2000. *Molecular Cell*, Vol. 6, 583–592.
23. Mazina Olga M and. Mazin Alexander V. **Human Rad54 Protein Stimulates ADN Strand Exchange Activity of hRad51 Protein in the Presence of Ca<sup>2+</sup>.** *The Journal Of Biological Chemistry.* 2004. Vol. 279, No. 50, pp. 52042–52051.
24. Miyagawa Kiyoshi, Tsuruga Takanori, Kinomura Aiko, Usui Kiyomi, Katsura Mari., Tashiro Satoshi, Mishima Hiromu and Tanaka Kozo. **A rol for RAD54B in Homologous Recombination in human cells.** *The EMBO Journal.* 2002. Vol. 21 NOS 1 & 2 pp. 175 - 180.
25. Naoyuki Sarai, Kagawa Wataru, KinebuchiTakashi, Kagawa Ako, Tanaka Kozo, Miyagawa Kiyoshi, Ikawa Shukuko, Shibata Takehiko, Kurumizaka Hitoshi and i Yokohama Shigeyuk. **Stimulation of Dmc1-mediated ADN strand exchange by the human Rad54B protein.** *Nucleic Acids Research*, 2006, Vol. 34, No. 16. pp: 4429 – 4437.
26. Osakabe Keishi Abe, Kiyomi, Yoshioka Toji, Osakabe Yuriko, Todoriki Setsuko, Ichikawa Hiroaki, Hohn Barbara and Toki Seiichi. **Isolation and characterization of the RAD54 gene from Arabidopsis thaliana.** *The Plant Journal .* 2006. No. 48. pp: 827–842.
27. Paques Frederic y Haber James E. **Multiple Pathways of Recombination Induced by Double Strand Breaks In Saccharomyces cerevisiae.** *Microbiology and Molecular Biology Reviews.* 1999. Vol. 63. No. 2. 349-404.
28. Petukhova Galina, Stratton Sabrina & Patrick SPNG. **Catalysis of homologous ADN pairing by yeast Rad51 and Rad54 proteins.** *Nature.* 1998. Vol. 393. pp: 91 – 94.
29. Raschle M., Van Komen S., Chi P., Ellenberger T. **Multiple Interactions with the Rad51 Recombinase Govern the Homologous Recombination Function of Rad54.** *The Journal Of Biological Chemistry.* 2004. Vol. 279, No. 50, pp. 51973–51980.
30. Ristic Dejan, Wyman Claire, Paulusma Coen and Kanaar Roland **The architecture of the human Rad54–ADN complex provides evidence for protein translocation along ADN..** *PNAS.* 2001. Vol. 98. No. 15. pp: 8454–8460.
31. Schmuckli-Maurer Jacqueline, Rolfsmeier Michael, Nguyen Ho and Heyer Wolf-Dietrich. **Genome instability in rad54 mutants of Saccharomyces cerevisiae.** *Nucleic Acids Research.* 2003, Vol. 31, No. 3 1013 – 1023.
32. Shaked Hezi, Avivi-Ragolsky Naomi and Levy Avraham A. **Involvement of the Arabidopsis SWI2/SNF2 Chromatin Remodeling Gene Family in ADN Damage Response and Recombination.** *Genetics.* 2006. Vol. 173. pp: 985–994.

33. Shaked Hezi, Melamed-Bessudo Cathy, and Levy Avraham A. **High-frequency gene targeting in Arabidopsis plants expressing the yeast RAD54 gene.** PNAS. 2005. Vol.102. pp: 12265-12269.
34. Smirnova Marina, Van Komen, Sung Patrick, and Klein Hannah L. **Effects of Tumor-associated Mutations on Rad54 Functions.** The Journal Of Biological Chemistry 2004. Vol. 279, No. 23, pp. 24081–24088.
35. Solinger Jachen A., Kiianitsa Konstantin and Heder Wolf-Dietrich. **Rad54, a Swi2/Snf2-like Recombinational Repair Protein, Disassembles Rad51: dsADN Filaments.** Molecular Cell. 2002. Vol. 10, pp: 1175–1188.
36. Sugawara Neal, Wang Xuan, and Haber James E. **In Vivo Roles of Rad52, Rad54, and Rad55 Proteins in Rad51-Mediated Recombination.** Molecular Cell. 2003. Vol. 12, 209–219.
37. Symington Lorraine S. **Epistasis Group genes in Homologous Recombination and Double Strand Breaks Repair.** Microbiology and Molecular Biology Reviews. 2002. pp. 630 – 670.
38. Tan T.L.R., Essers J., Citterio E., Swagemakers S.M.A., Wit J., Benson F.E., Hoeijmakers J.H.J. and Kanaar R. **Mouse Rad54 affects ADN conformation and ADN-damageinduced Rad51 foci formation.** Elsevier Science. 1999. Vol. 9. No. 6. pp: 325 – 328.
39. Tanaka Kozo, Hiramoto Tomoki, Fukuda Toshikatsu, and Miyagawa Kiyoshi. **A Novel Human Rad54 Homologue, Rad54B, Associates with Rad51.** The Journal Of Biological Chemistry. 2000. Vol. 275. No. 34. pp: 26316 – 26321.
40. Thoma Nicolas H., Czyzewski Bryan K., Alexeev Andrei A. **Structure of the SWI2/SNF2 chromatin-remodeling domain of eukaryotic Rad54.** Nature Structural & Molecular Biology. 2005. pp. 350 – 356.
41. Tsubouchi Hideo and Roeder G. Shirleen. **The Importance of Genetic Recombination for Fidelity of Chromosome Pairing in Meiosis.** Developmental Cell. 2003. Vol. 5. pp: 915–925.
42. Tsubouchi T. and Roeder. **The Importance of Genetic Recombination for Fidelity of Chromosome Pairing in Meiosis.** Developmental Cell, 2003. Vol. 5, 915–925.
43. Van Komen Stephen, Petukhova Galina, Sigurdsson Stefan, and Sung Patrick. **Functional Cross-talk among Rad51, Rad54, and Replication Protein A in Heteroduplex ADN Joint Formation.** The Journal Of Biological Chemistry. 2002. Vol. 277, No. 46, pp. 43578–43587.
44. Vasileva Ana, Linden R. Michael and Jessberger Rolf. **Homologous recombination is required for AAV-mediated gene targeting.** Nucleic Acids Research, 2006, Vol. 34, No. 11. pp: 3345–3360.

45. Vassilios Alexiadis, Lusser Alexandra and Kadonaga James T. **A Conserved N-terminal Motif in Rad54 Is Important for Chromatin Remodeling and Homologous Strand Pairing.** The Journal of Biological Chemistry. 2004. Vol. 279, No. 26, pp. 27824–27829.
46. Weber Christian, Marchat Laurence A., Guillen Nancy, López-Camarillo César. **Effects of DNA damage induced by UV irradiation on gene expression in the protozoan parasite *Entamoeba histolytica*.** BMP (enviado).
47. Wesoly Joanna, Agarwal Sheba, Sigurdsson Stefan, Bussen Wendy, Van Komen Stephen, Sung Patrick, and Kanaar Roland. **Differential Contributions of Mammalian Rad54 Paralogs to Recombination, ADN Damage Repair, and Meiosis.** Molecular and Cellular Biology, 2006, Vol. 26, No. 3. p. 976 –989.
48. Yamashita Yukiko M., Okada Takashi, Matsusaka Takahiro, Sonoda Eiichiro, Zhao Guang Yu, i Araki Kasum, Tateishi Satoshi, Yamaizumi Masaru and Takeda Shunichi. **RAD18 and RAD54 cooperatively contribute to maintenance of genomic stability in vertebrate cells..** The EMBO Journal. 2002. Vol. 21. No. 20. pp. 5558 – 5566.
49. Zamorano A., López-Camarillo C., Orozco E., Weber C. Guillen N. and Marchat L. A. **In silico analysis of EST and genomic sequences allowed the prediction of cis-regulatory elements for *Entamoeba histolytica* mRNA polyadenylation.** Computational Biology and Chemistry, 2008. 32 (4), 256-263.