

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

**Caracterización molecular y funcional de la proteína
EhBLM de *Entamoeba histolytica***

TESIS QUE PRESENTA:

Bióloga Ma. DEL SOCORRO CHARCAS LOPEZ

PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRA EN CIENCIAS EN
BIOMEDICINA MOLECULAR

DIRECTORES DE TESIS:

D. en C. LAURENCE A. MARCHAT M.

y

D. en C. ABSALOM ZAMORANO C.



México, D. F.

Junio del 2010.



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

*ACTA DE REGISTRO DE TEMA DE TESIS
Y DESIGNACIÓN DE DIRECTOR DE TESIS*

México, D.F. a 29 de octubre del 2009

El Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de ENMH en su sesión ordinaria No. 4 celebrada el día 28 del mes de octubre conoció la solicitud presentada por el(la) alumno(a):

<u>Charcas</u>	<u>López</u>	<u>Ma. del Socorro</u>							
<small>Apellido paterno</small>	<small>Apellido materno</small>	<small>Nombre (s)</small>							
Con registro: <table border="1" style="display: inline-table;"><tr><td>B</td><td>0</td><td>5</td><td>1</td><td>1</td><td>7</td><td>2</td></tr></table>			B	0	5	1	1	7	2
B	0	5	1	1	7	2			

Aspirante de: Maestría en Biomedicina Molecular

1.- Se designa al aspirante el tema de tesis titulado:
Caracterización molecular y funcional de la proteína EhBLM de Entamoeba histolytica

De manera general el tema abarcará los siguientes aspectos:
Análisis in silico de la secuencia aminoacídica, amplificación del gen EhBLM por PCR y clonación en el vector de expresión pGEX-6P1. Expresión y purificación de la proteína recombinante EhBLM-GST, realización de ensayos funcionales.

2.- Se designa como Director de Tesis al C. Profesor:
Dra. Laurence A. Marchat M y Dr. Absalom Zamorano Carrillo

3.- El trabajo de investigación base para el desarrollo de la tesis será elaborado por el alumno en:
Laboratorio 2 de Biomedicina Molecular de la ENMH.
que cuenta con los recursos e infraestructura necesarios.

4.- El interesado deberá asistir a los seminarios desarrollados en el área de adscripción del trabajo desde la fecha en que se suscribe la presente hasta la aceptación de la tesis por la Comisión Revisora correspondiente:

El Director de Tesis

Dra. Laurence A. Marchat M.

El Director de Tesis

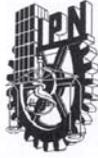
Dr. Absalom Zamorano Carrillo.

El Aspirante

Biol. Ma. del Socorro Charcas López

El Presidente del Colegio

Dr. Cesar Augusto Sandoval Reyes
SECRETARÍA DE EDUCACIÓN PÚBLICA
INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
ESCUELA NACIONAL DE MEDICINA
Y HOMEOPATÍA
SECCIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO
E INVESTIGACIÓN



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la Ciudad de México, D. F. siendo las 12 horas del día 03 del mes de Junio del 2010 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de Tesis, designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de ENMH para examinar la tesis titulada:
Caracterización molecular y funcional de la proteína EhBLM de Entamoeba histolytica.

Presentada por el alumno:

Charcas López Ma. del Socorro
Apellido paterno Apellido materno Nombre(s)

Con registro:

B	0	5	1	1	7	2
---	---	---	---	---	---	---

aspirante de:

Maestría en Ciencias en Biomedicina Molecular

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

LA COMISIÓN REVISORA
Director(a) de tesis

Dra. Laurence Annie Marchat Marchau

Director(a) de tesis

Dr. Absalom Zamorano Carrillo

El asesor de Tesis

Dr. César Augusto Sandino Reyes López

El asesor de Tesis

Dr. Juan Santiago Salas Benito

El asesor de Tesis



Dr. Mario César López Camarillo

PRESIDENTE DEL COLEGIO DE PROFESORES
SECRETARÍA DE EDUCACIÓN PÚBLICA
INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
ESCUELA NACIONAL DE MEDICINA
HOMEOPATIA
SECCIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO
E INVESTIGACIÓN

Dr. César Augusto Sandino Reyes López



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

CARTA CESIÓN DE DERECHOS

En la Ciudad de México el día 30 del mes Enero del año 2009, el (la) que suscribe **Ma. del Socorro Charcas López** alumno (a) del Programa de Maestría en Ciencias en Biomedicina Molecular con número de registro **B051172**, adscrito a la Escuela Nacional de Medicina y Homeopatía, manifiesta que es autor (a) intelectual del presente trabajo de Tesis co-dirigido por los D. en C. Laurence A. Marchat M. y Absalom Zamorano C., cede los derechos del trabajo titulado: "**Caracterización molecular y funcional de la proteína EhBLM de *Entamoeba histolytica***", 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 sococharcas@yahoo.com.mx si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

Ma. del Socorro Charcas López
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 del Instituto Politécnico Nacional (ENMyH-IPN), en el Departamento de Infectómica y Patogénesis Molecular del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados (CINVESTAV) y en el laboratorio 2 del Posgrado en Ciencias Genómicas de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México (UACM), bajo la dirección de la Dra. Laurence A. Marchat Marchau y el Dr. Absalom Zamorano Carrillo, Investigadores titulares del Programa de Biomedicina Molecular de la Sección de Estudios de Posgrado e Investigación de la ENMyH-IPN.

Este trabajo de tesis fue apoyado por la Secretaría de Investigación y Posgrado del Instituto Politécnico Nacional (Proyecto SIP 20020769).

COMITÉ TUTORIAL

DIRECTORES

Dra. Laurence Annie Marchat Marchau
Profesora titular Posgrado en Biomedicina Molecular
de la ENMyH-IPN

Dr. Absalom Zamorano C.
Profesor titular Posgrado en Biomedicina Molecular
de la ENMyH-IPN

ASESORES

Dr. César Augusto Sandino Reyes López
Profesor titular Posgrado en Biomedicina Molecular
de la ENMyH-IPN

Dr. Juan Santiago Salas Benito
Profesor titular Posgrado en Biomedicina Molecular
de la ENMyH-IPN

Dr. Mario César López Camarillo
Profesor titular Posgrado en Ciencias Genómicas UACM

AGRADECIMIENTOS

A la Doctora Laurence por brindarme su apoyo, por su enorme paciencia, por su excelente perfección en el escrito y por ilustrarme en las cuestiones científicas, mostrándome el camino correcto para concretar un proyecto, además de impulsarme a continuar en este gran viaje, no existen palabras para mostrar mi agradecimiento.

Al Doctor Absalom Zamorano por la manera tan especial de ilustrar y ejemplificar su percepción de la ciencia.

Al Doctor Cesar Sandino Reyes López por las observaciones tan certeras realizadas a este trabajo

Al Doctor Juan Salas Benito por compartir su experiencia y por ser tan amable.

Al Doctor César López Camarillo por concebir este proyecto.

A todos los profesores del posgrado en Biomedicina Molecular gracias por compartir su conocimiento y consejos durante los cursos, además de mostrar su desmedido interés por la investigación.

A mis compañeras de generación: María, Pati, Maritere, Tania y Elizabeth por compartir el día a día, por su apoyo y compañerismo

A todos mis compañeros del laboratorio de Biomedicina Molecular II con quienes viví y he vivido múltiples aventuras, compañeros de la misma ansiedad y estrés, sin ustedes mi estancia en este lugar hubiera sido aburrida: Dra. Esther Ramírez, George, Jessica María, Marisol, Sandra Leticia, Bartolo, Carmen García, Bárbara, Mati, Lilian, Lorena, Bety, Héctor, Denison, Fabiola, Pati, Nelly, Edgar, Fernando, Alma, Elvira, Jerónimo, Ana Lilia, Antonio.

A aquellos compañeros de la UACM:

A Nohemí Hernández por su enorme contribución desinteresada y por su enorme valor humano, no existen palabras para demostrar mi agradecimiento. Helios Cárdenas, Lalo Carrillo, Dra. Mavil López, Erick, Itzel López, Ángel, Azucena.

A aquellos compañeros del CINVESTAV:

Mil gracias Lalo Flores por compartir tus conocimientos y reactivos, Jonathan País, Jacobo, Dra. Guillermina García, Mercedes, Dra. Cecilia Bañuelos, Wendy, Alejandro, Tomás, Sra. Ale, Rocío, Cecilia Santana.,

Y a aquellos tantos que estuvieron y a otros más que no están aquí:

Israel gracias por tu amor y por tu apoyo incondicional, Francisco, Saúl, Héctor, Gerardo, Saúl Alejandro gracias por estar en Iztacala, Dr. Diodoro Granados mi modelo a seguir, María Sanchez, Dra. Abigail Betanzos, Ricardo Orozco, George Fernández, Jessica Maria García, Esther Ramírez, Lalo Carrillo, Lalo Flores, Fátima Catalina, Judith, María, Raúl y José Luis López, Amalia, M. en C. Marisol, Sandy.

Este trabajo también es el apoyo incondicional que tengo de mi nueva familia:

Tami y Fer gracias por haber llegado, por ser mi aliciente día a día y por dejarme hacer lo que más me gusta.

Lista de abreviaturas	xiii
Lista de figuras	xiv
Lista de tablas	xv
Resumen	xvi
Abstract	xviii

I. INTRODUCCIÓN

1.1. Recombinación homóloga	1
1.2. Mecanismo molecular de recombinación homóloga	2
1.3. Participación de la DNA helicasa BLM en la HR	5
1.4. Características moleculares de las DNA helicasas RecQ	
1.4.1. Clasificación de las helicasas	6
1.4.2. Características moleculares de las DNA helicasas RecQ	8
1.4.3. Propiedades bioquímicas de las DNA helicasas de la familia RecQ	12
1.5. Recombinación homologa en parásitos protozoarios	12
1.6. Generalidades de la amibiasis humana	14
1.7. Epidemiología de la amibiasis	15
1.8. Clasificación taxonómica de <i>E. histolytica</i>	16
1.9. Morfología de <i>E. histolytica</i>	16
1.10. Ciclo de vida de <i>E. histolytica</i>	17
1.11. Virulencia y patogenicidad de <i>E. histolytica</i>	18

II. ANTECEDENTES	
2.1. Recombinación homóloga en <i>E. histolytica</i>	21
III. JUSTIFICACION	23
IV. OBJETIVOS	
1. Objetivo general	24
2. Objetivos particulares	24
V. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	25
VI. METODOLOGIA	
1. Análisis <i>in silico</i> de la secuencia de aminoácidos de la proteína EhBLM	26
2. Subclonación del gen <i>Ehblm</i> en el vector pGEX-6P1	
2.1. Diseño de los oligonucleótidos iniciadores (primers)	27
2.2. Amplificación por PCR del dominio de helicasa	27
2.3. Purificación del DNA	28
2.4. Subclonación en el vector de expresión pGEX-6P1	29
2.5. Preparación de células competentes	
2.5a. Células competentes frescas	32
2.5b. Células competentes congeladas	32
2.6. Transformación	
2.6a. Transformación del producto de ligación	33
2.6b. Transformación para inducir la expresión de la proteína recombinante	33
2.7. Obtención de DNA plasmidico (minipreps)	34

2.8. Secuenciación automática del gen <i>Ehblm</i>	34
3. Expresión de la proteína recombinante EhBLM-GST	
3.1. Inducción de la expresión	35
3.2. Cuantificación de proteínas por el método de Bradford	36
3.3. Análisis de la solubilidad de la proteína recombinante EhBLM-GST	37
3.4. Análisis de la solubilización de la proteína recombinante EhBLM-GST en presencia de N-lauryl sarcosil	37
3.5. Purificación de la proteína rEhBLM-GST	38
3.6. Electroforesis de proteínas por SDS-PAGE	39
3.7. Tinción de los geles de poliacrilamida con azul de Coomassie	40
3.8. Ensayos de Western Blot	40
4. Preparación de las sondas de DNA	
4.1. Marcaje de los oligonucleótidos	41
4.2. Hibridación de los oligonucleótidos	43
4.3. Revelado del marcaje con biotina	43
4.4. Ensayo de retardamiento de la movilidad electroforética	44

VII. RESULTADOS

1. Análisis <i>in silico</i> de la secuencia aminoacídica de la proteína EhBLM	46
2. Subclonación de la secuencia genómica correspondiente al dominio de helicasa de EhBLM	61
3. Expresión del dominio de helicasa de la proteína rEhBLM-GST	65
4. Análisis de la solubilidad de la proteína rEhBLM-GST	68
5. Análisis de la solubilización de la proteína rEhBLM en presencia de	

N-lauryl sarcosyl	69
6. Purificación de la proteína recombinante rEhBLM-GST	70
7. Preparación de las sondas de DNA	72
8. Interacción de la proteína rEhBLM-GST con la estructura "Y"	73
9. Interacción de la proteína rEhBLM-GST con la estructura "X"	75
VIII. DISCUSIÓN	77
IX. CONCLUSIONES	83
X. PERSPECTIVAS	84
XI. APÉNDICE	85
XII. BIBLIOGRAFÍA	87

LISTA DE ABREVIATURAS

aa's	Aminoácidos
A ₂₆₀	Absorbancia a 260 nm
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
Nm	Nanómetros
C-terminal	Extremo Carboxilo terminal
DSB	Ruptura de la doble cadena de DNA
HR	Recombinación homóloga
dsDNA	DNA de cadena doble
ssDNA	DNA de cadena sencilla
DTT	Ditrioetil
EDTA	Acido etilen diamino tetraacético
EMSA	Ensayo de retardamiento de la movilidad electroforetica
GST	Glutation S Transferasa
Rpm	Revoluciones por minuto
H	Homología
HEPES	Acido 4-(2-hidroxietyl)-1-piperazina etano sulfónico
I	Identidad
IPTG	Isopropil- β -D-tiogalactopiranósido
LB	Medio de cultivo Luria Bertani
mA	Miliamperes
MDR	Multiresistencia a drogas
MEGA	Molecular Evolutionary Genetics Analysis
mM	Milimolar
MMS	Metil metano sulfonato
3D	Estructura en tercera dimensión
Ng	Nanogramo
μ g	Microgramo
μ L	Microlitro
μ M	Micromolar
nM	Nanomolar
N-terminal	Extremo amino terminal
ORF	Marco de lectura abierto
OMS	Organización Mundial de la Salud
PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida
PDB	Protein Data Bank
SINAVE	Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica
TAE	Tris-Acetato-EDTA
TBE	Tris-Borato-EDTA
TIGR	The Institute for Genomic Research
WHO	World Health Organization

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Mecanismo molecular de recombinación homóloga	4
Figura 2. Clasificación de las superfamilias (SF1, SF2, SF3) y familia 4	7
Figura 3. Representación esquemática de los miembros de la familia RecQ	11
Figura 4. Ciclo de vida de <i>E. histolytica</i>	20
Figura 5. Estrategia experimental general	25
Figura 6. Mapa del vector pGEX-6P1	31
Figura 7. Comparación de las tres DNA helicasas	50
Figura 8. Alineamiento múltiple con el programa ClustalW	52
Figura 9. Representación esquemática de las DNA helicasas RecQ	53
Figura 10. Árbol filogenético del dominio de DNA helicasa	55
Estructura secundaria de la proteína EhBLM	56
Figura 11. Estructura secundaria de la proteína EhBLM de <i>E. histolytica</i>	58
Figura 12. Predicción de la estructura tridimensional de la proteína EhBLM	60
Figura 13. Amplificación por PCR del dominio de helicasa	60
Figura 14. Análisis de las clonas positivas	64
Figura 15. Electroferograma de la secuencia del vector pGEX-6P1-Ehblm	65
Figura 16. SDS-PAGE de la expresión de rEhBLM-GST	67
Figura 17. Inmunodetección de la proteína rEhBLM-GST	69
Figura 18. Análisis de la solubilidad de la proteína rEhBLM-GST	71
Figura 19. Análisis de solubilización en presencia de N-lauryl-sarcosyl	73
Figura 20. Análisis de la purificación de la proteína rEhBLM-GST	75
Figura 21. Análisis de los oligonucleótidos e hibridación de las sondas	77
Figura 22. Ensayo de interacción entre la sonda "Y" y la proteína rEhBLM	79
Figura 23. Ensayo de interacción entre la sonda "X" y la proteína rEhBLM	81

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Secuencias de los oligonucleótidos de cadena sencilla	42
Tabla 2. Identificación de proteínas homólogas a la proteína EhBLM	47

La recombinación homóloga (HR) es uno de los principales mecanismos involucrados en la reparación de la ruptura de la doble cadena de DNA (DSB, por sus siglas en inglés), un evento molecular que puede afectar gravemente las funciones y la supervivencia de la célula. La HR también permite la diversidad genética. La HR involucra a más de 11 proteínas incluyendo la DNA helicasa de Bloom (BLM), la cual pertenece a la familia de proteínas RecQ que catalizan el desenrollamiento del DNA asociado a la hidrólisis de ATP-dependiente de DNA. Cinco proteínas RecQ han sido descritas en humano y mutaciones en tres de ellas se han asociado con cáncer y muerte prematura, indicando su relevancia para la integridad genómica y el mantenimiento de la viabilidad celular.

Entamoeba histolytica, el parásito protozoario responsable de la amibiasis humana, presenta diferentes grados de virulencia que se han relacionado con una gran variabilidad genética probablemente debida a eventos de recombinación. Por análisis *in silico* del genoma de *E. histolytica*, se identificó la posible maquinaria involucrada en la HR en este parásito. Particularmente, se detectó un gen (3548 nucleótidos) que codifica para una posible DNA helicasa de la familia RecQ (EhBLM) así como otros dos genes *EhRecQ*. En particular, EhBLM posee el dominio de helicasa con los ocho motivos conservados en la familia RecQ involucrados en el desenrollamiento del DNA en proteínas homólogas. También presenta los dominios RecQ-CT y HRDC que participan en la unión al DNA y en la interacción con proteínas. El dominio de helicasa de EhBLM amplificado por PCR fue clonado en el vector de expresión pGEX-6P1 para expresar en bacterias a la proteína recombinante EhBLM-GST, la cual fue purificada por cromatografía de afinidad usando columnas de sefarosa acoplada a glutatión. Los resultados de los ensayos de retardamiento de la movilidad electroforética, sugieren que la proteína rEhBLM-GST es capaz de unirse a las estructuras de DNA en forma de "X" e "Y",

lo que indica que la proteína EhBLM podría participar en eventos relacionados con la replicación del DNA y la recombinación homóloga en *E. histolytica*.

ABSTRACT

Homologous recombination (HR) is one of the mechanisms involved in double strand DNA break (DSB) repair, a molecular event that can strongly affect cell functions and survival. Moreover, HR allows genetic diversity. HR process involves 11 proteins including the Bloom DNA helicase (BLM), which belongs to the RecQ family proteins that catalyze DNA unwinding through DNA dependent hydrolysis of ATP. Five RecQ proteins homologues have been described in human and mutations in three of them have been associated with cancer and premature death, indicating their relevance for genomic integrity and cellular viability maintenance.

Entamoeba histolytica, the protozoan parasite responsible for human amoebiasis, presents different virulence grades that have been related with genetic variability, probably due to recombination events. By computational screening of *E. histolytica* genome, we identified the possible machinery for HR in this parasite. Particularly, we detected a gene (3548 nt) that codes for a possible DNA helicase of the RecQ family (EhBLM) and two additional *RecQ* genes. Notably, EhBLM has the helicase domain with the seven conserved motifs of the RecQ family that have been involved in DNA unwinding in homologous proteins. EhBLM also presents the RecQ-CT and HRDC domains that participate in DNA binding and protein interaction. The PCR-amplified EhBLM helicase domain was cloned into the pGEX-6P1 vector to express the rEhBLM-GST protein in bacteria, which was purified by affinity chromatography using glutathion-sepharose columns. Electrophoretic mobility shift assays suggested that the rEhBLM protein was able to bind DNA structure "X" and "Y" which indicates that EhBLM could act in replication and homologous recombination in *E. histolytica*.

1.1. Recombinación homóloga

La ruptura de la doble cadena del DNA (DSB del inglés Double Strand Break) es considerada como la forma más letal de daño al DNA. Puede ser causada por factores exógenos, tales como los rayos UV, las radiaciones ionizantes (rayos X y partículas ionizantes) o agentes químicos (bleomicina por ejemplo), pero también ocurre en eventos celulares naturales, como son la restauración de las horquillas colapsadas durante la replicación del DNA (Lisby y Rothstein, 2004), el mantenimiento de los telomeros (Wei *et al.*, 2002), la mitosis y la meiosis (Masson *et al.*, 2001). Por lo que, paradójicamente, las rupturas bicatenarias del DNA son inevitables. Si la ruptura en el DNA, cualquiera que sea la causa, se deja sin corregir, se generaran mutaciones que alterarán el funcionamiento y la supervivencia de las células. Por lo tanto, cada organismo posee una maquinaria para mantener su estabilidad genómica y viabilidad celular, mediante un mecanismo de reparación eficiente de las rupturas de la doble cadena del DNA. Se ha elucidado que la respuesta al daño del DNA consiste de sensores, transductores, efectores, así como de diversas rutas moleculares con puntos de control que regulan inicialmente el ciclo de división celular (Zhou y Ellege, 2000). Cuando el sistema de reparación falla o se carece de él, la célula puede sufrir mutagénesis, tumorogénesis y muerte celular.

Existen dos principales mecanismos para la reparación de DSB: la recombinación homóloga (“HR” del inglés Homologous Recombination) y la unión de extremos no homólogos (“NHEJ” del inglés Non Homologous End Joigning) (Pastink, 1999; Dudas, 2004). Además de que permite reparar el material genético, la HR es un importante proceso ubicuo que permite también, generar diversidad genética y segregar de manera apropiada a los cromosomas durante la meiosis. Consiste en la búsqueda y apareamiento de una molécula homóloga de DNA de doble cadena y su utilización como templado para regenerar la molécula de DNA dañada sin que haya

pérdida de material genético (Kowalczykowski *et al.*, 1994). En contraste, la NHEJ permite la unión de los extremos rotos sin la ayuda de un templado, por lo que esta frecuentemente asociada a pérdida o ganancia de nucleótidos (Pastink *et al.*, 2001). En eucariontes superiores, la DSB se repara principalmente por NHEJ, probablemente en la vía de activación del ciclo celular (Lieber *et al.*, 2004; Critchlow y Jackson, 1998). En eucariontes inferiores, tales como la levadura *Saccharomyces cerevisiae* y algunos parásitos protozoarios como *Trypanosoma cruzi* y *Plasmodium falciparum*, la HR es la principal vía de reparación de la DSB en las fases S y G2 del ciclo celular (Dudasova *et al.*, 2004).

1.2. Mecanismo molecular de la recombinación homóloga

La relevancia de la HR en la reparación de la DSB fue inicialmente descrita en la bacteria *Escherichia coli*, y posteriormente se demostró que es un mecanismo molecular conservado en la escala evolutiva que puede dividirse en tres etapas: i) En la pre-sinapsis, se generan extremos de cadena sencilla (gap) por acción enzimática específica alrededor de la ruptura ; ii) En la sinapsis, se realiza la búsqueda de la secuencia homóloga y se forma una conexión física entre la cadena sencilla y el templado de DNA homólogo intacto, permitiendo la formación de un heterodúplex de DNA llamado D-loop; iii) Finalmente, en la post-sinapsis, la cadena de DNA contigua al DSB es restaurada mediante la síntesis de la cadena complementaria al templado de DNA homólogo y la resolución del intermediario de la unión (Fig. 1). El modelo original de reparación de DSB por HR involucra en la sinapsis la formación de un doble intermediario tetradial conocido como *Holliday Junction* (HJ por sus siglas en inglés) (Schwacha, 1995; Sharples *et al.*, 1999).

Su resolución puede involucrar intercambio de cadenas de DNA, permitiendo o no la generación de productos recombinados o no, respectivamente (Szostak *et al.*, 1983).

Como se mencionó anteriormente, la HR es un proceso molecular muy conservado y las diferentes etapas están catalizadas por proteínas homólogas en procariontes y

eucariontes (Fig. 1). En eucariontes existe una batería de genes entre los que destacan los genes del grupo de epistasis *rad52* de levadura y humano, estos genes codifican para proteínas clave de este proceso MRE11, RAD50, NBS1, RAD51, y sus parálogos (RAD51B, RAD51C, RAD51D, XRCC2 y XRCC3) RAD52, RAD54, y RAD54B (Symington, 2002) conforman el núcleo de la maquinaria de la HR (Sung *et al.*, 2000; Krough, 2004). El complejo MRN (Mre11-Rad50-Xrs2/Nbs1), Exo1 y algunas nucleasas están involucrados en el procesamiento de la DSB para generar extremos de cadena sencilla, a los cuales se une la proteína de unión al DNA, RPA, para evitar la formación de estructuras secundarias. Posteriormente se reclutan otras proteínas de unión al DNA de cadena sencilla, entre las cuales destaca la recombinasa Rad51 considerada como una proteína central en el proceso de HR, apoyada por proteínas mediadoras, Rad52 y los parálogos de Rad51 (Rad55, Rad57 en levaduras y Rad51B, Rad51C, Rad51D, Xrcc2 y Xrcc3 en humanos), que organizan la formación del filamento pre-sináptico. Durante la sinapsis, Rad51 unida a la cadena sencilla de DNA realiza la búsqueda de homologías en la molécula de DNA de doble cadena y el apareamiento con la secuencia correspondiente para formar el D-loop. Finalmente, diferentes topoisomerasas y DNA helicasas contribuyen a resolver las estructuras HJ, con o sin intercambio de material genético, para que la DNA polimerasa pueda catalizar la síntesis del DNA y regenerar así la DSB.

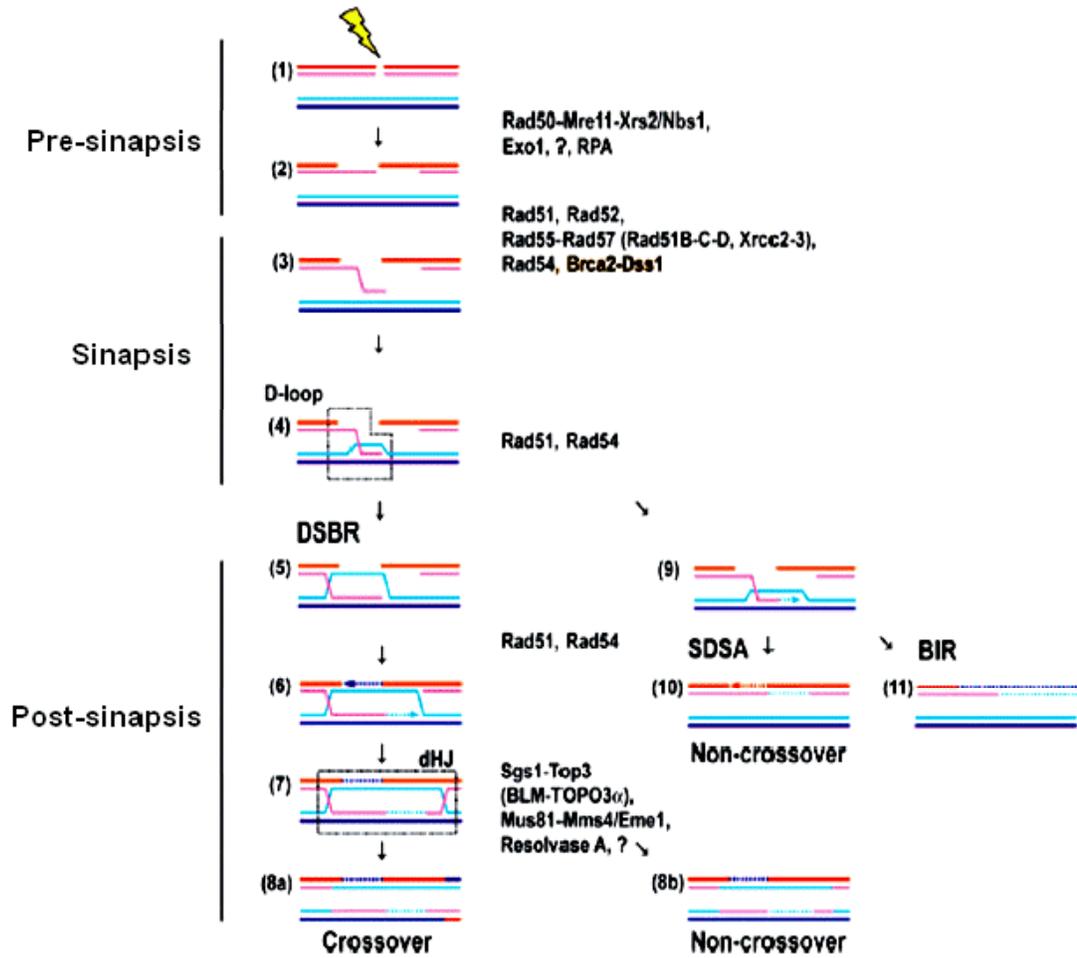


Figura 1. Mecanismo molecular de recombinación homóloga mediante la reparación de la doble cadena de DNA (DSB) DSBR: double-strand break repair; BR: Break Rupture; BIR: break-induced replication; dHJ: double Holliday junction; SDSA: Single and Double Strand Annealing. Tomado de Wolf Dietrich Heyer, 2003

1.3. Participación de las DNA helicasas en la recombinación homóloga en eucariontes

En los últimos años, se ha demostrado el papel esencial que juegan las DNA helicasas en el mecanismo molecular de HR (Van Brabant, *et al.*, 2000; D'Amours, 2002).

En *E. coli*, la eliminación del gen *RecQ* produce una reducción significativa de la frecuencia de recombinación (~100 veces) y un aumento en la sensibilidad a la irradiación por luz UV (~20 veces) (Nakayama *et al.*, 1984 y 1985). Además, las bacterias presentan una mayor sensibilidad a los agentes que dañan el DNA como es el metil-metano sulfonato (Mendonca *et al.*, 1995). Además de iniciar el proceso de recombinación homóloga, *RecQ* también es capaz de desenrollar moléculas de DNA que resultan de eventos de recombinación aberrantes (Harmon *et al.*, 1998).

En humano, se ha demostrado que mutaciones en *BLM*, *WRN* y *RTS* todos homólogos de la familia *RecQ*, están relacionados con desordenes autosómicos recesivos y desordenes clínicos asociados con la predisposición a cáncer y envejecimiento prematuro conocidos como Síndrome de Bloom (BS), síndrome de Werner (WS), y síndrome de Rhotmund-Thompson (RTS), respectivamente (Ellis *et al.*, 1995; Kitao *et al.*, 1999; Yu *et al.*, 1996). Si bien estos tres síndromes presentan síntomas distintos, las mutaciones en los genes *blm*, *wrn* y *rts* provocan inestabilidad genómica caracterizada por la ruptura de cromosomas, el incremento de aberraciones cromosómicas, hiper recombinación y susceptibilidad a agentes que dañan el DNA, entre otras (Bachrati, 2003). Estas características son similares a las observadas cuando se eliminó el gen *RecQ* en *E. coli*, lo que demuestra la relevancia de las DNA helicasas de la familia *RecQ* en el proceso de HR.

En particular, mediante ensayos de inmunofluorescencia, se ha demostrado la presencia de la DNA helicasa *BLM* interactuando con la proteína central del proceso de HR, la recombinasa *RAD51*, en estructuras sub-nucleares llamadas foci (Haaf *et al.*, 1995; Tan *et al.*, 1999; Bischof *et al.*, 2001). Los tratamientos que causan aberración al DNA incrementan drásticamente el número de foci de *RAD51* en el núcleo, lo que

sugiere que estos foci se forman como consecuencia de daño al DNA, como complejos de proteínas que participan en la reparación del DNA por HR (Tashiro *et al.*, 2000). Además, se ha reportado que la DNA helicasa de Bloom (BLM) promueve la migración de HJ eliminando a los intermediarios en la recombinación de DNA, reduciendo así la recombinación *in vivo* (Karow *et al.*, 2000) y la reparación de la horquilla colapsada durante la replicación (Henning, 2003).

1.4. Características moleculares y funcionales de las DNA helicasas RecQ

1.4.1. Clasificación de las helicasas

Las helicasas constituyen una enorme familia de enzimas con diversas funciones biológicas. Sin embargo, el análisis de secuencia de aminoácidos asistido por computadora de helicasas de diferentes organismos reveló la presencia de un dominio conservado llamado dominio de helicasa caracterizado por motivos específicos. El elevado grado de homología del dominio de helicasa de este grupo de proteínas, sugiere que los genes se desarrollaron a partir de un ancestro común. Basándose en el grado de similitud y en la organización de los motivos del dominio helicasa, las helicasas pueden clasificarse dentro de superfamilias y familias, llamadas SF1, SF2, SF3, y F4 (Tuteja, 2003).

Las superfamilias 1 (SF1) y 2 (SF2) son las más grandes y contienen más de 50 y 100 miembros, respectivamente, que provienen de organismos virales, procariontes y eucariontes (Gorbalenya y Koonin, 1993). La SF2 contiene algunas proteínas remodeladoras de cromatina e incluye a Snf2, ISWI y otras. Este grupo de proteínas presentan un dominio de helicasa con siete motivos conservados (I, Ia, II, III, IV, V, VI), cuyas secuencias y estructuras secundarias son, en general, muy similares (Gorbalenya *et al.*, 1989). La superfamilia 3 (SF3) corresponde a las proteínas más pequeñas debido a que el dominio de helicasa sólo contiene tres motivos conservados (A, B y C) (Hall, 1999). Generalmente estas proteínas provienen de virus de DNA y RNA. La Familia 4 (F4) es un pequeño grupo de proteínas cuyo dominio

de helicasa contiene cinco motivos conservados (1, 1a, 2, 3 y 4). Estas helicetas se establecen en sistemas bacterianos, físicamente se han asociado con primasas de DNA (Ilyina *et al.*, 1992), y desempeñan su función en la replicación del DNA (Fig. 2).

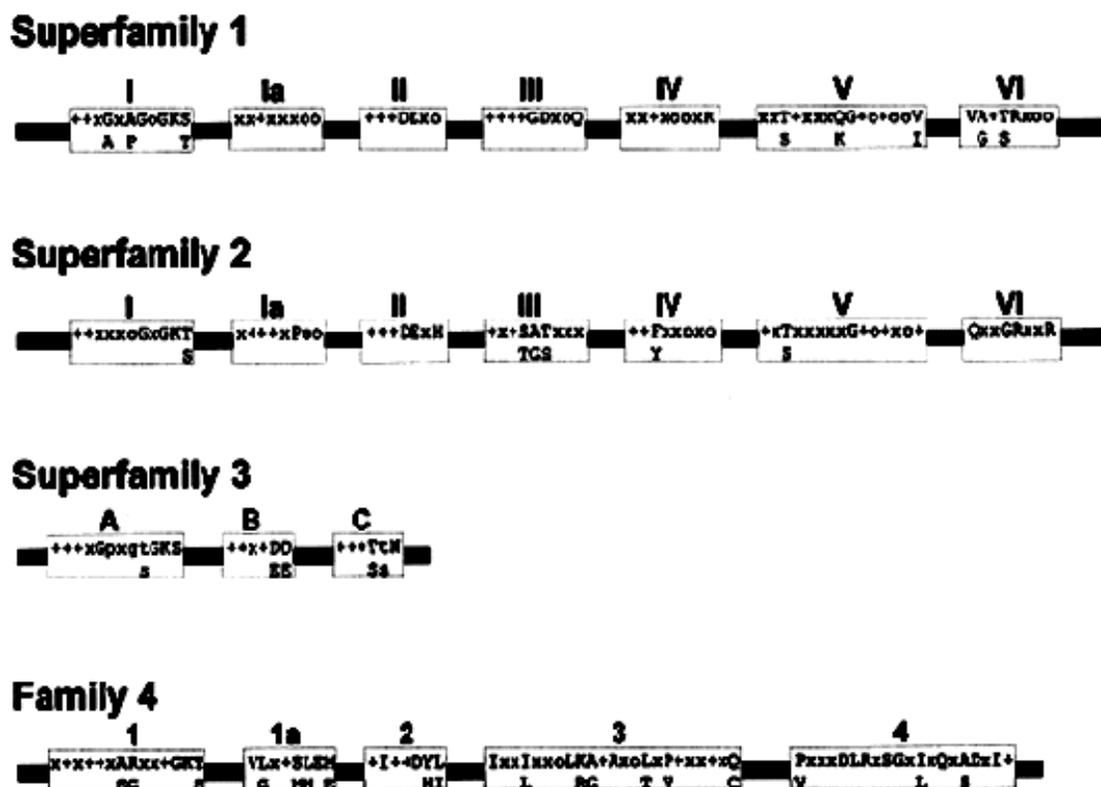


Figura 2. Clasificación de las superfamilias (SF1, SF2, SF3) y de la familia (F4) de helicetas basada en la estructura del dominio de helicasa. Se indican los motivos helicasa conservados, y las secuencias consenso de los aminoácidos de cada motivo (Tomado de Hall, 1999).

1.4.2. Características moleculares de las DNA helicasas RecQ

La SF2 es la más grande de las tres superfamilias de helicasas e incluye una variedad de proteínas entre las cuales se encuentran a las helicasas de la familia RecQ, UvrB, RecG, UI9 y varias subfamilias de RNA helicasas y de ATPasas estimuladas por DNA (Gorbalenya *et al.*, 1989; Gorbalenya y Koonin, 1993). Además son translocasas de DNA de doble cadena (Hall, 1999; Tuteja, 2004). Las DNA helicasas de la familia RecQ han sido identificadas en bacterias como *E. coli* y *Bacillus subtilis* (Subramanya *et al.*, 1996), en protozoarios como *Plasmodium cynomolgi* y *P. falciparum* (Tuteja *et al.*, 2002; Pradhan *et al.*, 2005), levaduras, insectos y anfibios (Lohman, 1992), plantas como leguminosas y tabaco (Sanan-Mishra, 2005; Tuteja *et al.*, 1996) y en mamíferos como humano y rata (Tuteja *et al.*, 1996).

La proteína RecQ de *E. coli* es el miembro arquetipo de la familia RecQ de DNA helicasas que se ha conservado a través de la evolución (Umezu *et al.*, 1990; Chakraverty, 1999). Los eucariontes inferiores poseen generalmente un sólo miembro de la familia RecQ, por ejemplo en las levaduras *Saccharomyces cerevisiae* y *Schizosaccharomyces pombe* se encuentran Sgs1 y Rqh1, respectivamente (Gangloff *et al.*, 1994; Stewart *et al.*, 1997). Mientras que en organismos superiores existen múltiples miembros, con cinco proteínas presentes en humano: RECQ1, RECQ2 (BLM), RECQ3 (WRN), RECQL4 (RTS o RecQ4) y RECQ5.

En las proteínas RecQ, el dominio de helicasa corresponde a una región de aproximadamente 450 aminoácidos con ocho dominios altamente conservados (0, I, Ia, II, III, IV, V, VI) (Karow *et al.*, 2000):

- **Dominio 0** (LxxxFGxxxFRxxQ): presenta similitud con el motivo Q de las RNA helicasas DEAD-box (Tanner *et al.*, 2003). Este motivo esta involucrado en la reacción de ATPasa de la proteína RecQ, cuyo mecanismo es independiente al de unión a ATP, o desempeña un importante papel estabilizando el dominio de ATPasa.

- **Dominio I** (MPTGGGKSL): se encuentra presente en muchas proteínas de unión a nucleótidos y forma un asa que se une a un grupo fosfato (“P-loop”) (Tanner, 2001). También conocido como dominio Walker A o motivo “A” de ATPasa. Además sirve como sitio de interacción con ATP y magnesio.
- **Dominio Ia** (VVSPLVSLI): la predicción de la estructura secundaria indica que esta constituido por hojas alfa y beta en las helicasas de la familia “DEAD box” (Gorbalenya *et al.*, 1988). Este motivo esta involucrado en la unión a DNA de cadena sencilla ya que facilita esta unión (Velankar *et al.*, 1999).
- **Dominio II**: conocido como motivo “B” de ATPasa o “motivo Walker B” (Venkatesan, 1982), su secuencia consenso es DEADHC, por lo tanto las proteínas que contienen este dominio son conocidas como helicasas de caja DEADHC, (Linder *et al.*, 1989). La secuencia DEADHC se encuentra altamente conservada y esta presente en muchas proteínas que participan en la replicación de DNA y RNA (Gorbalenya *et al.*, 1989). Se ha mostrado que los residuos DE interactúan con magnesio, el cual es requerido para unir ATP. La mutación en DE puede afectar las actividades de ATPasa y helicasa. Las proteínas del subgrupo DEADHC muestran variaciones en las regiones conservadas y se han caracterizado como poseedoras de actividad de DNA helicasa.
- **Dominio III** (TATA): se encuentra involucrado en el acoplamiento de la reacción de ATPasa para desenrollar el dúplex de DNA. Algunos datos sugieren la importancia de la interacción entre los residuos de aminoácidos de varios dominios, los cuales son responsables de los mecanismos de acoplamiento de la actividad de NTPasa al desenrollamiento del RNA.
- **Dominio IV** (GIYCLS): este motivo esta involucrado en interacciones con RNA (Gorbalenya *et al.*, 1989).
- **Dominio V** (VICATIAFGMGIDKP): este motivo esta involucrado en mediar cambios conformacionales asociados con la unión a nucleótidos en virtud de su proximidad para unirse al DNA y al sitio NTP el cual es requerido por la helicasa.

- **Dominio VI (GRAGRIDGE):** media los cambios que inducen al ligando, los cuales requiere la helicasa para desplazarse a lo largo de la doble cadena de DNA.

Las DNA helicasas de la familia RecQ poseen también un dominio conservado RecQ (RecQ-Ct) el cual es único en la familia de helicasas RecQ y está involucrado en mediar interacciones con otras proteínas (Bachrati, 2003). El dominio de helicasa y el dominio RecQ-Ct se combinan para formar el dominio estructural o “núcleo catalítico”, el cual contiene la secuencia necesaria para realizar las actividades de ATPasa y catalizar el desenrollamiento del dúplex de DNA (Bernstein, 2005). Además, las DNA helicasas de la familia RecQ poseen un dominio de helicasa-RNasa-D-C-terminal (HRDC) en el extremo carboxilo. El dominio HRDC se ha encontrado también en nucleasas que hidrolizan RNA, debido a su presencia en helicasas y nucleasas, se ha propuesto que este dominio está implicado en la unión a ácidos nucleicos en las proteínas RecQ (Morozov *et al.*, 1997).

En la figura 3 se compara la organización molecular de las DNA helicasas de diferentes organismos, como *E. coli*, *S. cerevisiae*, *S. pombe*, *Drosophila melanogaster* y *Homo sapiens*, entre otros. Se puede apreciar que todas las proteínas comparten el dominio de helicasa con los siete motivos conservados, mientras que los dominios RecQ-C y HRDC sólo están presentes en las proteínas RecQ, RecQ2 (BLM), RecQ3 (WRN) y RecQ4 (RTS). La proteína WRN posee una región con actividad enzimática de exonucleasa en el extremo amino, funcionando como sitio de unión a proteínas heterológicas y a algunos dominios que facilitan la localización subcelular además se ha mostrado que facilita interacciones con otras proteínas (Bachrati, 2003). Una diferencia significativa de tamaño es notable entre las proteínas RecQ de *E. coli* y muchos miembros de la familia RecQ de eucariontes. La proteína RecQ de *E. coli* posee 609 aminoácidos de longitud, mientras que las proteínas de eucariontes tienen frecuentemente más del doble de residuos.

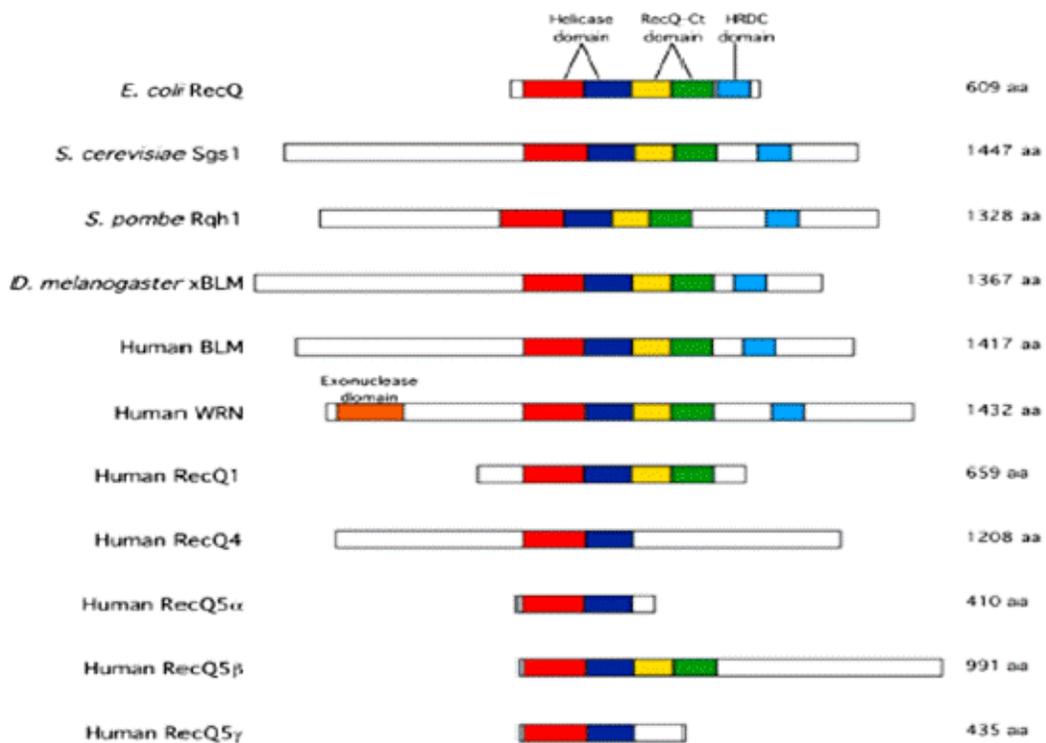


Figura 3. Representación esquemática de los miembros de la familia RecQ de DNA helicasas de diversos organismos. Los dominios están marcados con diferentes colores: rojo y azul, dominios de helicasa; amarillo y verde; dominios RecQ-Ct; azul, dominio HRDC; naranja, dominio de exonucleasa (Tomado de Bennet, 2004).

1.4.3. Propiedades bioquímicas de las DNA helicasas de la familia RecQ

Las DNA helicasas son enzimas que usan la energía liberada de la hidrólisis de ATP para separar las cadenas complementarias de moléculas de ácidos nucleicos y son esenciales para todos los aspectos metabólicos, incluyendo la replicación, reparación, recombinación y transcripción (Tuteja, 2004; Lohman, 1992). En general las helicasas requieren un mecanismo molecular para convertir la energía química generada por la hidrólisis de ATP dentro de energía mecánica requerida para la separación de las cadenas (Lohman, 1992; Caruthers, 2002).

Las DNA helicasas son consideradas como proteínas motoras ya que presentan actividades de: unión a ácidos nucleicos, hidrólisis del ATP dependiente de DNA y magnesio (ATPasa), y la actividad desenrolladora del DNA de la helicasa gracias al ATP (Hall, 1999). Estas tres actividades dependen una de otra. Así, en ausencia de DNA la actividad de ATPasa es muy baja, pero en presencia de DNA de cadena sencilla la actividad es estimulada varias veces. Sin ATP la helicasa no puede desenrollar el dúplex de DNA. En general, las DNA helicasas muestran una polaridad específica, que es definida como la orientación hacia donde la helicasa se une al templado de DNA de cadena sencilla y puede ser en dirección 3'-5' o 5'-3' (Karow *et al.*, 1997)

1.5. Recombinación homóloga en parásitos protozoarios

La utilización de la HR como un mecanismo para reparar el DNA apunta a preservar la integridad genómica de un organismo, sin embargo, esto puede también contribuir a la generación de diversidad genómica. La recombinación del DNA es la estrategia central que algunos parásitos patógenos adoptan para tratar de evadir la respuesta inmune del huésped a través de un mecanismo llamado variación antigénica (Deistch, 1997). Esta estrategia general consiste de cambios periódicos en los antígenos expuestos y es empleada por una enorme gama de parásitos protozoarios como ventaja propia para mantener la cronicidad de la infección sin eliminar al

huésped o sin ser eliminados por éste. Así los parásitos protozoarios llevan a cabo rearrreglos genómicos para rediseñar el genoma y expresar antígenos variables, los cuales le permiten cambiar rápidamente sus moléculas de superficie (Barry *et al.*, 2001; Van Der Woude, 2004).

Los parásitos kinetoplastidos como por ejemplo *Trypanosoma brucei*, poseen glicoproteínas variantes de superficie (VSGs por sus siglas en inglés) adheridas a la superficie de la membrana a través de anclas GPI (Smith *et al.*, 2004). La variación antigénica consiste en activar la expresión de las VSGs sobre la superficie celular (Donelson, 2003; Pays *et al.*, 2004). *T. brucei* contiene más de 1000 genes VSG y la gran mayoría no se expresan *in situ*, pero muchos pueden ser recombinados dentro de unidades de transcripción teloméricas, llamados sitios de expresión. Evidencias genéticas y moleculares sugieren que la vía VSG surge predominantemente como un proceso de HR dependiente de la proteína RAD51, en la cual la diversidad fenotípica esta dada por la modificación en la expresión de genes que permiten a los parásitos escapar a la respuesta inmune a través de anticuerpos dirigidos contra éstas moléculas (Conway *et al.*, 2002), permitiendo así al parásito asegurar su supervivencia para prolongar la infección (Barry, 2001).

El parásito apicomplexa *Plasmodium falciparum* también emplea la variación antigénica como estrategia para escapar a la respuesta inmune del huésped. Se ha demostrado que este parásito posee la proteína PfRAD51 (Bhattacharyya y Kumar, 2003) cuyo gen se expresa en el estadio de esquizonte durante el ciclo eritrocítico del parásito, sugiriendo que la proteína PfRAD51 desempeña un papel conservado durante la mitosis en este parásito. Como se esperaba, la expresión del gen *pfrad51* fue regulada en respuesta a agentes que inducen daño al DNA (en este caso con metil metano sulfonato o MMS por sus siglas en inglés) (Bhattacharyya y Kumar, 2003). Recientemente, se demostró que pfrAD51 presenta actividades de ATPasa de intercambio de cadenas de DNA, lo que es congruente con el papel de esta proteína en el mecanismo de HR (Bhattacharyya *et al.*, datos sin publicar).

La proteína Rad51 se ha caracterizado también en *Leishmania major* (McKean, 2001), donde la inducción de su expresión se da como respuesta de daño al DNA sugiriendo que la proteína funciona en la reparación del DNA por recombinación homóloga en la mitosis. La proteína LmRAD51 de *L. major* es una recombinasa que tiene la capacidad de unirse al DNA y posee actividad de ATPasa dependiente de DNA, además de estar involucrada en los eventos de amplificación genética. También participa en la reparación de DNA, está involucrada en eventos de recombinación entre secuencias repetitivas flanqueando los genes de resistencia a múltiples drogas (MDR por sus siglas en inglés), confiriendo a estos parásitos el fenotipo de resistencia a drogas (McKean, 2001).

Estos reportes muestran que algunos parásitos protozoarios como son *T. brucei*, *P. falciparum* y *L. major*, utilizan el mecanismo de HR para reparar el DNA o para generar variabilidad genética necesaria para su supervivencia en el huésped. En nuestro grupo de trabajo, estamos interesados en estudiar el mecanismo de recombinación homóloga en *E. histolytica*, el protozoario responsable de la amibiasis humana.

1.6. Generalidades de la amibiasis humana

La amibiasis humana causada por el parásito protozoario *Entamoeba histolytica* (Schaudin, 1903) es una enfermedad infecciosa que se manifiesta clínicamente como disentería intestinal y amibiasis extraintestinal (Marion y Guillen, 2006). El período de incubación de la amibiasis intestinal varía desde días, meses o años, siendo generalmente de 1 a 4 semanas. Cuando el parásito invade el epitelio intestinal causa una serie de alteraciones anatómicas, correspondientes a cuadros clínicos bien definidos que se conocen como colitis ulcerativa amibiana, o granuloma amibiano y apendicitis amibiana (Tanyuksel y Petri Jr., 2003). Bajo ciertas condiciones, el parásito puede llegar a otros órganos, principalmente al hígado, pero también al pulmón y el cerebro, provocando amibiasis extraintestinal. La amibiasis hepática es la segunda

manifestación clínica más importante y se caracteriza por la presencia de abscesos en el hígado con una o más áreas grandes de necrosis.

1.7. Epidemiología de la amibiasis

El protozooario *E. histolytica* está presente en el tracto gastrointestinal del 10 al 20 % de la población mundial y constituye la tercera causa de muerte por enfermedades parasitarias en el mundo, ya que provoca el deceso de más de 500 000 personas al año. Según cifras reportadas por la Organización Mundial de la Salud (OMS), la incidencia de esta enfermedad es más alta en países subdesarrollados (WHO, 1997). A nivel mundial se han identificado áreas geográficas endémicas de alta incidencia para esta enfermedad, entre las que se encuentran el sur de Asia y África, el medio Oriente, el sur y centro de América, destacando a Venezuela, República Dominicana, Brasil, y México (Ravdin, 2000), debido esencialmente a las condiciones de insalubridad en las que se encuentran los sectores marginados de la población, como son las condiciones sanitarias inadecuadas, carencia de agua potable, además de la falta de higiene y manejo incorrecto de los alimentos. En países, industrializados como los Estados Unidos, se estima que el 3 % de la población es portadora del parásito y se manifiesta principalmente en inmigrantes, personas con inmunodeficiencias y en turistas que visitaron zonas endémicas para la amibiasis (Tanyuksel y Petri, Jr., 2003).

En México, la amibiasis es considerada un severo problema de salud pública, debido a que se encuentra entre las diez primeras causas de mortalidad infantil por problemas gastrointestinales. Un estudio realizado en mexicanos reveló que el 8.4 % de la población resultó ser seropositiva para antígenos de *E. histolytica*, presentando índices más elevados en zonas rurales donde no existe drenaje ni agua potable (Conde-Bonfil y Mora-Zerpa, 1992; Caballero-Salcedo *et al.*, 1994), siendo la prevalencia más alta en niños en edad escolar debido quizás, a la transmisión del

parásito en los centros escolares por la ausencia de hábitos de higiene (Cinfuentes *et al.*, 1994).

De acuerdo a los reportes del Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica (SINAVE) la amibiasis es la quinta causa de morbilidad en México. Entre los años 2008-2009, se registraron unos 527, 533 casos en hombres y mujeres. Cuando esto se analizó por grupos de edad se observó que los niños de 1 a 4 años y los adultos de entre 25 y 44 años de edad son los más afectados con 150 372 y 146 102 casos, respectivamente. Asimismo, existe una proporción de un paciente con amibiasis invasiva por cada cuatro o cinco portadores asintomáticos, y se estima que de la población mexicana total, existen 16 millones de portadores, 3 millones de enfermos y de 10 a 13 mil muertos (Conde-Bonfil y Mora-Zerpa, 1992).

1.8. Clasificación taxonómica de *E. histolytica*

El parásito protozario *E. histolytica* pertenece al Reino Protista, Subreino Protozoa, Phylum *Sarcomastigophora*, Subphylum *Sarcodina*, Superclase *Rhizopoda*, Clase *Lobosea*, Subclase *Gymnamoebia*, Orden *Amoebida*, Suborden *Tubulina*, Familia *Entamoebidae*, Género *Entamoeba*, Especie *histolytica* (Levine *et al.*, 1980; Keas, 2006).

1.9. Morfología de *E. histolytica*

Durante su ciclo de vida el protozario *E. histolytica* presenta dos estadios morfológicos distinguibles: el quiste y el trofozoíto. El quiste presenta una forma ovalada con diámetro de 8 a 20 μm , cuatro núcleos y una pared celular de quitina de 125 a 150 nm de grosor que lo hace altamente resistente a cambios de temperatura, humedad y presión osmótica. Debido a la protección conferida por sus paredes, los quistes pueden sobrevivir de días a semanas en un ambiente externo y siendo los responsables de propagar la enfermedad, constituyen la fase infectiva del parásito. El trofozoíto constituye la fase activa del protozario; con un diámetro entre 30 y 40 μm , con una intensa actividad motora, desplazándose por medio de la formación de

pseudópodos y filópodos, presentando un uroide en la parte posterior, vive en el lumen del intestino grueso donde se multiplica (Ravdin, 2000). A diferencia del quiste, es sumamente sensible a cambios de temperatura, pH y osmolaridad. El trofozoíto carece de estructuras reconocibles en la mayoría de eucariontes, debido a esto se considera un organismo simple. Pero, contiene varias vacuolas citoplásmicas y algunas estructuras subcelulares que podrían corresponder al retículo endoplásmico y al aparato de Golgi (Chavez-Mungia y Ghosh *et al.*, 1999).

1.10. Ciclo de vida de *E. histolytica*

La infección por *E. histolytica* inicia por la ingestión de quistes maduros presentes en alimentos o agua contaminada o del consumo de los mismos con las manos contaminadas por heces fecales (Fig. 4). Los quistes son capaces de sobrevivir a las sustancias ácidas del estómago y pueden transportarse al intestino delgado. Los trofozoítos motiles emergen en el íleon terminal (Ravdin, 2000). Estos viajan a través del intestino delgado, donde se multiplican por fisión binaria y eventualmente pueden formar nuevos quistes. Los quistes uninucleados sufren varias divisiones nucleares dando lugar a quistes maduros tetranucleados que son excretados con las heces fecales, saliendo así del huésped, cerrando el ciclo de vida del protozoario (Center for Disease Control and Prevention, 2006). En algunos casos, los trofozoítos invaden la mucosa intestinal produciendo úlceras y colitis asintomática; también pueden ser transportados a otros órganos como el hígado, pulmón o cerebro a través del torrente sanguíneo (www.dpd.cdc.gov, 2006), produciendo abscesos que pueden ser fatales. La transmisión fecal-oral de *E. histolytica* es favorecida en las zonas donde existen condiciones deficientes de salud e higiene, incluyendo ignorancia, pobreza, contaminación de fuentes de agua e ineficiencia en los sistemas de saneamiento.

1.11. Virulencia y patogenicidad de *E. histolytica*

La virulencia se define como el grado en que se expresa la patogenicidad de un organismo. La patogenicidad es, entonces, la capacidad del parásito para producir daño al huésped, dicho de otra manera es su capacidad invasiva. Los términos virulencia y patogenicidad son utilizados de forma indistinta (Pérez-Tamayo, 1989). La infección del tracto gastrointestinal puede evolucionar con diferentes grados de virulencia, dependiendo de factores del huésped (principalmente el sistema inmune) pero también del parásito. Los portadores asintomáticos que no sufren la enfermedad constituyen aproximadamente el 75 % de los casos que presentan al parásito en el examen coprológico, mientras que el 25 % restante manifiestan diversos síntomas clínicos. En general, los trofozoítos que viven en el intestino producen la clásica disentería amibiana, caracterizada por diarrea. En algunos casos, cuando los trofozoítos colonizan a otros órganos (hígado, pulmón o cerebro), en un proceso facilitado por enzimas proteolíticas, producen abscesos que conducen a la muerte (www.dpd.cdc.gov, 2006).

Cuando los trofozoítos penetran la pared intestinal se aprecia microscópicamente una alteración de la mucosa. Cuando las amibas se han multiplicado suficientemente, se produce una lesión puntiforme, como una pequeña prominencia, en el centro de ésta hay una solución que es el origen de la laceración. Los trofozoítos se multiplican en la parte más profunda de la lesión destruyendo los tejidos por debajo de la mucosa intestinal. Cuando ha sucedido esto, se origina una lesión llamada “botón de camisa”, la cual consiste en una pequeña pápula con una laceración central, que se prolonga de manera más amplia en la base. En el transcurso de dos a seis semanas después de la ingestión de quistes infecciosos, se puede presentar una colitis amibiana sintomática, apareciendo gradualmente un malestar abdominal inferior y una ligera diarrea, seguido de irritabilidad, pérdida de peso, dolor abdominal y de espalda. Cuando la multiplicación de las amibas ha sido grande como para destruir una mayor cantidad de mucosa intestinal, se producen ulceraciones con fondo

rugoso y abundante moco, las ulceraciones abarcan una mayor extensión y dan origen a formas necróticas graves.

La gran variabilidad fenotípica de los trofozoítos ha sido relacionada a la gran plasticidad genómica que presentan las diversas clonas y cepas. Se han reportado cambios frecuentes de haploidia así como eventos de amplificación y duplicación génica no controlados (Martínez-Palomo, 1982). En conjunto, estos eventos le han permitido a *E. histolytica* colonizar e invadir tejidos en su hospedero. Otra característica de *E. histolytica* es que su material genético está confinado por una membrana nuclear muy semejante a la de otros eucariontes. Es importante mencionar que la virulencia de los trofozoítos en cultivo disminuye después del mantenimiento prolongado en medio axénico (cultivo de un organismo particular que se encuentra completamente libre de otros organismos “contaminantes”), pero puede ser aumentada después de varios pases por el hígado de hámster (Bracha, 1984) o a través de la asociación de éstos con diversas especies de bacterias. Además se sabe que durante el ciclo de vida de *E. histolytica*, los trofozoítos pueden duplicar su genoma varias veces, incluso antes que la citocinesis ocurra, generando poblaciones de trofozoítos multiploides. Esto propicia que los cultivos de *E. histolytica*, obtenidos a partir de quistes o trofozoítos de las heces sean heterogéneos y que estén constituidos por subpoblaciones de trofozoítos genéticamente diferentes, presentando un comportamiento variable con relación a la virulencia (Orozco *et al.*, 1985a). Esto también explica las diferencias en el contenido de DNA observadas en algunas cepas de *E. histolytica* (López-Revilla y Báez-Camargo, 1992). Recientemente, un estudio realizado en Bangladesh, demostró que existe una relación entre el genotipo del parásito y el desarrollo de la enfermedad (Ali *et al.*, 2007). Estos trabajos sugieren que los trofozoítos de *E. histolytica* presentan rearrreglos en su genoma que podrían deberse a eventos de HR. Así el parásito podría utilizar la HR como una estrategia para modificar la expresión de ciertos genes y expresar diversos grados de virulencia y patogenicidad.

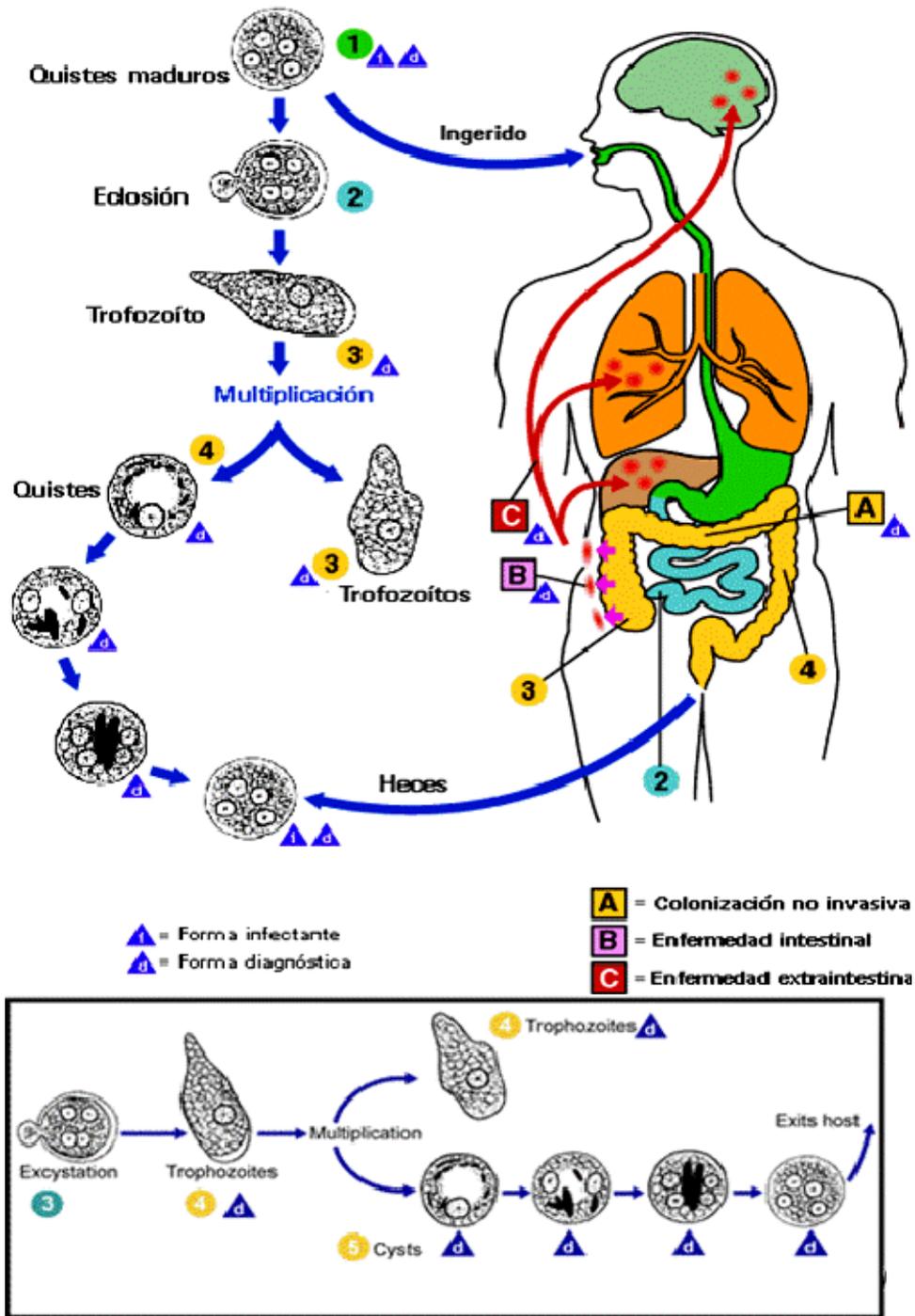


Figura 4. Ciclo de vida de *E. histolytica* (Tomado de mdmx.consalud.com)

2.1. Recombinación homologa en *E. histolytica*

Recientemente, en nuestro grupo de trabajo, se realizó un análisis *in silico* del genoma de *E. histolytica* y se identificaron genes que codifican para proteínas homólogas a las proteínas involucradas en la reparación del DNA por HR en otros eucariontes. Mediante la utilización de un modelo de daño al DNA por irradiación con luz UV, se demostró que estos genes presentan una expresión diferencial antes y después del daño al DNA. En particular, la caracterización molecular y funcional de la proteína recombinante rEhRAD51 demostró que es una recombinasa, ya que posee la capacidad de unirse al DNA y promover el apareamiento de cadenas homólogas formando el D-loop. Se observó además un aumento de la expresión del gen *Ehrad51* (a nivel de RNAm y proteína) después del tratamiento con luz UV, así como una relocalización de la proteína en estructuras llamadas foci nucleares que podrían corresponder a sitios de reparación del DNA. Estos datos sugieren que la proteína EhRAD51 de *E. histolytica* está involucrada en el proceso de HR relacionado con la reparación del DNA (López-Casamichana *et al.*, 2008).

También se realizó el estudio de la proteína EhRAD54 de 100 kDa (884 aminoácidos), la cual tiene la forma bilobulada característica de esta familia de proteínas y cuenta con el dominio de helicasa y los siete motivos típicos de la superfamilia SWI2/SNF2 de las proteínas RAD54 de otros organismos y esta filogenéticamente relacionada con proteínas homólogas de parásitos protozoarios. El extremo 5' (581 pb) del gen *Ehrad54* (2655 pb) se clonó en el vector pGEX6p1 para inducir la expresión de una proteína recombinante de 47.5 kDa (EhRAD54r) en bacterias *Escherichia coli*. En ensayos de Western blot, este polipéptido fue reconocido por los anticuerpos específicos obtenidos a partir de la inoculación en ratones de un péptido antigénico sintético (PAS) correspondiente a una secuencia de 15 aminoácidos del extremo amino de EhRAD54. Posteriormente, se utilizó el modelo de daño al DNA inducido

con luz UV-C (150 J/m²) para producir DSB e iniciar el estudio de la posible participación de EhRAD54 en el mecanismo de reparación del DNA por HR en trofozoítos de *E. histolytica*. En ensayos de Western blot, los anticuerpos anti-PAS detectaron una proteína de aproximadamente 100 kDa en extractos obtenidos de trofozoítos irradiados con luz UV, lo cual corresponde al peso molecular esperado para la proteína EhRAD54 nativa. Estos datos sugieren que EhRAD54 pudiera participar en el proceso de reparación del daño al DNA por HR en este parásito (Lorena García-Morales, tesis de Maestría).

Dentro de los genes identificados, se encuentra el gen *Ehblm* que codifica para una DNA helicasa de la familia RecQ. Inicialmente localizado en el locus 192.m00073, en las coordenadas 25785 al 22237 nucleótidos, el gen corresponde ahora al locus EHI_028890 en la versión recientemente actualizada del genoma de *E. histolytica* www.pathema.tigr.org. El gen consta de 3548 pb y carece de intrones. La longitud de la proteína predicha es de 1182 aminoácidos con un peso molecular teórico de 137.58 kDa y un punto isoelectrico predicho de 5.55. La región correspondiente al dominio de helicasa del gen *Ehblm* fue amplificada por PCR a partir de DNA genómico de la clona A de *E. histolytica* y clonado en el vector de expresión pRSET-A.

La recombinación homóloga es un proceso molecular eficiente para mantener la integridad del genoma así como generar diversidad genética. La variabilidad de la patogenicidad de los trofozoítos de *E. histolytica* ha sido relacionada con la plasticidad de su genoma que podría ser el resultado de eventos de recombinación homóloga que permiten al parásito adaptarse a diferentes condiciones ambientales y modular su virulencia.

La reciente identificación de la posible maquinaria de reparación del DNA por recombinación homóloga de *E. histolytica* y la caracterización de la recombinasa EhRad51 y la posible translocasa EhRad54, abren la posibilidad de entender como se llevan a cabo los rearrreglos genómicos en este parásito. En este contexto, la caracterización de la proteína EhBLM nos ayudará a entender como se lleva a cabo el desenrollamiento del DNA en *E. histolytica*, una etapa esencial en el proceso de HR.

1. Objetivo general

Caracterizar molecular y funcionalmente a la proteína EhBLM de *E. histolytica*.

2. Objetivos particulares

1. Determinar las relaciones estructurales y filogenéticas de la proteína EhBLM con proteínas homólogas de diversos organismos.
2. Subclonar la región que codifica para el dominio de DNA helicasa de EhBLM en el vector de expresión pGEX-6P1.
3. Expresar y purificar la proteína recombinante EhBLM-GST correspondiente al dominio de DNA helicasa.
4. Determinar si la proteína rEhBLM-GST presenta actividad de unión al DNA *in vitro*.

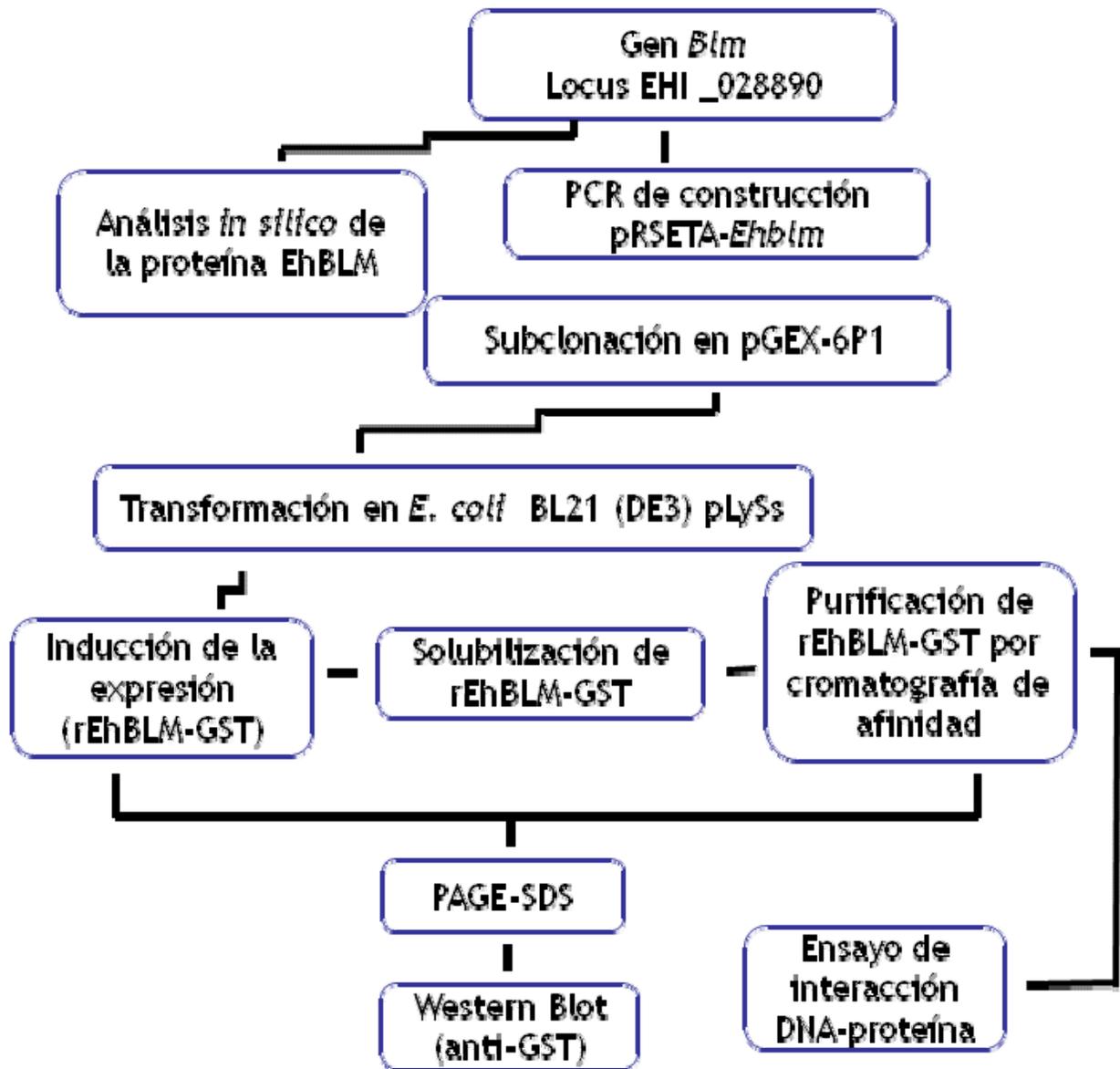


Figura 5. Estrategia experimental general

Para cumplir estos objetivos se siguió la estrategia experimental presentada en la figura 5.

1. Análisis *in silico* de la secuencia de aminoácidos de la proteína EhBLM

El análisis *in silico* se realizó utilizando las bases de datos del genoma de *E. histolytica* www.tigr.org, www.pathema.tigr.org, www.sanger.ac.uk, la base de datos Swis-Prot www.embl.org y herramientas bioinformáticas de la página www.expasy.org. Se tomó como referencia la secuencia del gen *Ehblm* identificado en el locus EHI_028890 y se determinó la secuencia predicha para la proteína EhBLM utilizando el programa TRANSLATE. Con el programa BLAST, acrónimo de “Basic Local Alignment Search Tool”, se buscaron las homologías que presenta la proteína EhBLM con las proteínas de diferentes organismos registradas en los bancos de datos. El programa compara las secuencias de aminoácidos y calcula el significado estadístico de aquellos que coinciden. El BLAST puede ser usado para inferir relaciones funcionales y evolutivas, así como para identificar miembros de una familia de genes.

El programa CLUSTALW (EMBL-EBI, 2006) se empleó para realizar alineamientos múltiples entre proteínas homólogas de especies representativas de cada reino: Animalia; Vertebrados: *Homo sapiens*, *Mus musculus*, *Gallus gallus*, *Brachydanio rerio*, *Xenopus laevis*; Insecta; *Drosophila melanogaster*; Invertebrados: *C. elegans*; Plantae; *A. thaliana*; Levaduras; *S. cerevisiae*; Protozoarios parásitos; *Leishmania major*, *Trypanosoma cruzi*, *E. histolytica* y el Procarionte: *Escherichia coli*. Para identificar los dominios estructurales y funcionales se emplearon los programas PROSITE, PROSCAN y PFAM www.sanger.ac.uk. El análisis filogenético y de homologías se realizó mediante el alineamiento de los dominios de helicasa de la proteína EhBLM y proteínas homólogas de varios organismos utilizando el programa MEGA versión 3.1 www.megasoftware.net. Para realizar la descripción de la estructura secundaria de la

proteína EhBLM se empleó el programa SABLE www.psipred.org/. El programa 3D-JigSaw www.bmm.cancerresearchuk.org/~3djigsaw se empleó para realizar la predicción de la estructura tridimensional de la proteína EhBLM y se visualizó con el programa pymol www.pymol.sourceforge.net.

2. Subclonación del gen *Ehblm* en el vector pGEX-6P1

2.1. Diseño de los oligonucleótidos iniciadores (primers)

Con el programa OLIGO se diseñaron los oligonucleótidos sentido (5'-CCCCCGGATCCAGAAATCCTGGAGCACAAAAGTATAAAG-3') (*sEhblm*) y antisentido (5'-CCCCCCTCGAGTTATGTTTCCTCTCATAATTCCAATTAC-3') (*AsEhblm*) que contienen los respectivos sitios de restricción para las enzimas *Bam*HI y *Xho*I (indicadas en negritas) y que flanquean la secuencia que codifica para el dominio de helicasa del gen *Ehblm* clonado en el vector pRSET-A.

Los oligonucleótidos se generaron por síntesis química (Sigma) y fueron cuantificados en geles de agarosa teñidos con bromuro de etidio y espectrofotométricamente mediante la absorbancia a una longitud de onda de 260 nanómetros (nm) (Beckman DU 650). Para determinar la concentración ($\mu\text{g}/\text{ml}$) de los oligonucleótidos se utilizó la siguiente fórmula matemática: Absorbancia (260 nm) \times 33 \times factor de dilución.

2.2. Amplificación por PCR del dominio de helicasa

Para la PCR se utilizaron 300 ng del plásmido pRSET-*Ehblm*, el cual tiene clonado el dominio funcional de helicasa con los motivos I-VI del gen *Ehblm*, 100 ng de cada uno de los oligonucleótidos iniciadores (*sEhblm* y *AsEhblm*), 3 mM de cada dNTP (dATP, dCTP, dTTP y dGTP), solución amortiguadora 10 X (Invitrogen), 50 mM de cloruro de magnesio, 5 U/ μL de la enzima Taq DNA polimerasa Platinum® High fidelity (Invitrogen) y agua destilada para obtener un volumen de 50 μL . En otra reacción, se utilizaron 50 ng del DNA genómico de *E. histolytica*. El control negativo consistió en

una mezcla de reacción carente de DNA. La amplificación se llevó a cabo en un termociclador PCR System 2700 (Applied Biosystems), utilizando el siguiente programa: desnaturalización inicial a 94 ° C durante 5 min, 25 ciclos a 94 ° C por 30 seg, 55 ° C por 45 seg y 72 ° C durante 1 min. y finalmente se realizó una extensión adicional a 72 ° C por 7 min. Los productos de PCR se analizaron en geles de agarosa al 1.8 % en amortiguador de TAE 1X (Tris-base 242 g, ácido acético glacial 57.1 ml, EDTA 0.5 M pH 8) teñidos con bromuro de etidio.

2.3. Purificación del DNA

Los productos de PCR se purificaron empleando el Kit Gel Extraction (QIAquick marca Quiagen). Este proceso de purificación remueve “primers”, nucleótidos, enzimas, sales, agarosa, y bromuro de etidio. A partir del gel de agarosa se cortó el fragmento de DNA con una navaja limpia, removiendo el exceso de agarosa. Posteriormente se colocó en un tubo de 1.5 ml, se añadieron 300 µl de amortiguador QG. Se incubaron a 50 ° C durante 10 minutos o hasta que el gel estuviera disuelto completamente. Para disolverlo, se mezcló con un vórtex cada 2-3 minutos. El color de la mezcla cambio a amarillo (similar al del amortiguador QG sin disolver la agarosa). Se añadieron 100 µL de isopropanol y mientras tanto se preparó una columna QIAquick dentro de un tubo colector. Para unir el DNA se colocó la muestra en la columna en una microcentrifuga eppendorf modelo 5417R y se centrifugó por un minuto a 13000 rpm a 4° C. El sobrenadante obtenido se descartó y la columna se colocó de nuevo dentro del tubo colector. Se adicionaron 500 µl de amortiguador QG a la columna y se centrifugó durante 1 minuto a 13000 rpm a 4° C. Para lavar, se agregaron 750 µL de amortiguador a la columna y se centrifugó por un minuto (13000 rpm a 4° C). De nueva cuenta se descartó el sobrenadante y la columna se centrifugó durante un minuto a (13000 rpm a 4° C). La columna se colocó dentro de un tubo nuevo de 1.5 ml. Finalmente para eluir el DNA, se añadieron 50 µL de agua bidestilada al centro de la membrana y la columna se centrifugó por un minuto a

14000 rpm a 4° C. Alternativamente, para incrementar la concentración de DNA, se agregaron 30 µL más de agua al centro de la membrana, permitiendo reposar durante un minuto, y entonces se centrifugó en las mismas condiciones descritas anteriormente.

2.4. Subclonación en el vector de expresión pGEX-6P1

Para realizar la subclonación del fragmento amplificado a partir de DNA del plásmido pRSET-*Ehblm*, se utilizó el vector de expresión pGEX-6P1 (GE Life Sciences) (Fig. 6). Este vector tiene un tamaño de aproximadamente 4900 pb y se caracteriza por poseer un promotor inducible con IPTG, un gen de resistencia a ampicilina y un sitio de clonación múltiple el cual tiene en sentido 5' a 3' los sitios de corte para las enzimas *Bam*HI y *Xho*I, los cuales fueron necesarios para llevar a cabo una subclonación dirigida. pGEX posee una etiqueta de glutatión-S-transferasa (GST)m. a esta etiqueta se liga el gen clonado. Entre el GST y el sitio de clonación múltiple se encuentra la secuencia del sitio de corte para la proteasa PPS (PreScission Protease), proteína que corta el GST para dejar libre la proteína recombinante purificada (Fig. 6). El producto de PCR de 1464 pb correspondiente al dominio funcional de helicasa del gen *Ehblm* y el vector pGEX-6P1 de 4900 pb (Amersham) se digirieron paralelamente con las enzimas *Bam*HI y *Xho*I (Promega) usando 1 ug del plásmido, 5 U de cada enzima en el amortiguador 2 (NaCl 150 mM, Tris-HCl 10 mM, MgCl₂ 10 mM, DTT 1 mM, pH 7.9) durante 3 horas a 37° C. Al día siguiente, los productos de la restricción se analizaron en un gel de agarosa al 1% en TAE 1X. Tanto el inserto como el vector se purificaron mediante el sistema Gel Extraction kit (Qiaquick) y nuevamente se analizaron en un gel de agarosa al 1% para su cuantificación y purificación con el kit Kit Gel Extraction (marca Quiagen), como se describió previamente.

Para realizar la cuantificación del vector y del inserto, se procedió a realizar cálculos matemáticos, basándonos en los valores ya establecidos de la concentración de los

marcadores de peso molecular λ HindIII y 100 pb (pares de bases). La reacción de ligación, se realizó en una proporción 3:1 (relación vector: inserto).

Para la subclonación se incubaron 5 μ L (200 ng) del producto de PCR con 1 μ L de agua estéril, 1 μ L del vector (10 ng/ μ L de DNA plasmídico en 50% de glicerol; 50 mM Tris-HCl, pH 7.4; 1 mM EDTA; 1 mM DTT [Di-thiotreitol]; 0.1 % Tritón X-100, 100 μ L/ml BSA) y 1 μ L de solución de sales (1.2 M NaCl; 0.06 MgCl₂) durante 30 min. a temperatura ambiente. Después, se procedió a realizar la transformación de bacterias *E. coli* biológicamente competentes de la cepa DH5 α para lo cual 4 μ L de la reacción se colocaron en un tubo de 1.5 ml con 50 μ L de células. La mezcla fue empleada siguiendo el protocolo de transformación.

pGEX-6P-1 (27-4597-01)

PreScission[®] Protease

Leu	Glu	Val	Leu	Phe	Gln	Gly	Pro	Leu	Gly	Ser	Pro	Glu	Phe	Pro	Gly	Arg	Leu	Glu	Arg	Pro	His
CTG	GAA	GTT	CTG	TTC	CAG	GGG	CCC	CTG	GGA	TCC	CCG	GAA	TTC	CCG	GGT	CGA	CTC	GAG	CGG	CCG	CAT

BamHI EcoRI SmaI SalI XhoI NotI

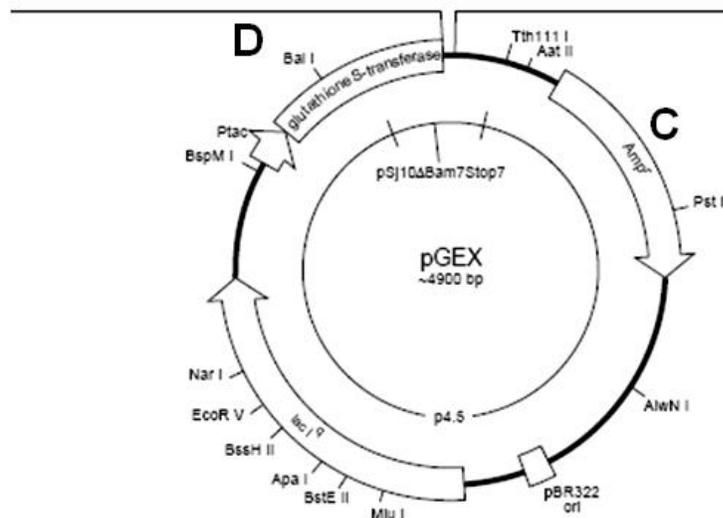


Figura 6. Mapa del vector pGEX-6P1. En A y B se observan los sitios de corte para las enzimas *Bam*HI y *Xho*I respectivamente, los cuales fueron necesarios para la clonación dirigida. En C se esquematiza el gen de resistencia a ampicilina y en D la etiqueta de glutatión-S-transferasa (GST). Entre el GST y el sitio de corte para la enzima *Bam*HI Se encuentra el sitio de corte para la PPS (PreScission Protease).

2.5. Preparación de células competentes

2.5a. Células competentes frescas

Para la clonación se emplearon bacterias competentes de la cepa DH5 α . Inicialmente se sembró un inoculó en una placa de medio Luria Bertani (LB)-agar (2 g de medio LB, 1.48 g de agar selecto, 100 ml de agua destilada) carente de antibiótico y se incubó a 37° C toda la noche. Al día siguiente, una colonia se colocó en 5 ml de medio LB (medio LB al 2 %) y se incubó a 37° C a 250 revoluciones por minuto (rpm) durante toda la noche. Posteriormente se tomaron 500 μ L del cultivo y se agregaron a 50 ml de medio LB líquido y carente de antibiótico y se incubó a 37° C a 250 rpm hasta que alcanzó una densidad óptica (DO) de 0.4 a una longitud de onda de 595 nm. Posteriormente, las células se incubaron en hielo durante 1 min. y se vaciaron en tubos cónicos estériles. Se centrifugaron a 3000 rpm (Heraeus Biofuge) por 5 min. a 4° C y; la pastilla se resuspendió en 20 ml de solución de CaCl₂ 50 mM frío, se incubó por 20 min. en hielo y se centrifugó a 3000 rpm durante 5 min. a 4° C. El sobrenadante se desechó y la pastilla se resuspendió en 4 ml de solución de CaCl₂ 50 mM. Las células competentes así preparadas se utilizaron inmediatamente.

2.5b. Células competentes congeladas

Se picaron colonias de bacterias DH5 α y BL21 (DE3) PLYS de *E. coli* de una placa de medio LB-agar (2 g de medio LB, 1.48 g de agar selecto, 100 ml de agua destilada), se inocularon en 5 ml de medio LB al 2% y se incubaron a 37° C a 250 rpm durante toda la noche. Se tomaron 500 μ L del cultivo crecido toda la noche y se agregaron a 50 ml de medio LB fresco y estéril y fueron incubados de nuevo a 37° C hasta que el cultivo alcanzó una DO de 0.4 a una longitud de onda de 595 nm. Posteriormente, el cultivo se colectó en tubos cónicos y se incubaron en hielo durante 15 min. Pasado este tiempo se centrifugaron a 3000 rpm durante 15 min a 4° C; la pastilla se secó y se resuspendió en 20 ml de solución RF1 fría (RbCl 100 mM, MnCl₂ 50 mM, acetato de potasio 30 mM, CaCl₂ 10 mM, glicerol al 15 % a un pH de 5.8 el cual se ajustó con

ácido acético 0.2 M) evitando la formación de burbujas. Posteriormente las bacterias se incubaron durante 15 min. en hielo y se centrifugaron a 3000 rpm durante 15 min. a 4° C. Finalmente la pastilla fue resuspendida en 8 ml de solución RF2 fría (RbCl 10 mM, MOPS 10 mM, CaCl₂ 75 mM, glicerol al 15 %, el pH fue ajustado a 6.5 con NaOH) y se incubaron 15 min. en hielo. Las células competentes fueron distribuidas en tubos estériles en alícuotas de 100 y 200 µL, se congelaron en nitrógeno líquido y se guardaron a -70° C hasta su utilización.

2.6. Transformación

2.6a. Transformación del producto de ligación

A 50 µl de células competentes DH5α de *E. coli* se les adicionó 20 µL de la reacción de ligación y se agitaron suavemente. Posteriormente se incubaron en hielo durante 30 minutos y, luego se colocaron a 42 °C por 90 seg, con la finalidad de permeabilizar a las bacterias. Pasado el tiempo se regresaron a hielo por 5 min. Y se les adicionaron 300 µL de medio LB líquido bajo condiciones de esterilidad. Las bacterias se incubaron por 1 h. a 37 °C en agitación a 225 rpm. Por último, se distribuyeron de 50 a 100 µL de la mezcla final sobre placas de medio LB-agar con 100 µg/ml de ampicilina (Sigma) y se incubaron toda la noche.

2.6b. Transformación para inducir la expresión de la proteína recombinante

A 50 µL de células competentes BL21 (DE3) pLys S se les adicionó 2 µL del plásmido pGEX-6P1-*Ehblm* y se agitaron suavemente. Posteriormente se incubaron en hielo durante 30 minutos, luego se colocaron a 42° C por 90 segundos. Finalmente, para sellar el poro se regresaron a hielo durante 5 min. Se adicionaron 300 µL de medio LB bajo condiciones de esterilidad. Las bacterias se incubaron por 1 h. a 37 °C a 250 rpm. Por último, se distribuyeron de 50 a 100 µL de la mezcla final sobre placas con medio LB sólido con 100 µg/ml de ampicilina (Sigma) y 34 mg/ml de cloranfenicol (Sigma) y se incubaron toda la noche a 37 °C.

2.7. Obtención de DNA plasmídico (miniprep).

Para la obtención de DNA plasmídico a pequeña escala se siguió la técnica descrita por Sambrook *et al.* (1989). Las colonias bacterianas obtenidas de la transformación y que crecieron en placas de LB ampicilina se sembraron en 5 ml de medio LB líquido complementado con 50 µg/ml de ampicilina y se incubaron toda la noche a 37° C en agitación a 250 rpm. Al día siguiente se tomaron 1.5 ml de cada cultivo, se colocaron en un tubo de 1.5 ml (Eppendorf), y se centrifugaron a 1300 rpm durante 1 min en una microcentrifuga a 4 °C. La pastilla se resuspendió en 100 µL de solución I fría (Glucosa 50 mM, Tris HCl 25 mM pH 8, EDTA 10 mM pH 8), el tubo se invirtió suavemente 3 veces y se agregaron 200 µL de la solución II (NaOH 0.2 N, SDS 1%).

El tubo se invirtió en 3 ocasiones y se incubó a temperatura ambiente durante 3 minutos. Pasado este tiempo se agregaron a la mezcla 150 µL de la solución III (Acetato de potasio 5 M, Potasio 3 M), se mezcló por inversión y se centrifugó 5 min. a 13000 rpm a 4° C. El sobrenadante se recuperó decantándolo a un tubo nuevo. Posteriormente, se agregó 1 ml de etanol absoluto frío y se incubó durante 2 minutos a temperatura ambiente. Seguido de esto la muestra se centrifugó a 13000 rpm por 5 min. a 4° C, el sobrenadante se desechó y la pastilla se lavó cuidadosamente con 1 ml de etanol al 70 % frío, nuevamente se centrifugó a 13000 rpm durante 3 minutos a 4 °C. El DNA plasmídico obtenido se dejó secar a temperatura ambiente y se resuspendió en 30 µL de agua desionizada estéril. A cada muestra se le agregó 1 µL de RNasa A (marca Sigma-Aldrich) (10 µg/µL) y se incubó a 37 °C durante 30 minutos. Finalmente, la muestra se almacenó a -20 °C hasta su utilización.

2.8. Secuenciación automática del gen *Ehblm*

La construcción pGEX-6P1-*Ehblm* (clona 4b) se secuenció por electroforesis capilar en un secuenciador automático de DNA (IFC-UNAM) para confirmar la identidad del fragmento clonado y verificar que estuviera en marco de lectura con el vector de expresión. Los datos obtenidos fueron interpretados en la computadora la cual asignó

un pico de fluorescencia correspondiente a un nucleótido específico y el resultado se desplegó gráficamente en un electroferograma empleando el programa Chromas www.technelysium.com.au/chromas.html

3. Expresión de la proteína recombinante EhBLM-GST

3.1. Inducción de la expresión

Para la expresión de la proteína recombinante se emplearon células biológicamente competentes BL21 (DE3) pLysS de *E. coli*, las cuales se seleccionaron con el antibiótico cloranfenicol (Sigma). Un día después de realizarse la transformación de bacterias BL21 (DE3) pLysS con el plásmido pGEX-6P1-*Ehblm*, se tomó una colonia para inocular tubos de ensayo con 5 ml de medio LB, adicionándoles el antibiótico ampicilina (Sigma) 50 mg/ml y 34 mg/ml de cloranfenicol (Sigma) (una colonia por tubo). El cultivo se incubó a 250 rpm a 37° C hasta que alcanzó una DO de 0.5-0.7 a una longitud de onda de 595 nm. Antes de agregar el agente inductor (Isopropyl-D-thiogalactopyranoside, IPTG) se tomó una alícuota de 1000 µL la cual se empleó como el tiempo cero. Una vez logrado esto, se agregó IPTG a una concentración final de 1 mM y los tubos se incubaron nuevamente a 250 rpm a 37 ° C durante 3 horas. Una vez transcurrido este tiempo, los cultivos de bacterias inducidas (con IPTG) y sin inducir (sin IPTG) se colectaron en alícuotas de 1 ml, los cuales fueron centrifugados a 10000 rpm durante 6 min. a 4 °C. El sobrenadante se desechó y la pastilla se guardó a -20 °C hasta su utilización. Posteriormente se evidenció la expresión de la proteína recombinante (rEhBLM-GST) mediante un análisis electroforético (PAGE-SDS) y tinción con azul de Coomassie. También se inmunodetectó mediante ensayos de Western blot con anticuerpos anti-GST (marca Amersham) y anti-IgG de cabra acoplado a peroxidasa (Zymed).

Para la obtención de la proteína recombinante rEhBLM-GST en cantidades suficientes para realizar los ensayos funcionales se realizó un cultivo masivo de 250 ml, para esto se transformaron bacterias BL21 (DE3) pLysS con la construcción pGEX-6P1-*Ehblm*,

siguiendo la misma estrategia. Un día después, se inoculó una colonia en 5 ml de medio LB en tubos de ensaye con 50 mg/ml de ampicilina y 34 mg/ml de cloranfenicol y se incubó a 250 rpm durante toda la noche a 37 °C. Al día siguiente se tomaron 5 ml del precultivo crecido toda la noche para vaciarlo en 250 ml de medio 2TY (Tryptona 16 g, Extracto de levadura 10 g, NaCl 5 g pH 7.5) con la respectiva cantidad de los antibióticos (ampicilina y cloranfenicol). Se incubaron a 250 rpm a 37° C hasta que la DO alcanzó un valor que oscila entre 0.5 a 0.7 a una longitud de onda de 595 nm y se realizó la inducción con IPTG bajo condiciones similares. Al transcurrir las 3 h, el cultivo se colectó en tubos cónicos de 50 ml que se centrifugaron 15 min. a 10,000 rpm a 4 °C. El sobrenadante se desechó y las pastillas se guardaron a -20° C hasta su posterior utilización.

3.2. Cuantificación de proteínas por el método de Bradford.

Para determinar la cantidad de proteínas obtenidas se siguió el método de cuantificación descrito por Bradford (Ausubel *et al.*, 1994). Para esto, se realizó una curva patrón de la siguiente manera. En tubos Eppendorf de 1.5 ml de volumen se colocaron 0, 5, 10, 15 y 20 µL correspondiente a 0, 2.5, 5, 7.5 y 10 µg, respectivamente de albúmina sérica bovina (BSA) (Roche). A cada tubo se le agregó la cantidad necesaria de NaCl 150 mM para tener un volumen final de 100 µL. Luego se agregó 1 ml del reactivo de Bradford (50 mg de azul de Comassie G-50, 50 ml de etanol al 100%, 50 ml de ácido fosfórico al 85%). Los tubos se agitaron vigorosamente y se incubaron 3 min. a temperatura ambiente. Después, se determinó la absorbancia de las muestras a una longitud de onda de 595 nm, en la región visible del espectro electromagnético, utilizando un espectrofotómetro automático (Beckman DU 650). Los datos obtenidos se graficaron realizando la regresión lineal y obteniendo así los valores de la pendiente (m) y la ordenada al origen (b). Para medir la concentración de las proteínas de interés, se tomaron alícuotas de 1 y 2 µL de cada muestra y se siguió

la misma técnica. Los datos obtenidos se interpolaron empleando los valores de m y b en la curva patrón, determinando así la cantidad de proteína en cada muestra.

3.3 Análisis de la solubilidad de la proteína recombinante EhBLM-GST

El análisis de la solubilidad se realizó para determinar en que fracción celular se encontraba la proteína recombinante. Brevemente la biomasa de 50 ml de cultivo de extractos bacterianos inducidos durante 3 horas con IPTG, se resuspendió en 3 ml de PBS 1X frío (PBS 1X, 140 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 1.8 mM KH₂PO₄, pH 7.3) y se incubó con una mezcla que incluye: lisozima (1 mg/ml), inhibidores de proteasas (Complete Roche), DTT (5 mM) durante 15 min. a 4° C en agitación suave. Una vez transcurrido el tiempo, se sonicó en frío con un sonicador ultrasónico de punta *Vibra-Cell Sonics*^R con 10 pulsos de 10 segundos con descansos de 10 segundos, con amplitud de 60%. Posteriormente la mezcla se centrifugó a 8,000 rpm durante 45 min a 4 °C en un rotor Beckman JA-20. Al cabo de este tiempo se obtuvieron dos fracciones; la fracción soluble se transfirió a un tubo limpio y se le adicionó Tritón X-100 al 2 % con la intención de incrementar la solubilización de la proteína de fusión y se guardó a 4° C hasta su posterior utilización. La fracción insoluble fue disuelta en PBS 1X frío. Para el análisis electroforético y ensayo de Western blot, se tomaron alícuotas de 40 µl correspondientes a ambas fracciones y se les adicionaron 8 µL de buffer de muestra 5X.

3.4. Solubilización de la proteína recombinante EhBLM-GST en presencia de N-lauryl sarcosil

Una vez que se comprobó que la rEhBLM-GST se encontró en la fracción insoluble se procedió a descongelar la biomasa de 50 ml de cultivo de extractos bacterianos inducidos con IPTG, se resuspendieron en 3 ml de PBS 1X frío (PBS 1X, 140 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 1.8 mM KH₂PO₄, pH 7.3), una vez disueltos se trataron con una mezcla que incluyó: lisozima (1 mg/ml), inhibidores de proteasas

(Complete Roche), DTT (5 mM), N-lauryl sarcosil al 1.5% y DTT (5 mM), se permitió la interacción durante 30 min. a 4° C en agitación suave, posteriormente se sonicó en frío con un sonicador ultrasónico de punta *Vibra-Cell Sonics*^R con 10 pulsos de 10 segundos con descansos de 10 segundos, con amplitud de 60%. Finalmente la mezcla se centrifugó a 8,000 rpm durante 45 min a 4 °C en un rotor Beckman JA-20. Al cabo de este tiempo se obtuvieron 2 fracciones: la soluble y la insoluble. La fracción soluble se transfirió a un tubo limpio y se le adicionó Tritón X-100 al 2 % y se guardó a 4° C, la fracción insoluble fue disuelta en PBS 1X frío. Para el análisis electroforético se tomaron alícuotas de 40 µl de la fracción soluble e insoluble y se les adicionó 8 µL de amortiguador de muestra 5X, se separaron en un gel de poliacrilamida desnaturalizante. Además se realizaron ensayos de Western blot con anticuerpos α-GST.

Una vez que se comprobó que la proteína rEhBLM-GST se encontró en la fracción soluble se procedió a continuar con el protocolo de purificación.

3.5. Purificación de la proteína recombinante EhBLM-GST

Una vez que se identificó a la proteína rEhBLM-GST en la fracción soluble, se procedió a purificarla de acuerdo al manual de Glutathione Sepharose High Performance (Amersham) con el protocolo de purificación en *batch*.

Inicialmente se tomó un mililitro de la resina de glutatión sefarosa a la que se le retiró el exceso de etanol centrifugando a 500 g durante 5 min a 4 °C en una centrifuga eppendorf 5702R. El sobrenadante se eliminó y la resina se lavó con 5 mililitros de PBS 1X pH 7.4 frío por cada mililitro de resina. Este procedimiento se repitió en dos ocasiones. La fracción solubilizada de la proteína rEhBLM-GST se incubó durante 30 min. a 4 °C en agitación suave con la matriz de Glutathion-Sefarosa y entonces se procedió a separar la fracción no unida a la resina de glutatión centrifugando a 500 g durante 5 min. Seguido de esto se realizaron cuatro lavados de 5 ml cada uno con PBS 1X, el tubo se invirtió y se centrifugó a 500 g durante 5 min. a 4°C. Finalmente se

agregaron 0.5 ml de amortiguador de elución (HEPES 75 mM, NaCl 150 mM, Glutathion reducido reducido 10 mM, pH 8) y se permitió la interacción durante 10 min. a 4 °C. Se obtuvieron tres eluciones centrifugando a 500 g durante 5 min a 4 °C. La resina final se guardó a 4 °C. Para verificar la identidad de la proteína recombinante purificada, se tomaron alícuotas de 30 µL de cada una de las fracciones y se les añadieron 6 µL de amortiguador de muestra 5X para ser analizadas mediante SDS-PAGE (Laemmli, 1970) al 10% y la identidad se confirmó mediante ensayos de Western blot utilizando anticuerpos α -GST.

3.6. Electroforesis de proteínas por SDS-PAGE

Los diferentes extractos proteicos obtenidos durante los ensayos previos se analizaron por electroforesis en geles de poliacrilamida SDS-PAGE con el fin de comprobar su integridad. El gel separador se preparó con 4.017 ml de agua destilada, 2.5 ml de Tris-HCl 1.5 M pH 8.8, 0.100 ml de dodecil sulfato de sodio (SDS) al 10%, 3.33 ml de bis-acrilamida al 30% (29:1), El gel polimerizó al agregar 0.050 ml de persulfato de amonio (PSA) al 10% y 0.005 ml de N', N', N', N'- tetrametil-etilendiamina (TEMED). El gel concentrador al 4% se preparó con 3 ml de agua, 1.250 ml de Tris-HCl 0.5 M pH 6.8, 0.050 ml de SDS al 10%, 0.650 ml de bis-acrilamida al 30% (29:1), finalmente se agregó 0.025 ml de PSA al 10 % y 0.005 ml de TEMED en un volumen final de 5 ml. Los geles se prepararon en moldes de vidrio de 10 x 8.2 cm, con separadores de 1.5 mm. Una vez armado y sellado el molde, se vaciaron 9 ml de la solución del gel separador; después se adicionaron 2 ml de isopropanol para alinear la superficie del gel. Cuando el gel polimerizó (20 min.) se retiró el solvente y se agregó en el espacio restante la solución del gel concentrador e inmediatamente se colocó el peine, y se dejó polimerizar por 20 minutos. Posteriormente, el gel se montó en la cámara de electroforesis (Bio-Rad, Mini-Protean III System) y se le agregó como buffer de corrida una solución Tris-glicina-SDS (0.025 M, glicina 0.192 M, tris y SDS 1%). Las fracciones obtenidas se resuspendieron en 0.050 ml de buffer de muestra 5X

(20 ml de agua destilada, 5 ml de Tris-HCl 1.5 M pH 6.8, 4 ml de glicerol, 8 ml de SDS al 10 %, 0.2 ml de B-mercaptoetanol y 0.0195 g de azul de bromofenol), posteriormente se calentaron a 95 °C por 5 min. además se centrifugaron durante 1 min. a 10,000 rpm a 4 °C, evitando la formación de espuma con el detergente SDS, alterando así el volumen y provocando un error de medición; así las muestras se cargaron en el gel de poliacrilamida. La electroforesis se desarrollo en un tiempo de 1.5 horas a 100 voltios, hasta que el colorante llego al borde del gel. Para la determinación del tamaño de la proteína de interés se utilizaron marcadores de peso molecular preteñidos (Dual Color Bio-Rad).

3.7. Tinción de los geles de poliacrilamida con azul de Coomasie.

Para visualizar las proteínas separadas por electroforesis en los geles de poliacrilamida, estos se tiñeron durante 20 min. en una solución que contenía azul de Coomasie R-250 al 0.25% (USB) preparado en metanol al 45% y ácido acético al 10%. Después del tiempo de tinción y para poder observar claramente las bandas de proteínas, el gel se contrastó con una solución desteñidora (metanol al 30% y ácido acético al 10%) durante toda la noche en agitación ligera.

3.8. Ensayos de Western blot

Para confirmar la integridad de las proteínas, se realizaron duplicados de estos geles con la intención de inmunodetectar a la proteína de interés mediante Western blot (Ausubel *et al.*, 1994). Se realizó la electrotransferencia del gel, previamente preestabilizado en el amortiguador de transferencia (Tris 0.025 M, Glicina 0.192 M, Metanol 20 %) colocándolo en contacto con la membrana de nitrocelulosa (Bio-Rad). También se utilizaron otros componentes del montaje como fibra, papel Whatman de 3 mm y almohadillas de soporte, todo este dispositivo se sumergió en frío en una cámara de electrotransferencia y se desarrolló la transferencia y la inmovilización de las proteínas en la membrana de nitrocelulosa durante 1 hora a 400 mA

(Milliamperes) en el sistema Mini-Protean III (Bio-Rad). Para verificar la transferencia de las proteínas a la membrana, ésta se tiñó con una solución de Rojo de Ponceau [100 mg de Rojo de Ponceau (Sigma) y 1 ml de ácido acético en un volumen final de 100 ml]. Posteriormente la membrana se destiñó con buffer de transferencia y se bloqueó con leche descremada al 5 % en PBS 1X pH 7.4 (NaCl 137 mM, KCl 2.7 mM, Na₂HPO₄ 10 mM, KH₂PO₄ 2 mM, pH 7.4 con HCl) durante toda la noche a 4° C. Se lavó tres veces con PBS 1X durante 5 min. para eliminar el exceso de leche. Para la detección de la proteína rEhBLM-GST, la membrana se puso en contacto con el anticuerpo primario anti-GST (Amersham) en una dilución 1:8000 en PBS 1X y durante toda la noche a 4 °C en agitación constante. Un día después, se lavó de nuevo con PBS 1X pH 7.4 durante 5 min. Repitiéndose en tres ocasiones y posteriormente se agregó el anticuerpo secundario anti-IgG de cabra acoplado a peroxidasa (Zymed) en una dilución 1:2000 en PBS 1X por 1 h a temperatura ambiente en agitación. Por último, las membranas se lavaron tres veces con PBS y las bandas se visualizaron con el sustrato cromogénico Diamonobenzidina [0.5 mg de 3´3´-diaminobenzidina (Sigma), 12.5 ml de PBS 1X pH 7.4, 12 µL de H₂O₂ al 30 %], la reacción fue detenida lavando la membrana con agua destilada. Se tomó registro de lo que se observó en la membrana con el fotodocumentador de geles (Bio-Rad).

4. Preparación de las sondas de DNA

4.1. Marcaje de los oligonucleótidos

En este trabajo, utilizamos los oligonucleótidos de cadena sencilla 1 al 4 reportados previamente por Moghageh *et al.* (2001). Estos oligonucleótidos son complementarios en una región de aproximadamente 20 bases, por lo que su hibridación permite obtener sondas de DNA en forma de “X” e “Y” que reproducen una “Holliday junction” y una horquilla de replicación, respectivamente. Las secuencias de los oligonucleótidos se presentan a continuación:

Tabla 1. Secuencias de los oligonucleótidos de cadena sencilla empleados para realizar los ensayos funcionales

1	5'GACGCTGCCGAATTCTGGCTTGCTAGGACATCTTTGCCACGTTGACCCG3'
2	5'CGGGTCAACGTGGGCAAAGATGTCCTAGCAATGTAATCGTCTATGACGTC3'
3	5'GACGTCATAGACGATTACATTGCTAGGACATGCTGTCTAGAGACTATCGC3'
4	5' GCGATAGTCTCTAGACAGCATGTCCTAGCAAGCCAGAATTCGGCAGCGTC3'

Los oligonucleótidos 1 y 4 de cadena sencilla se marcaron en sus extremos 3' con 5 picoMoles End de biotina empleando el kit Biotin 3' end DNA labeling (Fisher Thermo Scientific)TM. Para realizar el marcaje, se permitió que todos los componentes se descongelaran, excepto la enzima Tdt, la cual se descongeló justo antes de usar. La enzima Tdt concentrada se diluyó en amortiguador de reacción 1X a una concentración final de 2U/ μ l. Esta se preparó en base al número de reacciones a realizar y la mezcla de marcaje se preparó de la siguiente manera: agua ultrapura 25 μ l, 5X Tdt, amortiguador 10 μ l, 5 μ l del oligonucleótido 1 y 4, Biotin-II-dUTP 5 μ l, Tdt diluida 5 μ l y el volumen se llevó a 50 μ L con agua de ampollita.

Se realizó la incubación a 37° C durante 30 min y se adicionaron 2.5 μ l de EDTA 0.2 M por reacción. Para la extracción de la enzima Tdt se adicionaron 50 μ l de cloroformo alcohol isoamilico (24:1) por reacción. Finalmente la mezcla se homogenizó y se centrifugó 2 min. a máxima velocidad, en una centrifuga Eppendorf 5702R. La fase acuosa se recuperó evitando tomar la parte del fondo (en caso de aspirarlo se centrifugó de nuevo) y este sobrenadante, que corresponde a los oligonucleótidos 1* y 4* marcados con biotina, se guardó a -20 °C hasta su posterior utilización.

4.2. Hibridación de los oligonucleótidos

Para la formación de la estructura en forma de “Y”, se procedió a realizar la hibridación, incubando 1.5 µg del oligonucleótido 4* marcado con biotina, con 4.5 µg del oligonucleótido 1 sin marcar, 6 µL del Buffer TM 10X (Tris HCl 100 mM pH 8, MgSO₄ 100 mM) agua para llevar a un volumen final de 60 µL. Mientras que para la formación de la estructura en forma de “X”, se colocaron 1.5 µg del oligonucleótido 1* marcado con biotina y 4.5 µg de cada uno de los oligonucleótidos 2, 3 y 4 sin marcar, amortiguador TM 10X (6 µL) y agua para un volumen final de 60 µL.

Las mezclas se colocaron a 95° C durante 5 min. Transcurrido el tiempo se permitió que se enfriaran a temperatura ambiente y finalmente las muestras correspondientes a las estructuras “X” e “Y” se almacenaron a -20° C, para su uso posterior.

Para verificar el marcaje y la correcta formación de las sondas, los oligonucleótidos y las estructuras se analizaron mediante electroforesis en un gel de poliacrilamida al 8% disuelto en TAE 1X (Tris-Acetato 40 mM, EDTA 1 mM pH 8) Al terminar la electroforesis, se realizó la transferencia a una membrana de DNA Hybond-N+ (Amersham) empleando la cámara de transferencia semiseca (Bio-Rad) y las membranas se revelaron utilizando el kit de detección de ácidos nucleicos por quimioluminiscencia Chemiluminescent Nucleic Acid detection module™ (Fisher Thermo Scientific).

4.3. Revelado del marcaje con biotina

Para realizar la detección de los oligonucleótidos biotinilados se empleó el kit de detección de ácidos nucleicos por quimioluminiscencia, Chemiluminescent Nucleic Acid detection module (Fisher Thermo Scientific)™. Antes de comenzar se permitió que el amortiguador de bloqueo y de lavado se descongelaran, colocándolos a 42 °C durante 5 min. A la membrana se le adicionaron 4 ml del amortiguador de bloqueo y se incubó durante 15 min en agitación suave, antes de concluir este tiempo se preparó la siguiente mezcla: solución de bloqueo con el conjugado “Stabilized

streptavidin/Horseradish" en una dilución 1: 300 y la membrana se incubó durante 15 min en agitación suave. Por otro lado se preparó la solución de lavado 1X diluyendo 20 ml de amortiguador de lavado en 60 ml de agua. La membrana se transfirió a un recipiente limpio, se lavó durante 5 min. en agitación suave con la solución de lavado 1X diluida y este procedimiento se repitió en cuatro ocasiones. La membrana se transfirió a un nuevo recipiente donde se incubó en 10 ml del amortiguador de equilibrio durante 5 min. en agitación suave. Posteriormente la membrana fue removida y se colocó sobre un papel absorbente para eliminar el exceso de amortiguador. Finalmente, se preparó la solución de trabajo "chemiluminescent substrate" adicionando partes iguales del reactivo de luminol y de la solución de peróxido, con esta mezcla se incubó la membrana durante 5 min sin agitación, en el cuarto oscuro. La membrana fue removida de la solución de trabajo y se colocó en una toalla de papel por 2 a 5 segundos, evitando la deshidratación. Finalmente la membrana se colocó en una bolsa de plástico limpio, se eliminaron las burbujas, y se colocó una placa autorradiográfica a diferentes tiempos de exposición.

4.4. Ensayo de retardamiento de la movilidad electroforética

Para la realización de los ensayos de retardamiento de la movilidad electroforética (EMSA por la siglas en inglés: Electrophoretic Mobility Shift Assay), las estructuras marcadas en forma de "X" e "Y" (2.8 ng) fueron incubadas a temperatura ambiente durante 15 min. con diferentes cantidades de la proteína rEhBLM-GST purificada (2.5, 2, 1.66, 1.19 y 0.95 ug), en presencia del amortiguador de unión (1 µg of poly [d(IC)] (Amersham), 10% glicerol en 12 mM, HEPES, pH 7.9, 60 mM KCl, 1 mM DTT, 1 mM EDTA, 4mM Tris-HCl, pH 7.9, 1 mM spermidine y 1 mM MgCl₂). Los complejos DNA-proteína fueron separados en geles de poliacrilamida no desnaturizante al 8% en presencia del amortiguador TAE 1X (Tris-Acetato 40 mM, EDTA 1 mM pH 8) a 100 V durante aproximadamente 2 hrs. Transcurrido el tiempo, el gel fue transferido a una membrana de nylon Hybond-N+ (Amersham), empleando la cámara de transferencia

semiseca (Bio-Rad) y los complejos DNA-proteína se identificaron con el kit Chemiluminescent Nucleic Acid detection module™ (Fisher Thermo Scientific)

1. Análisis *in silico* de la secuencia aminoacídica de la proteína EhBLM

Inicialmente el gen *Ehblm* se localizó en el “scaffold” 00192, en el locus 192.m00073 en el genoma de *E. histolytica* reportado en la página www.tigr.org. Actualmente, el gen *Ehblm* se localiza en el locus EHI_028890, con clave de acceso XM_645822 para la secuencia nucleotídica y XP_650914 para la secuencia aminoacídica en la nueva anotación del genoma de *E. histolytica* en la página www.pathema.tigr.org en las coordenadas 25785 al 22237 nucleótidos. El gen que codifica para la proteína EhBLM posee una longitud de 3549 pb, la longitud de la proteína predicha es de 1182 aminoácidos con un peso molecular de 137.5 kDa, y un punto isoeléctrico (pI) de 5.32. Con la secuencia de la proteína EhBLM se realizó una búsqueda de secuencias similares en las bases de datos existentes, usando el programa BLAST de ExPASy Proteomics Server (www.expasy.org) para conocer el valor de *e* (expect value, en inglés) y el porcentaje de homología e identidad de la proteína EhBLM con respecto a otras similares presentes en otros organismos. El valor de *e* representa la probabilidad de que la secuencia completa de la proteína EhBLM se parezca o no a otra proteína por azar, es decir, el programa compara cada uno de los aminoácidos de dichas proteínas y da la probabilidad de error entre las secuencias.

El valor de *e* indicó que la proteína EhBLM presenta mayor identidad y similitud con las DNA helicasas de eucariontes como *A. thaliana* (37 y 53% respectivamente), *S. cerevisiae* (40 y 60% respectivamente), y *H. sapiens* (37 y 53% respectivamente). Además se observó que la proteína EhBLM también presentó similitud con DNA helicasas de algunos protozoarios obteniendo para la proteína de *T. cruzi* un valor de *e* de $7e^{-94}$ (39 y 57% respectivamente) y para la proteína de *L. major* un valor de *e* de $5e^{-87}$. (37 y 55% respectivamente) (Tabla 2).

Tabla 2. Identificación de proteínas homologas a la proteína EhBLM con el programa BLAST

Organismo	Proteína	Número de acceso ^a	AA's	Valor e	% I	% S	% G
<i>A. thaliana</i>	DNA-helicasa	Q9FT70	1150	e-124	37	53	8
<i>S. cerevisiae</i>	DNA helicasa D-ATP SGS1	P35187	1447	e-119	40	60	3
<i>D.melanogaster</i>	P. homologa Síndrome Bloom	Q9VGI8	1487	e-111	36	54	4
<i>D. dyscoideum</i>	DNA helicasa D-ATP	Q54DM3	1259	e-122	36	54	5
<i>Mus musculus</i>	P. homologa Síndrome Bloom	O88700	1416	e-108	37	53	5
<i>Homo sapiens</i>	P. homologa Síndrome Bloom	P54132	1417	e-108	37	53	5
<i>Gallus gallus</i>	P. homologa Síndrome Bloom	Q9I920	1142	e-107	38	52	6
<i>C. elegans</i>	P. homologa Síndrome Bloom	X9DEY9	1364	e-104	36	52	5
<i>Xenopus laevis</i>	P. homologa Síndrome Bloom	O18017	988	2e-96	38	56	4
<i>B. rerio</i>	Zgc:110631	Q498Z7	639	3e-94	39	58	2
<i>L. major</i>	DNA helicasa D-ATP	Q4QAH8	1691	5e-87	37	55	9
<i>T.a cruzi</i>	DNA helicasa D-ATP	Q4CV25	1451	7e-94	39	57	5
<i>T. vaginalis</i>	DNA helicasa D-ATP	A2DZA7	1081	1e-99	35	52	6
<i>C. glabrata</i>	DNA helicasa	Q6FLV3	1371	e-114	35	53	8
<i>Escherichia coli</i>	DNA helicasa D-ATP	Q8X8NI	611	2e-81	38	59	4

^aSwiss Prot/TrEMBL, excepto NCBI, AA's: aminoácidos; H: homología; S: similitud; G: gaps

Por otro lado, al realizar el BLAST se identificaron otras dos DNA helicasas en el genoma de *E. histolytica* en los loci EHI_119290 y EHI_023090, con números de acceso XP_650264 (774 aa) y XM_645172 (2325 nucleótidos) para la primera, y XP_653505 (509 aa) y XM_648413 (1530 nucleótidos) para la segunda. La proteína EhBLM comparte 40-47 % de identidad con estas proteínas con valores de e de e^{-105} y $2e^{-79}$, respectivamente.

Además se encontró que la proteína XP_650264 presenta una mayor similitud con la RecQ1 de humano (47% identidad, valor de e de e^{-105}) mientras que la proteína XP_653505 es más parecida a la proteína RECQ5 de humano (40% identidad, valor de e de $2e^{-79}$). De acuerdo a esta evidencia se decidió nombrarlas como las proteínas EhRecQ1 y EhRecQ5, respectivamente.

Al realizar un alineamiento múltiple entre las tres DNA helicasas de *E. histolytica* (EhBLM, EhRecQ1 y EhRecQ5) con el programa ClustalW, se observó que presentan la secuencia característica de los motivos 0-VIII que conforman el dominio conservado de helicasa (Figura 7).

EhBLM	MGETITNLEELNEVRKEQMKYQKNRMRGYGEKVRKQGIRYIIGKMKIGIMEEFIEENKK	60	
EhRecQ1	MSRDDVQEIIDLVIDDDYCDNFEIEKRYSVEEEK-----ENSNQSI	45	
EhRecQ5	-----		
EhBLM	RTEDIIRKMEMIGCKKKEKKEKKEKMKMNKNALLIEQVIQTTDIEEIKDKKEIKDKE	120	
EhRecQ1	NTFNTLHSFGLKKVSPFETEEKEELQNEINNCSDAECMSNNIISCNTQKIDLNNPSSEHT	105	
EhRecQ5	-----		
EhBLM	EIKDKKEIKDKEEIGKESIEISDEFLEQIILGEKEEREQHNTYENIDMNEELEDIKMDEEV	180	
EhRecQ1	PLNSKD-----LLIEDTKRSIQKTKTPPKLQSLIDDFIKPKNSFEPQRTKTLLEK	156	
EhRecQ5	-----		
EhBLM	KENKPNKEIEVEEIEEMSEENKNEEDIKISLMEINEEEKDMINLVSEEKLI FEGTEQKE	240	
EhRecQ1	KTKTISDVFEEEMERASSQILLRTDTLPKSHSPISKRISSDFFTLMFKSNLTLESQEDNT	216	
EhRecQ5	-----		
EhBLM	QEVISIEDEIGSVVEEILEKMEEEEKEREKEIKELEGGDEQKEIEMLEQDEMFKYLSQRGK	300	
EhRecQ1	DATKKTSSLIDLCENDPIIENINEDNPYQKVFSESDKRLLIEREQ-----	263	
EhRecQ5	-----		
EhBLM	EELHIKGYLQKRIELIEKIEKDIIEGKDQEKDEKVEKKNKENEEMRKIELIKKGKYY	360	
EhRecQ1	-----ELTKQLKEIKVSDETFQIRKIAFEREEVRIQLKVITSRET	304	
EhRecQ5	-----		
EhBLM	QEENNSKEEIEKEENNNNNKGEVIEEIKYKEISEGGKYVWKLGEFLKRNPGAQKYKE	420	
EhRecQ1	TQKGN-----TTIRLKENDKVGRITLWKNHEAKKGFEPFKIEEQ	343	
EhRecQ5	-----MF	2	
EhBLM	KKDIRVNGIKKFFASIDSDWEKQFSWKENIKKCNNTVFGNLSFRPSQEAIIINCVMRSRNA	480	
EhRecQ1	IPDVVQSTNIRSYPIWTNWWGENFHWKERVKEVHKVFHHTLRLLQYPVINAILAGHNV	403	0
EhRecQ5	KPLFAQKPIKTKTISIER-----YEQRIDETHKCFNICFRPQQRBIILSTLQHKDT	54	
	. . . : . * : . * : . *		
EhBLM	LVLMPTGGGKSLCYQLPSYFIKIGITLVVSPVLSLQDQVSNLVETGMEIAIFYSGSSSED	540	
EhRecQ1	LA LMPTGGGKSLCYQLPSLFDIGYTLVVSPLISLQDQVKALNDLGIPAITCNS-NNPEN	462	Ia
EhRecQ5	LVLMPTGGGKSLCFQLQPVLTERTITIVISPLIALQONQVDGLNKRGITSFILNSTLSKSE	114	
	* * * * *		
EhBLM	AKQFYKESYQKEGKCTIKFVFTPERITQSKSPKEALNRYEENNFQMVVIDEAHCISQW	600	
EhRecQ1	IDIFINDIETR----KIKIVYVAPELLSCSWKMNEAMKKLYDRGLFSYLVVIDEAHCISQW	518	II
EhRecQ5	ATKVLSILNSSNP--ELYLLYVTEPQIKTQR-FQNIKKLYSIKKLGMFAVDEAHCSQW	171	
	. . . : : : : :		
EhBLM	GHDFRDSYQKLSVFSQYEPGIPILMLTATATERVKNNDILLSLGINEAVVFSQSFNRKNLT	660	
EhRecQ1	GHDFRQSYVELREFRKTFPVQTIIFATATERVKNNDILLSM-LEEIVFNQTFNRPNLR	577	III
EhRecQ5	GHDFRPSYLELSYLKTYDPIPIIALTATATSQVKEDIKSLELKNPQIFTSFDRPNY	231	
	***** * . * . . . : : : :		
EhBLM	YCVRPKTK-GVIDEIEEMIKRKYKQSGIYCLSQKNMDIAQELNKRGIKSKYYHAGMD	719	
EhRecQ1	YETRVKSP-KVEVDIAHYIQQHPN-QGIVFCLSKKDCESLSKFLINYGIRATHYHAGLD	635	IV
EhRecQ5	FKVIYKDLYETPIQILTQILHQHEKEGIIYCTRMECELEIKYISTNGYPVAKYHAGMK	291	
	: . * . . : * : : :		
EhBLM	TKERTTVQKEWCDGEFVVICATIAFGMGIDKPDVRFVIHHSPLKSLGYYQESGRAGRDC	779	
EhRecQ1	AKRRKVKQNDWMNGTFVVCATVAFGMGIDKPDVRFVIHQTMPSSEIEQYFQESGRAGRDC	695	VI
EhRecQ5	SEERETIQKKWESGEVIVVVAIFAFMGIDRQDVRVFIHWNIPKTIIEGFMQEA GRAGRDC	351	
	:: . * . . : * : : :		
EhBLM	EPADCILYNYRDKYTYERFFEKDKENNGDLSHIQTARNNLNEVISYCENTVDCRRTLVL	839	
EhRecQ1	KPSDCIIYFSMKDIARVEWLKRDGMKNELTASQQQSINAMVNLCTIT-----SECRRKIQL	750	
EhRecQ5	KPAESIILFSNDDFEREVALNQTSEIIRELCVECS-----CRRKCLL	394	
	: * . . . : . * . . . : : :		

```

EhBLM      QYFGEVFNskLCNRTCDNcYNpSPTEVIDMTELGKIAVEIVRAHQRI TANMVIGIMRGTS 899
EhRecQ1    MYFDESFNEEKCTG-CDNCERKKK----- 773
EhRecQ5    KYFGETTFKP-NKRCCDLCNENTR-----VKDDLEKLRMLRIKKNTIRVKHPTP 442
          **. * . . . ** * . .

EhBLM      TMGKKFGETSKGFksAKGKTEQVMERFMKVMYLEKVLSEMLI INSHGSISVYLKEGPKCK 959
EhRecQ1    -----
EhRecQ5    KRSPNGSQCSG-----FTLASKISNQNSSSQFTTASQMLEEQKKKE 483

EhBLM      ELMEGKIKIKVKCKGANQIVEINNGIKMSEYQNSLMDKLNELRDQIFEEVRKQPGKEQL 1019
EhRecQ1    -----
EhRecQ5    DLKPKKNKTNDShSKITDFFQVkke----- 509

EhBLM      LKHNLFGTRVLKKIAAVMPRNKQEFEQIAMKRLlKEKYAERFISVvNNFINQHSSNSLNT 1079
EhRecQ1    -----
EhRecQ5    -----

EhBLM      SSFNPIKRTNPIKvDFNRKSGIRDNSDESIFDGIDLDEFADDDNATSDNNLEMTNPTIPS 1139
EhRecQ1    -----
EhRecQ5    -----

EhBLM      KKSIIKSSKKSIIKKSIIKKSIIKKSIIKASKKSTNSSSNGIQPML 1182
EhRecQ1    -----
EhRecQ5    -----

```

Figura 7. Comparación de las tres DNA helicasas de las proteínas de la familia RecQ de *E. histolytica* mediante el programa ClustalW (www.ExPASy.org). Los motivos del dominio de helicasa están marcados como: 0, I, Ia, II, III, IV, V y VI. Los números a la derecha indican la posición de los aminoácidos en relación a la primera metionina en cada proteína. Las estrellas indican los aminoácidos idénticos en la misma posición, mientras que los puntos se refieren a los aminoácidos homólogos.

Al realizar un alineamiento múltiple con el programa ClustalW de las tres proteínas de *E. histolytica* con DNA helicasas RecQ de diversos organismos, encontramos que todas poseen el dominio de helicasa con los siete motivos conservados típicos de las DNA helicasas RecQ: 0: LxxxFGxxxFRxxQ, I: PTGGGKSL, Ia: V^V/I^SSPL^V/I^S/A^LI^M, II: DEAH^C, III: TATA, IV: G^I/V^Y/F^C^L/S^S/T, V: V^I/V^C/VAT^I/VAFGMGIN^K/R, y VI: GRAGR^DGE/K). Además poseen el motivo 0 (NNTVFGNDSFRPSQ) (Figura 8).

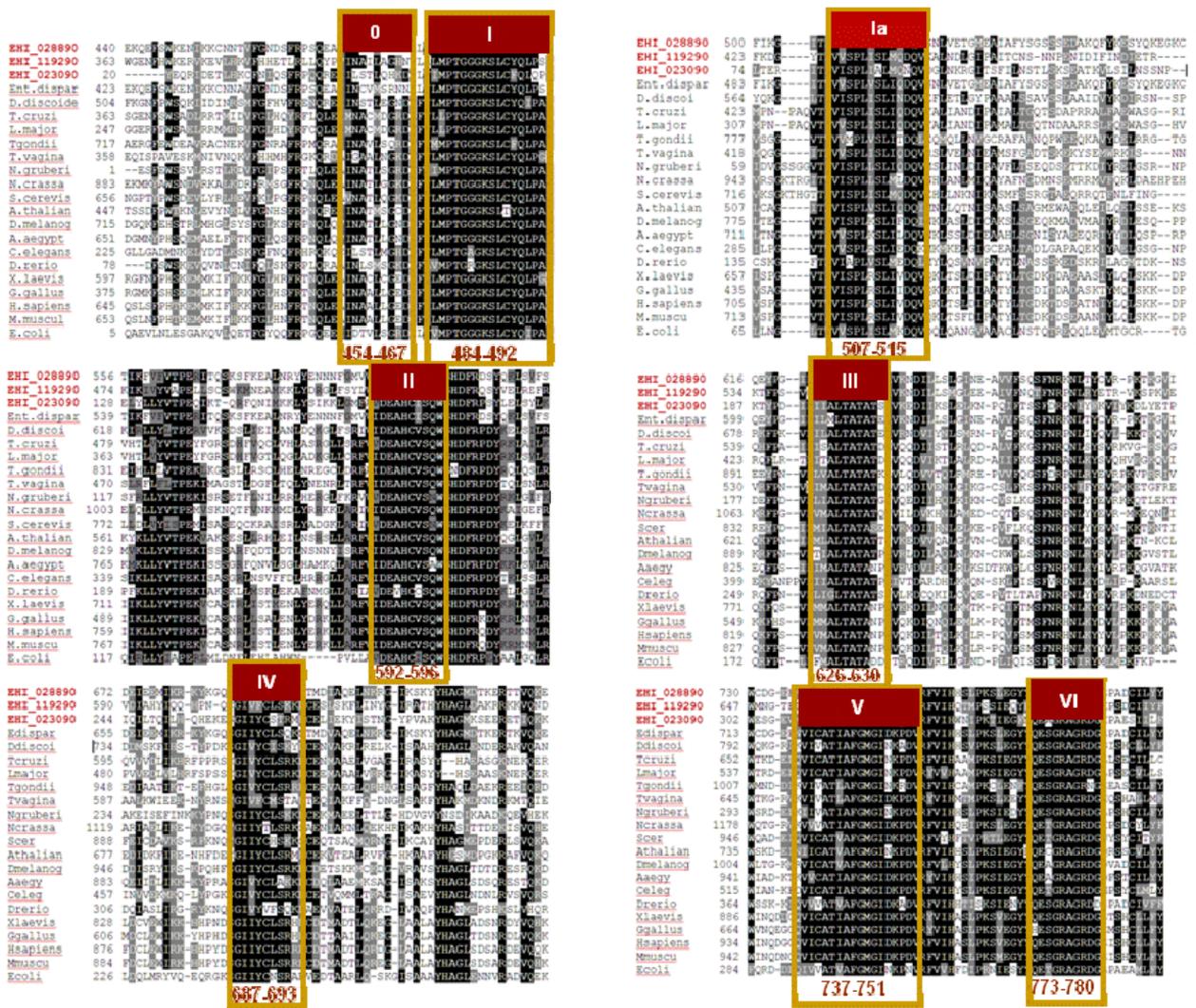


Figura 8. Alineamiento múltiple con el programa ClustalW (www.embl.ebi.org) de las tres proteínas de *E. histolytica* con DNA helicasas RecQ de diversos organismos

Los programas Prosite, ProScan y Pfam también identificaron al dominio RecQ-Ct en las tres proteínas de *E. histolytica*, mientras que el dominio HRDC sólo está presente en la proteína BLM (Figura 9).

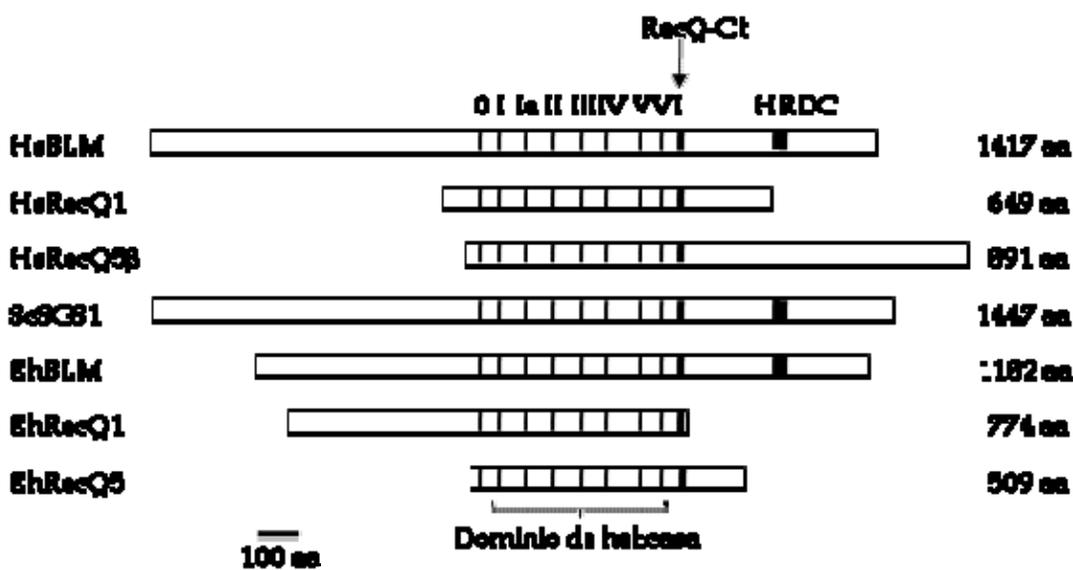


Figura 9. Representación esquemática de las DNA helicasas RecQ de humano, levadura y *E. histolytica*.

Al realizar el análisis filogenético utilizando el dominio de DNA helicasa de diversos organismos, se encontró que las tres proteínas de *E. histolytica* (EhBLM, EhRecQ1 y EhRecQ5) se encuentran muy emparentadas con la DNA helicasa de la ameba de vida libre *D. dyscoideum*, del parásito protozoario *T. vaginalis*, del hongo *C. glabrata* y de la levadura *S. cerevisiae*. Por otra parte tiene una relación un poco más lejana con proteínas homólogas de insectos (*D. melanogaster*), peces (*B. rerio*) y mamíferos (*B. taurus*). De manera extraña, la proteína homóloga del protozoario *T. cruzi* está en una rama diferente, así como con proteínas de parásitos (RecQ de *T. vaginalis*), peces (RecQ de *B. rerio*) y mamíferos (RecQ de *Bos taurus*) (Figura 10).

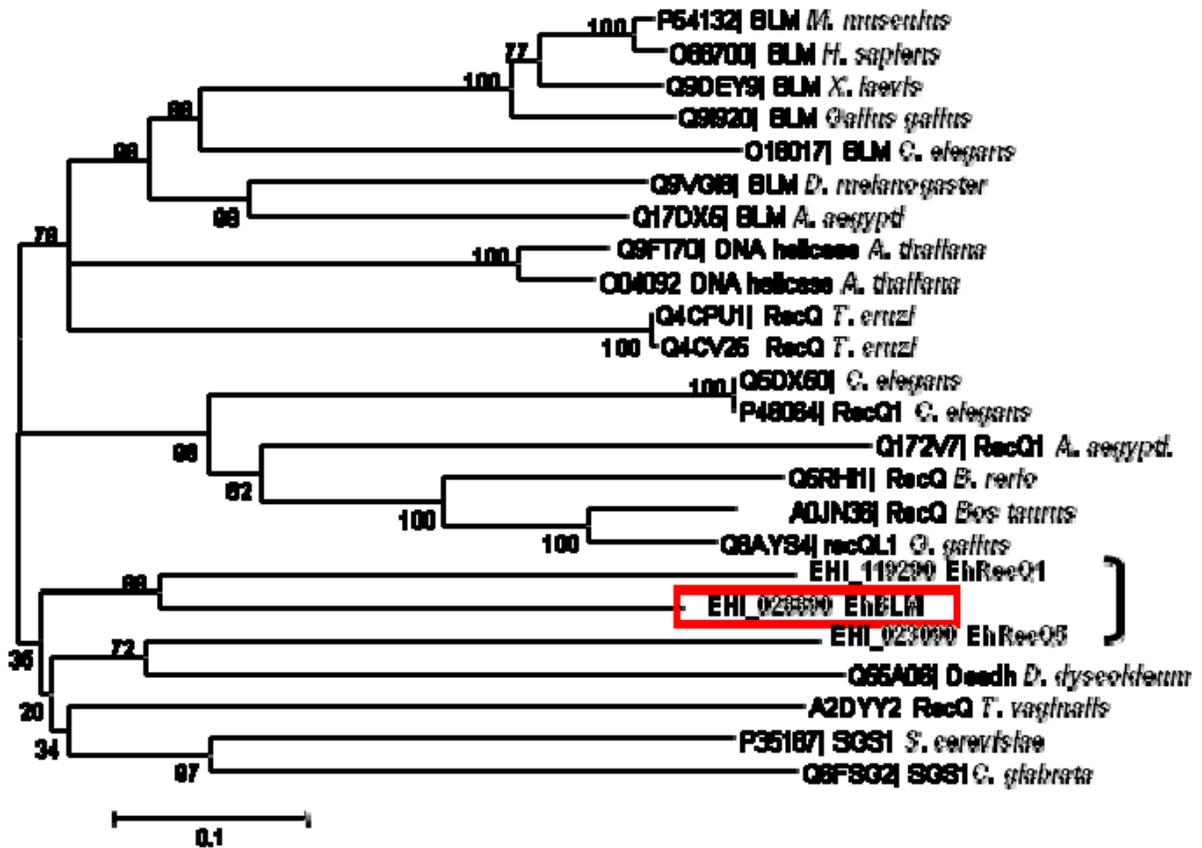


Figura 10. Árbol filogenético del dominio de DNA helicasa de las proteínas de la familia RecQ de diferentes especies, la escala esta indicada abajo. La EhBLM esta en un recuadro; las tres proteínas de *E. histolytica* están indicadas entre corchetes. Los números representan el grado de parentesco entre las proteínas de los diferentes organismos.

Para conocer la predicción de la estructura secundaria de la proteína EhBLM, la secuencia aminoacídica se sometió al servidor de proteínas PsiPred, en la página (www.psipred.org). Se encontró conformada por 43% de hélices α , y 14% de hojas β plegadas. Toda la secuencia incluyendo los dominios funcionales, se encuentran conectados por 75 “loops” (Figura 11).

Para realizar la predicción de la estructura tridimensional de la proteína EhBLM, la secuencia aminoacídica se sometió al servidor de modelaje comparativo automático de proteínas 3D-JIGSAW en la página www.bmm.cancerresearchuk.org/~3djigsaw. El programa realizó la búsqueda y alineamiento con secuencias de proteínas contenidas en su base de datos. Estos servidores seleccionaron como templatado la estructura cristalográfica de la región catalítica de la hidrolasa de *E. coli* (número PDB: 1oywA) que posee 523 aa's (Bernstein, 2003) la cual pertenece a la familia de helicasas RecQ. En la figura 12 se muestra la estructura modelada de la proteína EhBLM por el servidor empleado. La sección correspondiente al motivo funcional de helicasa, localizado en la parte central, se distingue por presentar en cada uno de los dominios conservados 6 hojas β , los cuales están conectados por 6 "loops" y 3 hélices α .

Para validar la eficiencia del modelo generado por homología se emplearon dos parámetros: el porcentaje de identidad de la secuencia y el valor de RMSD. En el modelado por homología se genera una estructura tridimensional a partir de un molde que tiene un porcentaje de identidad con la secuencia problema mayor al 30 % lo que predice que el plegamiento de la proteína blanco es similar al templatado. Esta similitud se puede calcular mediante el RMSD ("Root Mean Square Deviation", por sus siglas en inglés). Para ello se realizó una superposición de la proteína modelada con la estructura del templatado la cual debe estar dentro de un intervalo de 1 a 1.5 Å (ángstroms) (Baker y Sali, 2001; Vitkup *et al.*, 2001; Cothia y Lesk, 1986). La estructura de la proteína EhBLM (blanco) comparte con la proteína 1oywA (templatado) el 39 % de identidad en la superposición de 449 residuos, con esto se obtiene un valor de RMSD de 0.23 Ångstroms, esto indica en general que las posiciones atómicas no varían mucho de manera significativa con respecto al templatado. Al realizar el modelado empleando el servidor 3D-JiGSaw el programa inició en el residuo Isoleucina 450 y terminó en Arginina 885

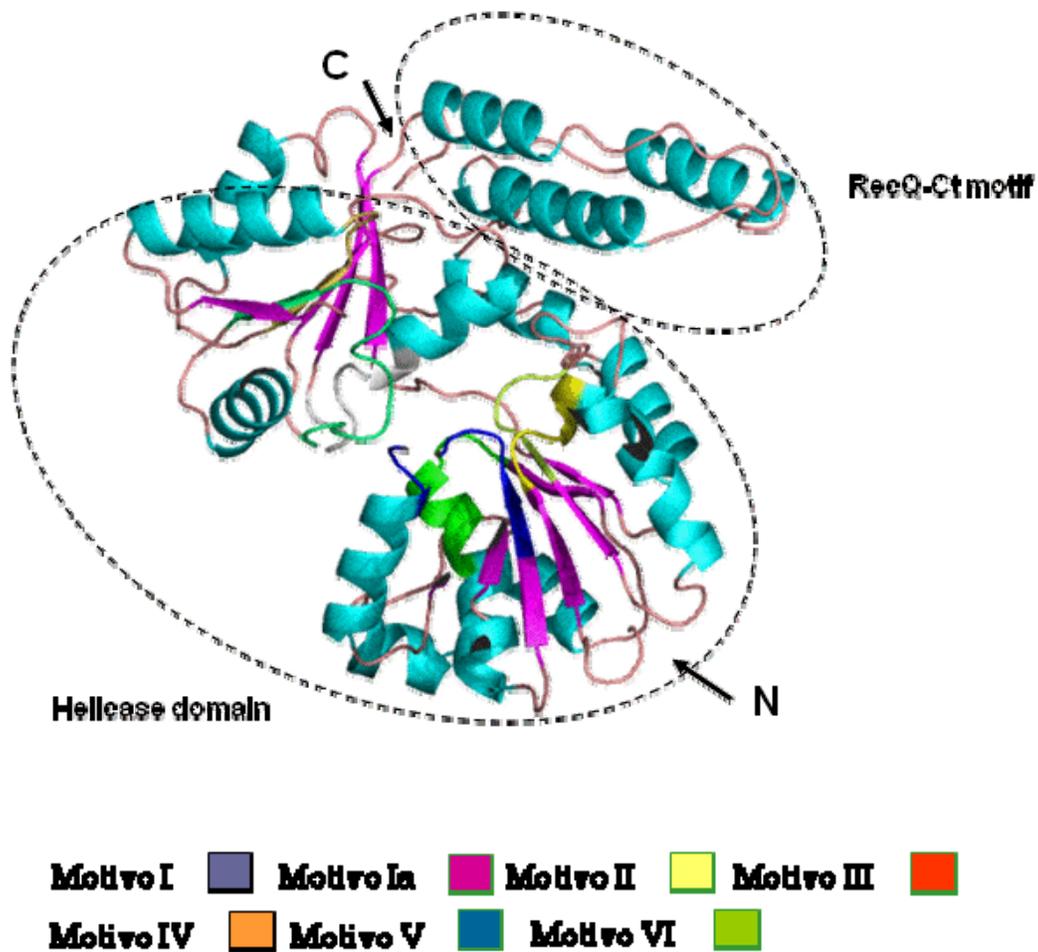


Figura 12. Predicción de la estructura tridimensional de la proteína EhBLM de *E. histolytica* obtenida a partir de los datos del cristal de la región catalítica de la hidrolasa de *E. coli* con número de acceso 1oywA.

2. Subclonación de la secuencia genómica correspondiente al dominio de helicasa de EhBLM

Después de hacer varios intentos de expresión de la proteína recombinante a partir del vector pRSET-A-*Ehblm* sin tener éxito, se decidió subclonar el dominio de helicasa en otro vector de expresión, el pGEX-6P1 (GE-Healthcare).

El dominio de helicasa de la proteína EhBLM se amplificó por PCR a partir de la construcción pRSET-*Ehblm*, donde se había previamente clonado. El producto obtenido tuvo el tamaño esperado de 1464 pb (figura 13A carril 3). Como control obtuvimos amplificación de la misma banda de 1464 pb a partir de DNA genómico (carril 2), mientras que en ausencia de DNA no observamos amplificación (carril 1). Se incluyó un control adicional utilizando oligonucleótidos específicos que amplificaron un fragmento de 173 pb correspondiente al DNA ribosomal (carril 4). El producto de PCR se purificó por el método de Gel Extraction Quiaquick (Quiagen) y se realizó la restricción enzimática con las enzimas *Bam*HI y *Xho*I. Por otro lado se linearizó el vector de expresión pGEX-6P1 con las mismas enzimas. Al comparar la intensidad de las bandas del vector de 4.9 kb (figura 13B, carriles 1 y 2) y del fragmento de PCR (carriles 3 y 4) con los marcadores de tamaño molecular de 100 pb (M) y λ HindIII (λ) en el gel de agarosa, se decidió realizar la ligación utilizando 30 μ L del fragmento de PCR y 20 μ L del vector pGEX-6P1.

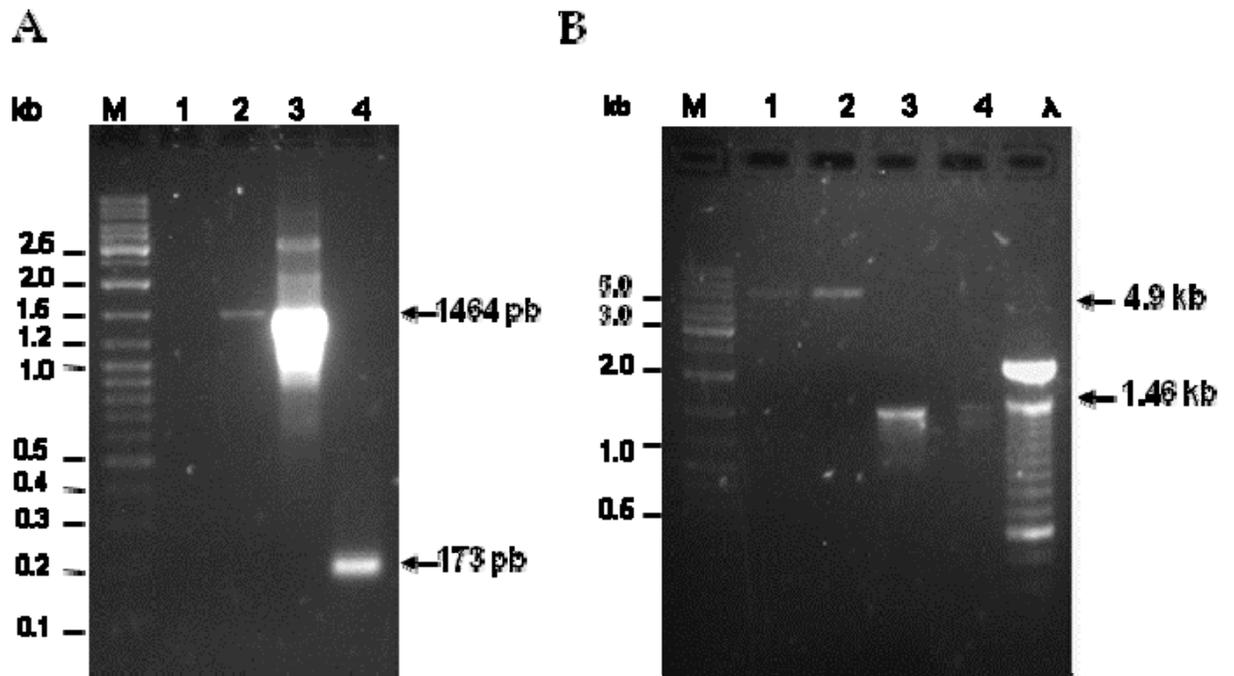


Figura 13 A). Amplificación por PCR del dominio de helicasa de la proteína EhBLM: M: marcadores de tamaño molecular 100 pb; 1. control negativo (sin DNA) 2. DNA genómico Clona A; 3. PRSET-Ehblm 4. Control positivo (amplificación de un fragmento de DNA ribosomal).

B) Linearización del vector pGEX-6P1 y cuantificación, M: marcador de tamaño molecular de 100 pb y λ marcador molecular λ HindIII, 1-2: linearización del vector pGEX-6P1 con las enzimas BamHI y Xho I, 3-4: dominio de helicasa de EhBLM (BamHI y XhoI por μ l del producto de PCR).

La mezcla de ligación se utilizó para transformar bacterias *E. coli* (cepa DH5 α) que crecieron toda la noche a 37 °C. Después de obtener el DNA plasmídico de las clonas candidatas, se realizó una restricción enzimática con las enzimas *Bam*HI y *Xho*I durante 3 horas a 37 °C, para verificar la positividad de las clonas. En la figura 14 se pueden observar dos clonas que liberaron el fragmento esperado de 1.46 kb (carriles 1 y 2). Como control positivo se empleó el producto de PCR a partir de la construcción pRSET-EhBLM (carril 3). Se seleccionó una clona positiva para secuenciarla y así confirmar la identidad del fragmento clonado (figura 15).

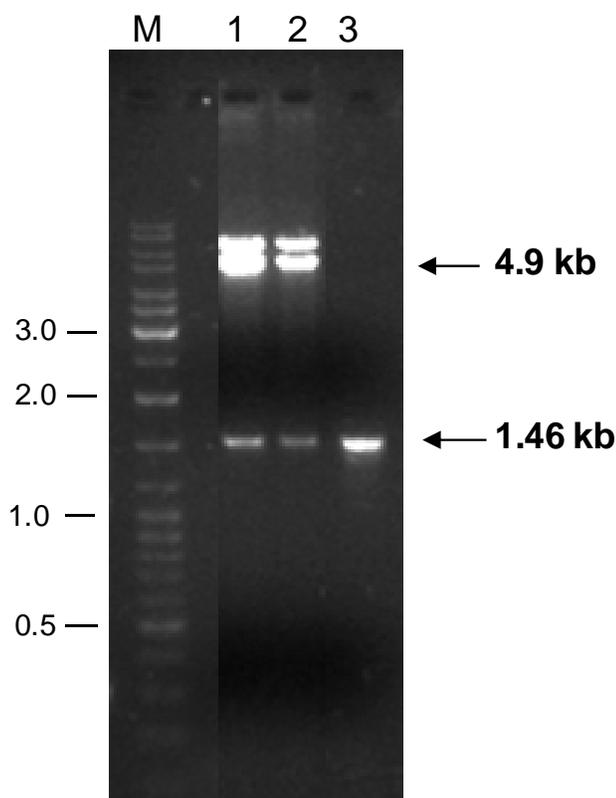


Figura 14. Análisis de las clonas positivas. M: marcador de tamaño molecular 100 pb, 1-2: clonas positivas, 3: control positivo (producto de PCR a partir de pRSET-EhBLM).

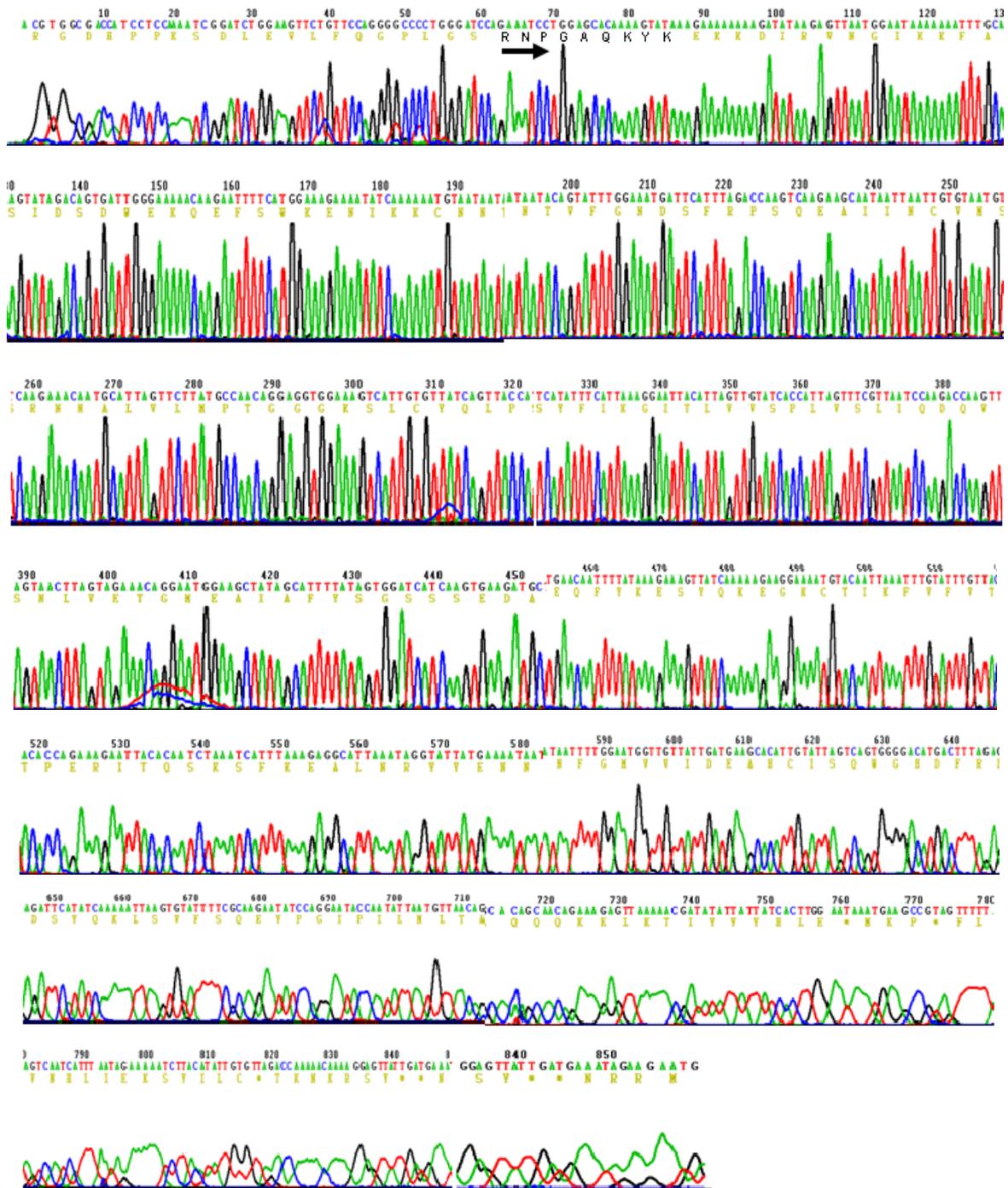


Figura 15. Electroferograma de la secuencia de nucleótidos contenida en la construcción pGEX-Ehblm.

3. Expresión del dominio de helicasa de la proteína rEhBLM-GST

Una vez confirmada la subclonación del gen *Ehblm* en el vector p GEX-6P1, se procedió a transformar bacterias *E. coli* (cepa BL21 (DE3) pLys S) con el plásmido pGEX-6P1-*Ehblm* para inducir la expresión del dominio de helicasa de la proteína EhBLM, que llamaremos rEhBLM-GST, con IPTG. Las proteínas bacterianas totales se analizaron por SDS-PAGE y tinción con azul de Coomassie (figura 16). La secuencia de nucleótidos clonada codifica para un polipéptido de 488 aminoácidos con un peso molecular de 55.85 kDa. Con la adición de la etiqueta GST del vector pGEX (25 kDa), se obtiene una proteína de fusión de aproximadamente 80 kDa. En extractos de bacterias inducidas (carril 2), se observa la sobreexpresión de una proteína, la cual no aparece en el control de proteínas totales de bacterias sin inducir (carril 1). Esta proteína parece presentar una migración electroforética aberrante, ya que migra como una proteína de 70-72 kDa mientras que el peso esperado es de 80 kDa.

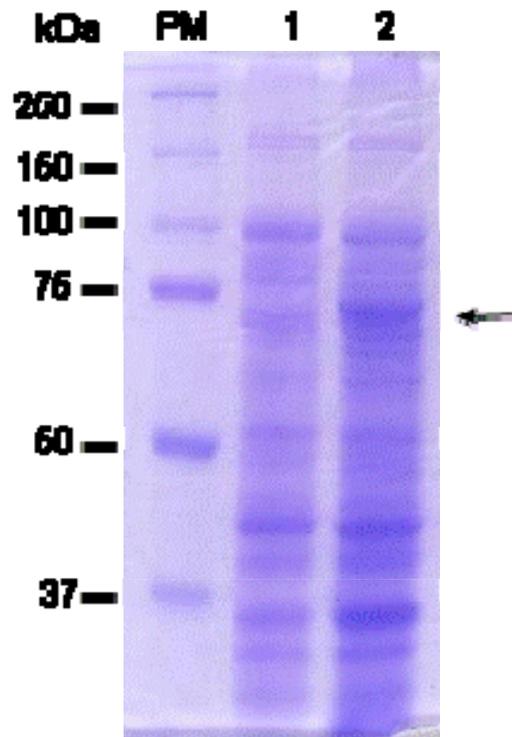


Figura 16. SDS-PAGE teñido con azul de Coomassie mostrando la expresión de la proteína rEhBLM-GST; PM: marcador de peso molecular (Dual color Bio-Rad), 1: extractos proteicos de bacterias transformadas sin inducir, 2: extractos proteicos de bacterias transformadas e inducidas con IPTG. La flecha señala la posición de la proteína inducida.

Para comprobar la identidad de la proteína expresada, se realizó un ensayo de Western blot utilizando como anticuerpo primario un anti-GST (Figura 17). Los resultados muestran que al utilizar extractos proteicos de bacterias transformadas sin inducir como control negativo no se reconoció ninguna banda (carril 1), mientras que al utilizar extractos bacterianos inducidos con IPTG, los anticuerpos reconocieron una banda (carril 2) que corresponde a la identificación de una proteína con un peso de 70-72 kDa, confirmando que se trata de la proteína recombinante sobreexpresada.

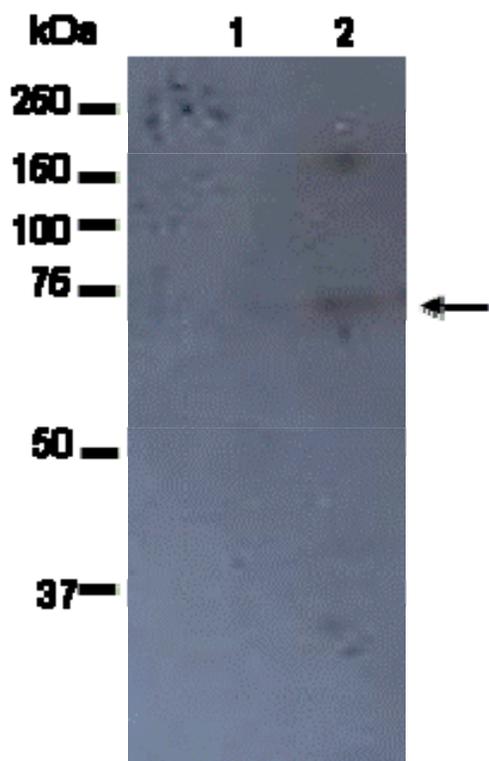


Figura 17. Inmunodetección de la proteína rEhBLM-GST; 1, extractos de bacterias transformadas sin inducir; 2, extractos de bacterias transformadas inducidas con IPTG. Se empleó un anticuerpo 1° anti-GST 1:8000 y anticuerpo 2° Anti IgG de cabra HRP 1:2000. Se reveló por ECL.

4. Análisis de la solubilidad de la proteína rEhBLM-GST

Se analizó la solubilidad de la proteína rEhBLM-GST con el fin de comprobar si se localizaba en la fracción soluble o en la insoluble para posteriormente purificarla (Figura 18). El resultado del ensayo de SDS- PAGE evidenció que la proteína está presente mayoritariamente en la fracción insoluble (carril 6) en comparación con la soluble (carril 5).

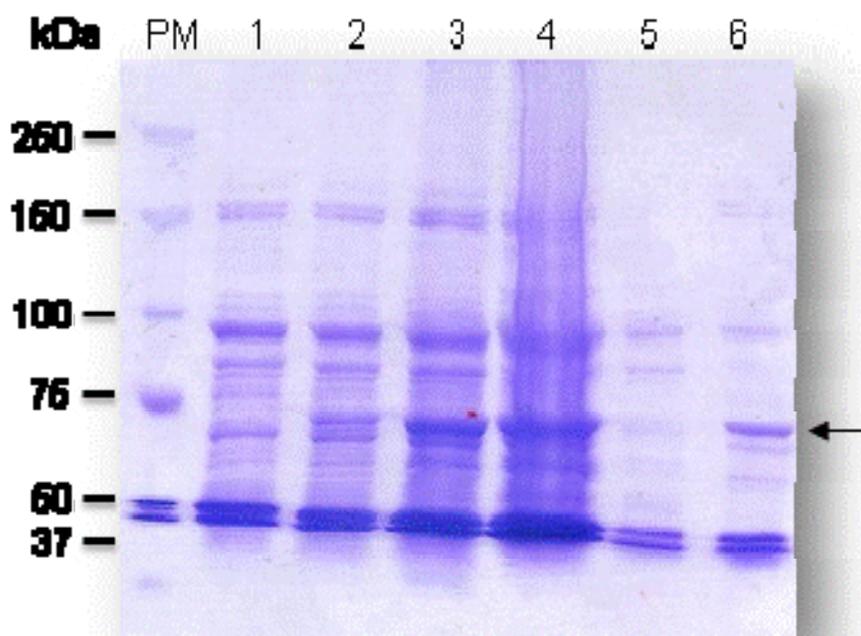


Figura 18. Análisis de la solubilidad de la proteína rEhBLM-GST por SDS-PAGE teñido con azul de Coomassie, PM: marcador de peso molecular (Dual color Bio-Rad), 1: extractos de bacterias transformadas sin inducir, 2-4: extractos de bacterias transformadas e inducidas con IPTG, 5: fracción soluble o sobrenadante, 6: fracción insoluble o pastilla. Con una flecha se indica la proteína de interés.

5. Análisis de la solubilización de la proteína rEhBLM-GST en presencia de N-lauryl sarcosyl

Debido a que la proteína rEhBLM-GST se localizó en la fracción insoluble se decidió tratar a la pastilla con N-lauryl sarcosyl con el fin de permeabilizar a los cuerpos de inclusión y permitir de esta manera la solubilización de la proteína recombinante para posteriormente purificarla (figura 19). El resultado del ensayo de SDS-PAGE evidenció que la proteína está presente en la fracción soluble (carril 1), aun si todavía queda una cierta cantidad en la la fracción insoluble (carril 2). Por lo que se procedió a realizar los ensayos de purificación utilizando esta fracción solubilizada.

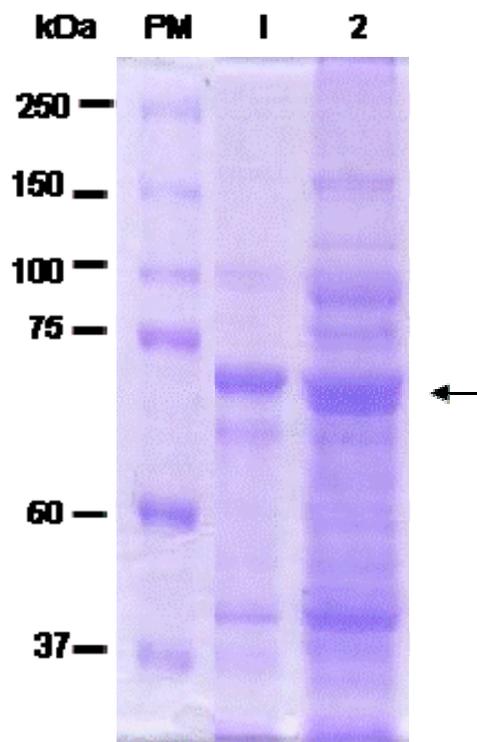


Figura 19. Análisis de solubilización de la proteína rEhBLM-GST en presencia de N-lauryl-sarcosyl al 1.5%. PM: marcador de peso molecular (Dual color Bio-Rad), 1: fracción soluble o sobrenadante, 2: fracción insoluble o pastilla. Con una flecha se indica la posición de la proteína de interés.

6. Purificación de la proteína recombinante rEhBLM-GST

Una vez que se comprobó que la proteína rEhBLM-GST se encontraba en cantidades suficientes en la fracción soluble, se procedió a continuar con el protocolo de purificación. Debido a que el vector de expresión pGEX-6P1 posee una etiqueta GST, la purificación de la proteína rEhBLM-GST se realizó por afinidad del GST al glutation reducido. Al analizar los resultados mostrados en la figura 20, observamos que en extractos de bacterias transformadas sin inducir, no se evidencia ninguna banda (carril 1) mientras que en extractos bacterianos transformados e inducidos con IPTG se distingue la expresión de la proteína recombinante (carril 2). Esta proteína se observa purificada en las eluciones 1 y 2, y en menor cantidad en la elucion 3 (carriles 3 al 5).

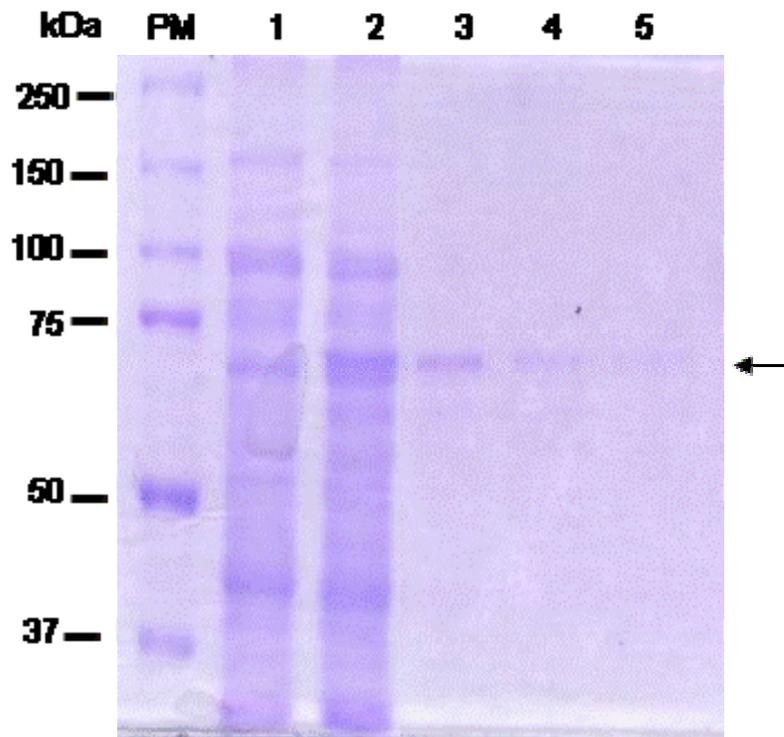


Figura 20. Análisis de la purificación de la proteína rEhBLM-GST con resina de Glutation sefarosa por SDS PAGE teñido con azul de Coomassie. PM: marcador de peso molecular (Dual color Bio-Rad), 1: extractos proteicos de bacterias transformadas sin inducir, 2: extractos proteicos de bacterias transformadas e inducidos con IPTG, 3: fracción de elución 1, 4: fracción de elución 2, 5: fracción de elución 3. Con una flecha se indica la posición de la proteína de interés.

7. Preparación de las sondas de DNA

Después de realizar el marcaje con biotina y la hibridación de los oligonucleótidos, las muestras se analizaron mediante electroforesis en geles de poliacrilamida no desnaturalizantes, fueron transferidas a una membrana de nylon Hybond-N+ y se reveló con el kit Chemiluminescent Nucleic Acid detection module™ (Fisher Thermo Scientific). Como se observa en la figura 21, se evidencia el marcaje de los oligonucleótidos 1* y 4* (carriles 1 y 2). Después de realizar la hibridación, observamos un cambio en la migración electroforética, específicamente un retardamiento, lo que se debe a la formación de las estructuras de DNA en forma de X e Y (carriles 3 y 4) respectivamente.



Figura 21. Análisis de los oligonucleótidos e hibridación de las sondas marcados con biotina. Carril 1: oligonucleótido 1*; carril 2: oligonucleótido 4*; carril 3: sonda en forma de "Y", carril 4: sonda en forma de "X".

8. Interacción de la proteína rEhBLM-GST con la estructura "Y"

Al realizar el ensayo de retardamiento de la movilidad electroforética, observamos en la fig. 22 la migración de la sonda "Y" libre (carril 1), en presencia de 2.5 μ g de la proteína rEhBLM-GST purificada distinguimos la formación de un complejo (carril 2) que presenta una movilidad electroforética menor en comparación con la sonda libre; al mismo tiempo, se observa una disminución de la señal de la sonda libre. Al disminuir la cantidad de proteína rEhBLM-GST (carriles 3 al 6), evidenciamos que la señal del complejo va disminuyendo mientras que aumenta la señal de la sonda libre en la parte inferior. Alternativamente se empleó un anticuerpo α -GST para evidenciar la presencia de rEhBLM en el complejo. En el carril 7, no observamos la formación del complejo cuando se agrega el anticuerpo anti-GST, sin embargo la señal correspondiente a la sonda libre esta disminuida, similar a la del carril 2, lo que sugiere que hubo un superretardamiento y que la marca se quedó en el pozo del gel. Otra posibilidad es que la presencia del anticuerpo haya inhibido la formación del complejo DNA-proteína. Estos resultados confirman que la proteína rEhBLM-GST se une a la sonda en forma de "Y".

Para verificar que el GST no esta involucrada en la unión de la proteína rEhBLM-GST con la sonda "Y", se empleó como control a la etiqueta purificada en el ensayo como control y se observó que es incapaz de formar complejos con la sonda de DNA (carril 8). Finalmente empleamos una proteína no relacionada, en este caso albumina, (BSA), la cual no fue capaz de interaccionar con la sonda en forma de "Y" (carril 9).

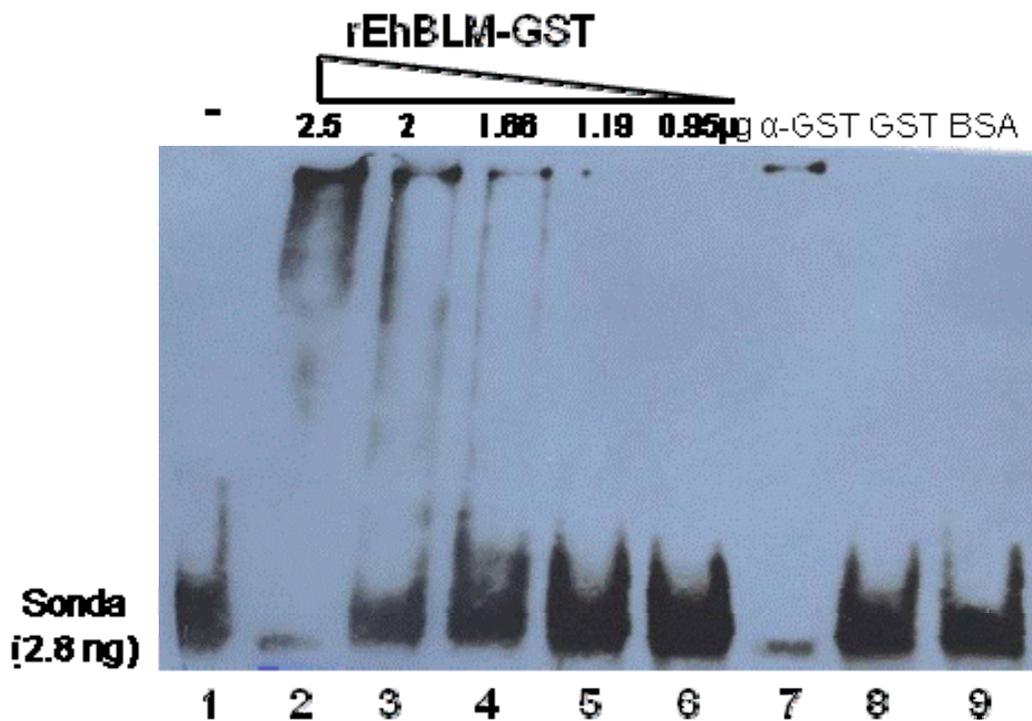


Figura 22. Ensayo de interacción entre la sonda "Y" y la proteína rEhBLM-GST. Las reacciones se analizaron por electroforesis en un gel de poliacrilamida no desnaturalizante al 8% en amortiguador TAE. Carril 1: sonda libre; carril 2-6: proteína rEhBLM-GST purificada por cromatografía de afinidad (2.5, 2, 1.6, 1.1, 0.95 µg), carril 7: superretardo con anticuerpo α-GST, carril 8: ensayo realizado con la proteína GST purificada, carril 9: ensayo realizado con BSA.

9. Interacción de la proteína rEhBLM-GST con la estructura "X"

En un ensayo preliminar utilizando la sonda en forma de "X" (fig. 23), no observamos claramente la presencia de un complejo en presencia de 2.5 μg de la proteína rEhBLM-GST, aun si la señal correspondiente a la sonda libre disminuyó de manera significativa (carril 2). De la misma manera, la señal de la sonda libre se va restableciendo cuando se utilizaron cantidades decrecientes de la proteína rEhBLM-GST (carriles 3 al 5), aun si no se observa el complejo, la aparente ausencia del complejo se debe a la formación de una burbuja que impidió realizar de manera adecuado el revelado. Nuevamente, podemos observar que la presencia del anticuerpo parece provocar un superretardamiento del complejo formado entre la proteína rEhBLM-GST y el DNA ya que la marca se quedó en el pozo del gel y que la señal de la sonda libre fue disminuida, similar a lo que se observa en el carril 2 (carriles 6 y 7), mientras que ni la etiqueta GST ni la albumina, empleados como controles fueron capaces de formar un complejo con la sonda (carriles 8 y 9). Estos resultados sugieren que la proteína rEhBLM es capaz de unirse a una sonda en forma de "X", pero este ensayo debe repetirse para confirmarlo.



Figura 23. Ensayo de interacción entre la sonda "X" y la proteína rEhBLM-GST. Las reacciones se analizaron por electroforesis en un gel de poliacrilamida no desnaturizante al 8% en amortiguador TAE. Carril 1: sonda libre; carril 2-5: ensayo realizado con la proteína rEhBLM-GST purificada por cromatografía de afinidad (2.5, 2, 1.6, 1.1, 0.95 μg), carril 6-7: superretardo con anticuerpo α-GST, carril 8: ensayo realizado con la GST purificada, carril 9: ensayo realizado con BSA.

En eucariontes inferiores, la recombinación homóloga constituye el mecanismo principal para reparar las rupturas de la doble cadena del DNA ocasionadas por radiaciones, agentes químicos o durante la realización de eventos naturales (Bhattacharyya *et al.*, 2004). En particular, los parásitos protozoarios adoptan la recombinación del DNA como estrategia central para evadir la respuesta inmune del huésped a través de la variación antigénica, y de esta manera pueden mantener la cronicidad de la infección sin eliminar al huésped (Deischt, 1997). La recombinación les permite modificar su genoma mediante rearrreglos genómicos, lo que trae como consecuencia la expresión de antígenos nuevos, entre ellos los presentes en las moléculas de superficie (Barry *et al.*, 2001; Van Der Woude, 2004).

La infección por *Entamoeba histolytica*, el parásito protozoario que causa la amibiasis humana, se manifiesta clínicamente de diversas maneras, principalmente con disentería intestinal y amibiasis extratintestinal (Ravdin, 2000). Se ha sugerido que estos diferentes grados de virulencia podrían ser consecuencia de rearrreglos genómicos que le confieren una enorme plasticidad al genoma del parásito, generando diversidad genética y modificando su expresión génica. En nuestro grupo de trabajo, identificamos la posible maquinaria de recombinación homóloga en *E. histolytica*, la cual contiene la mayoría de los factores reportados en levadura y humano. En particular, se identificó el gen *Ehblm* que codifica para una posible DNA helicasa, la cual es el objeto de esta tesis.

La proteína predicha por el gen *Ehblm* comparte 37 y 53% de identidad y homología, respectivamente, con un valor de e de e^{-108} , con la proteína BLM de humano. Considerando, que un porcentaje de identidad del 25% entre dos proteínas de 100 aminoácidos o más y un valor de $e < 0.02$ es estadísticamente significativo (Pevsner,

2003; Pearson, 1996), nuestros resultados indican que el producto del gen *Ehblm* tiene una alta probabilidad de ser el homólogo de la proteína BLM de humano que pertenece a la familia de DNA helicasas RecQ y ha sido involucrada en el mecanismo de recombinación homóloga, promoviendo la migración de HJ para reducir así la recombinación *in vivo* (Karow *et al.*, 2000), así como favoreciendo la reparación de la horquilla colapsada durante la replicación (Henning, 2003). Además se ha demostrado que BLM interactúa con Rad51, la recombinasa central en el proceso de recombinación homóloga (HR, Homologous recombination, por sus siglas en inglés), en estructuras nucleares llamadas foci que corresponden a sitios de reparación del DNA (Haaf *et al.*, 1995; Tan *et al.*, 1999; Tashiro *et al.*, 2000; Bischof *et al.*, 2001).

Usando herramientas bioinformáticas para analizar el genoma del parásito, encontramos que la proteína BLM de *E. histolytica* pertenece a la familia de DNA helicasas RecQ. Además contiene otros dos genes que codifican para proteínas homólogas a las DNA helicasas RecQ y presentan alrededor de 40% de identidad con valores de e^{-10^5} y $2e^{-79}$, respectivamente, con la proteína EhBLM. La secuencia de aminoácidos de las tres posibles DNA helicasas RecQ de *E. histolytica* presenta el dominio conservado de helicasa con los característicos motivos de la familia RecQ (motivos 0, I, Ia, II, III, IV, V y VI), incluyendo el motivo 0 que se localiza río arriba del motivo I. EhBLM es la proteína más grande con 1182 aminoácidos; la segunda proteína (774 aminoácidos) carece de la región carboxilo terminal, mientras que la última (509 aminoácidos) corresponde principalmente al dominio de helicasa y carece de los extremos carboxilo y amino. Las tres proteínas presentan una región conservada que corresponde al dominio RecQ-Ct que es característico de muchos homólogos RecQ, pero solamente EhBLM posee el dominio HRDC. Estos datos confirman que EhBLM es el homólogo en *E. histolytica* de las proteínas HsBLM y ScSGS1 de humano y levadura, respectivamente, las cuales poseen los tres dominios característicos de las DNA helicasas RecQ. Por otra parte, las otras proteínas de *E. histolytica* son los homólogos de HsRecQ1 y HsRecQ5 β de humano, las cuales tienen

el dominio RecQ-Ct pero carecen del dominio HRDC, por lo que fueron llamadas EhRecQ1 y EhRecQ5 respectivamente.

La secuencia de aminoácidos de la EhBLM predicha presentó alta identidad (34-46%) y homología (52-60%) con las proteínas BLM identificadas en muchos organismos a través de la escala evolutiva, desde bacterias (*E. coli*) hasta humano, incluyendo plantas (*A. thaliana*), con valores de e de e^{-124} a $2e^{-81}$. Particularmente, EhBLM mostró una elevada identidad (40%) y homología (60%) con la DNA helicasa RecQ SGS1 de levadura, con un valor de e de e^{-119} , confirmando que es una BLM. Un análisis detallado de la secuencia de aminoácidos del dominio de helicasa de EhBLM (411-898 aa) permitió identificar la secuencia que conforma a los ocho motivos del dominio conservado de helicasa: I: MPTGGKSL (484-492 aa), Ia: VVSPLVSLI (507-518 aa), II: DEAHC (592-596 aa), III: TATA (626-630 aa), IV: GIYCLS (687-693 aa), V: VICATIAFGMGIDK (737-751 aa) y VI: GRAGRIDGE (773-780 aa) así como el motivo 0: NNTVFGNDSFRPSQ (454-467 aa) localizado antes del motivo I con la glutamina invariante (Q) en la posición 467. En otras DNA helicasas RecQ, se ha mostrado que los diferentes motivos del dominio de helicasa actúan coordinadamente para catalizar la hidrólisis de ATP, así como la unión al DNA y las actividades de desenrollamiento. Particularmente, experimentos de mutación realizados en las proteínas SGS1 de levadura (Onoda *et al.*, 2000) y BLM de humano (Bahr *et al.*, 1998), revelaron la importancia de función del motivo 0, participando probablemente en la formación de una bolsa para unirse al ATP (Bernstein *et al.*, 2005). El motivo I (Walker A o el "loop" de unión a fosfato) funge como un contacto de unión a fosfato y metales a través de la hidrólisis de ATP, mientras que el motivo II (o motivo Walker B) está involucrado en la hidrólisis del NTP. El motivo Ia participa en la unión al DNA de cadena sencilla. El "loop" aromático conservado en el motivo III media la unión al ATP y al DNA de cadena sencilla. Además la proteína EhBLM presenta la secuencia consenso CRRTLVLQYFGEVFNKLCNRTCDNC (833-858 aa), la cual corresponde al dominio conservado RecQ-Ct ($CC^{++}X_{16-22}(C/E/D)X_3CX_2C$, donde + es un residuo

electropositivo y X es cualquier residuo) involucrado en la interacción con Zn^{2+} , para asegurar la unión al DNA y la conformación de la proteína. EhBLM también presenta el motivo HRDC (989-1075 aa) el cual tiene una función auxiliar en el reconocimiento del DNA en proteínas homólogas (Revisado en Bennet, 2004 y Sharma *et al.*, 2006). Finalmente, el análisis filogenético del dominio de helicasa RecQ de diversas DNA helicasas homólogas confirmó la relación evolutiva entre la proteína de *E. histolytica*. EhRecQ1 y EhRecQ5 agrupándose con la RecQ de *Trichomonas vaginalis* y con SGS1 de *S. cerevisiae*; de manera sorprendente, las proteínas de *T. cruzi* se ubican en un grupo distinto, pareciendo estar más relacionadas con proteínas BLM de metazoarios. Asimismo, el modelo de la estructura tridimensional de la EhBLM obtenido a partir de los datos del cristal de la región catalítica RecQ de *E. coli* (1oyw), la cual carece del extremo carboxilo terminal y de los dominios RecQ-Ct y helicasa, presenta el plegamiento típico de las DNA helicasas de la familia RecQ. (Bernstein *et al.*, 2005). EhBLM es una molécula en forma de Y con una organización tripartita: el dominio de helicasa con los motivos funcionales conservados forma dos lóbulos de helicasa separados., mientras que el motivo RecQ-CT se concentra dentro de una estructura hélice-giro-hélice similar al de varios dominios de unión a DNA ya reportados. Sin embargo, el sitio de unión a zinc no se predijo bajo nuestras condiciones experimentales, debido a que ambas proteínas no presentan gran similitud en esta región.

En base a estos análisis *in silico*, podemos concluir que la proteína EhBLM tiene todos los elementos estructurales y funcionales para actuar como una DNA helicasa en *E. histolytica*.

Para iniciar la caracterización funcional de la proteína EhBLM, se amplificó por PCR la secuencia de nucleótidos del gen *Ehblm* que codifica para el dominio de helicasa y se clonó en marco de lectura con la etiqueta GST en el vector de expresión pGEX-6P1. La construcción pGEX-6P1-*Ehblm* fue secuenciada para verificarla y compararla con la

secuencia reportada en las bases de datos del genoma de *E. histolytica*. Ambas secuencias resultaron ser idénticas. La construcción pGEX-6P1-*Ehblm* se utilizó para transformar células competentes BL21 (DE3) pLysS de *E. coli* e inducir la expresión de la proteína recombinante. Se observó la expresión de la proteína rEhBLM-GST, a las 3 horas después de haber adicionado el inductor IPTG. Aunque el peso molecular predicho para la proteína recombinante es de 80 kDa, ésta siempre presentó una migración aberrante en los geles, estando por debajo del marcador de 75 kDa. Cabe mencionar que utilizamos marcadores preteñidos que no permiten definir con exactitud el peso molecular de las proteínas. También es posible que la migración anómala de la proteína rEhBLM se deba al número de aminoácidos ácidos que contiene su secuencia. Se ha reportado que este tipo de aminoácidos, principalmente el ácido aspártico (D) y el ácido glutámico (E) pueden presentar modificaciones químicas, lo cual pudiera afectar la migración electroforética de la proteína que los contiene. Esto ha sido reportado para la proteína rEhOPD1-168 de *E. histolytica* (Herrera-Aguirre *et al.*, 2010), y para la proteína Caldesmon (Graceffa *et al.*, 1992) que contienen alrededor de 20% de aminoácidos ácidos. Dado que el contenido de aminoácidos ácidos es del 18% en la proteína rEhBLM, es posible que esto afecte su migración electroforética.

La proteína rEhBLM-GST se encontró principalmente en la fracción insoluble y debido a esto se decidió solubilizarla en presencia de N-lauryl sarcosyl. Una vez que se evidenció en la fracción soluble, se procedió a purificarla mediante cromatografía de afinidad en una columna de sefarosa acoplada a glutatión.

Para iniciar la caracterización funcional de la posible DNA helicasa EhBLM de *E. histolytica*, evaluamos la actividad de unión al DNA de la proteína recombinante EhBLM-GST que corresponde al dominio de helicasa. Se ha reportado que las DNA helicasas y la BLM en particular (Huber *et al.*, 2002) son capaces de unirse a diferentes sustratos de DNA, por lo que nosotros evaluamos la actividad de unión de la

proteína rEhBLM-GST a dos tipos de estructuras de DNA, una en forma de cruz (sonda "X") semejante a una Holliday Junction, la cual representa un intermediario en la recombinación homóloga (HR) (Karow *et al.*, 2000; Constantino *et al.*, 2000), y otra en forma de "Y" semejante a una horquilla de replicación de dos brazos (Mohaghegh *et al.*, 2001). Nuestros resultados indican que la proteína rEhBLM-GST es capaz de unirse a la sonda en forma de "Y" y que esta interacción no se debe a la etiqueta GST. Además, la proteína rEhBLM-GST también parece ser capaz de unirse a la sonda en forma de "X", aún si es necesario repetir el ensayo para mejorar su resolución y así confirmar esta propiedad. Sin embargo, estos datos sugieren que la proteína EhBLM podría participar en eventos relacionados con la replicación del DNA y la recombinación homóloga en *E. histolytica*, promoviendo la migración de las HJ, como lo hace la BLM de humano para reestablecer las horquillas colapsadas durante la replicación. Sin embargo, es necesario realizar experimentos adicionales, incluyendo ensayos de desenrollamiento de ambas estructuras, para confirmar esta hipótesis.

La proteína EhBLM-GST recombinante no corresponde a la proteína EhBLM completa, sólo al dominio de helicasa, por lo que carece de algunos motivos que han sido reportados como importantes para llevar a cabo la función de DNA helicasa en las proteínas RecQ homólogas, como son el motivo 0, el motivo RecQ-Ct y el dominio HRDC. Particularmente, en la proteína BLM de humano, se sabe que el dominio RecQ-Ct corresponde a un dominio de dedos de zinc que actúa en conjunto con el dominio HRDC para mediar la interacción con el DNA (Langland *et al.*, 2001; Sharma *et al.*, 2004). En el caso de la proteína EhBLM de *E. histolytica*, el dominio de helicasa por si solo es capaz de interactuar con las dos estructuras de DNA utilizados en este trabajo, sin embargo, es posible que la presencia de por lo menos el dominio RecQ-Ct permita potencializar esta unión. Por otra parte, la presencia de todos los dominios funcionales podría ser un requisito para que la proteína de *E. histolytica* sea capaz de desenrollar el DNA y así llevar a cabo su función de DNA helicasa.

- El genoma de *E. histolytica* codifica para una pequeña familia de DNA helicasas de la familia RecQ constituida por las proteínas EhBLM, EhRecQ1 y EhRecQ5.
- El gen *Ehblm* codifica para una proteína que presenta todas las características estructurales de las DNA helicasas de la familia RecQ descritas en otros organismos.
- Se clonó y se expresó en bacterias *E. coli* el dominio de helicasa de la proteína EhBLM.
- El dominio de helicasa de la proteína rEhBLM-GST es capaz de unirse a las estructuras de DNA en forma de "X" e "Y", lo que sugiere que la proteína EhBLM podría participar en eventos relacionados con la replicación del DNA y la recombinación homóloga en *E. histolytica*.

Las principales perspectivas de este trabajo son las siguientes:

- Evaluar la actividad de unión de la proteína rEhBLM-GST con otros tipos de estructuras de DNA.
- Completar los ensayos funcionales con la proteína rEhBLM-GST determinando si el dominio de helicasa de la proteína EhBLM es capaz por si solo de catalizar el desenrollamiento de estructuras de DNA.
- Clonar la secuencia completa del gen *Ehblm* para obtener la proteína recombinante completa con todos los dominios funcionales y comparar su actividad de unión y desenrollamiento del DNA con la del dominio de helicasa solo.
- Obtener anticuerpos contra la proteína EhBLM y analizar su localización celular en respuesta de daño al DNA, para evaluar su participación en el mecanismo de reparación del DNA mediante recombinación homóloga.
- Determinar si la proteína EhBLM colocaliza con las proteínas EhRad51 y EhRad54, en respuesta al daño al DNA.

Acrilamida 30%	29 g Acrilamida, 1 g Bis-Acrilamida
Azul de Coomassie	0.25 g de Azul de coomassie R-25
Buffer de muestra 6X para DNA	0.25% Azul de Bromofenol 0.25% Xylen cyanol FF 15% Ficoll 400
Tris-Glicina 10X	30 g Tris-Base 144 g Glicina
Buffer de corrida 1X para proteínas	Tris-glicina 0.025 M Glicina 0.192 M SDS 1%
Buffer de carga 5X para proteínas	5 ml Tris-HCl 1.5 mM pH 6.8 8 ml SDS 10% 4 ml Glicerol 2 µl β-Mercaptoetanol 0.05% Azul de Bromofenol 20 ml H ₂ O
Buffer de Transferencia proteínas	100 ml Tris-Glicina 10X 200 ml metanol
CaCl ₂ 150 mM	147 g CaCl ₂
DTT 1 M	15.45 g
EDTA 0.5 M pH 8	18.612 g ajustar pH com NaOH 10N
EGTA 100 mM	0.1926 g EGTA
Medio de Cultivo LB (Luria Bertani)	10 g de LB Disolver en 450 ml de H ₂ O
Medio de cultivo 2YT pH 7.5	16 g Triptona 10 g Extracto de levadura 5 g NaCl ajustar pH 7.5 con NaOH 10 N
Placas LB-Agar selecto	5 g LB 3.75 g agar disolver en 250 ml de H ₂ O
PBS 1X pH 7.4	8 g NaCl 0.2 g KCl 1.4 g Na ₂ HPO ₄ , ajustar pH con HCl
PSA 10	1g PSA en 10 ml de H ₂ O
Reactivo de Bradford	50 mg de Azul de Coomassie G-250 25 ml etanol 100%

Solución desteñidora	50 ml ácido fosfórico 85% proteger de la luz 30 ml etanol 10 ml ácido acético glacial
TAE 50X	242 g Tris-Base 57.1 ml ácido acético glacial 100 ml EDTA 0.5 M pH 8
TBE 10X	108 g Tris-Base 55 g ácido bórico 40 ml EDTA 0.5 M pH 8 Tris-HCl 0.5 M pH 6
Rojo de Ponceau 0.1%	100 mg Rojo Ponceau S 1 ml Ácido acético glacial, H ₂ O 100 ml
IPTG 100 mM	0.2383 g iptg, disolver en 10 ml H ₂ O
Ampicilina 50 mg/ml	0.5 g Ampicilina Disolver agregando gotas de NaOH 10 N Filtrar en membrana de 0.22 µm, guardar a -20° C
Cloranfenicol 34 mg/ml	0.34 g de cloranfenicol, disolver en Etanol
NaCl 5 M	292.2 g de NaCl Disolver en 800 ml H ₂ O
Acetato de Sodio 3 M pH 5.2	408.1 g Acetato de Na para 800 ml de H ₂ O Ajustar pH 5.2 con ácido acético glacial
CaCl ₂ 0.1 M	14.70 g CaCl ₂ disolver en 1000 ml de H ₂ O
Solución RF1	100 mM RbCl 50 mM MnCl ₂ 30 mM Acetato de potasio 10 mM CaCl ₂ 15 % glicerol Ajustar pH a 5.8 con ácido acético 0.2 M
Solución RF2	10 mM MOPS 10 mM RbCl 75 mM CaCl ₂ 15 % glicerol Ajustar pH a 6.8 con NaOH Esterilizar

- Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R. E. Moore, D. D., Seidman, J. G., Smith, J. A. & K. Struhl. 1994. Short protocols in molecular biology. 2th. Wiley & Sons.
- Bachrati, C. Z., Hickson, I. D. 2003. RecQ helicases: suppressors of tumorigenesis and premature aging. *Biochem J.* 15; 374(Pt 3):577-606.
- Bahr, U., Springfield, C., Tidona, C. A., Kehm, R. & G Darai. 1998. Identification and characterization of the Tupaia herpesvirus DNA polymerase gene. *J Gen Virol.* 79 (12):3049-53
- Barry, J. D., Ginger, M. L., Burton, P., McCulloch, R. 2001. Why are the parasite contingency genes often associated with telomeres? *Int. J. Parasitol.* 33: 29-45.
- Bennet, R. J. & Keck, J. L. 2004. Structure and function of RecQ DNA helicases. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.*, 39:79-97.
- Bernstein, D. A., Zittel, M. C., Keck, J. L. 2005. High-resolution structure of the *E. coli* RecQ helicase catalytic core. *J. EMBO*, V. 22, 4910
- Bhattacharyya, M. K., Kumar, N. 2003. Identification and molecular characterization of DNA damaging agent induced expression of *Plasmodium falciparum* recombination protein PfRad51. *Int. J. Parasitol.* 33: 1385-92.
- Bhattacharyya, M. Norris D. y Kumar, N. 2004. Molecular player of homologous recombination in protozoan parasites: implications for generating antigenic variations. *Infection, Genetics and Evolution* 4:91-98.
- Bischof, O., Kim, S. H., Irving, J., Beresten, S., Ellis, N. A., Campisi, J. 2001. Regulation and localization of the Bloom syndrome protein in response to DNA damage. *J. Cell Biol.* 153, 367-380.
- Bracha, R. M. D. 1984. Virulence of *Entamoeba histolytica* trophozoites. Effects of bacteria, microaerobic conditions, and metronidazole. Cell Signaling and motility in *Entamoeba histolytica*. *J. Exp. Med* 160:353-368.

- Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254.
- Caballero-Salcedo, A., Viveros-Rogel, M., Salvatierra, B., Tapia-Conyer, R., Sepúlveda-Amor, J., Gutiérrez, G., y Ortiz-Ortiz, L. 1994. Seroepidemiology of amebiasis in Mexico. *Am. J. Trop Med Hyg*, 50:412-419.
- Campbell; David A Scott J. Westenberger; Nancy R. Sturm. 2004. The Determinants of Chagas Disease: Connecting Parasite and Host *Genetics Current Molecular Medicine*, 4-6: 549-562
- Caruthers, J. M., McKay, D. B. 2002. Helicase structure and mechanism. *Curr. Opin. Struct. Biol.* Feb 12(1):123-33.
- Caruthers, J. M., Jonson, E. R., McKay, D. B. 2000. Crystal structure of yeast initiation factor 4A, a DEAD-box RNA helicase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97:13080-13085 [PubMed: 11087862]
- Chakraverty, R. K., Hickson, I. D. 1999. Defending genome integrity during DNA replication: a proposed role for RecQ family helicases. *Bioessays.* Apr;21(4):286-94. PMID: 10377891
- Center for Disease Control and Prevention. 2006. Parasites and Health Amebiasis [www. document]. URL www.dpd.cdc.gov/dpdx/HTML/Amebiasis.htm.
- Constantinou, A., Tarsounas, M., Karow, J. K., Brosh, R. M., Bohr, V. A., Hickson, I. D., West, S. C. 2000. Werner's syndrome protein (WRN) migrates Holliday junctions and co-localizes with RPA upon replication arrest. *EMBO Rep.* Jul;1(1):80-4.
- Cinfuentes, E., Blumenthal, U., Ruiz-Palacios, G., Bennet, S., y Peassey, A. 1994. Ambiente epidemiológico del uso de aguas negras en agricultura: Valle del Mezquital. *Salud Pública:* 3-9.

- Conde-Bonfil, M. C., y Mora-Zerpa, C. 1992. *Entamoeba histolytica*: a standing threat. *Salud Pública Mex.* 34:336-341.
- Conway, C., Proudfoot, C., Burton, P., Barry, J. D., y McCulloch, R. 2002. Two pathways of homologous recombination in *Trypanosoma brucei*. *Mol Microbiol* 45:1687-1700.
- Critchlow, S. E. Jackson, S. P. 1998. DNA end-joining: from yeast to man. *Trends Biochem Sci.* Oct;23(10):394-8.
- Chakraverty, R. K., Hickson, I. D. 1999. Defending genome integrity during DNA replication: a proposed role for RecQ family helicases. *Bioessay.* 21(4):286-94. PMID: 10377891
- D'Amours, D., Jackson, S. P. 2002. The Mre11 complex: at the crossroads of DNA repair and checkpoint signalling. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.*, 3, 317-327.
- Deistch, K. W., Moxon, E. R. y T. E. Wellems. 1992. Shared themes of antigenic variation and virulence in bacterial, protozoal and fungal infections. *Microbiol. & Mol. Biol. Rev.* 61:281-293.
- DeLano, W. L. 2002. *The PyMol Molecular Graphics System*. DeLano Scientific, San Carlos, CA.
- Donelson, J. E. 2003. Antigenic variation and the African trypanosome genome. *Acta Trop.* Mar;85(3):391-404. Review.
- Dudás, A., Chovanec, M. 2004. DNA double-strand break repair by homologous recombination. *Mutat Res.* 566(2):131-67.
- Dudášová, Z., Dudás, A., Chovanec, M. 2004. Non-homologous end-joining factors of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol Rev.* Nov;28(5):581-601.
- Dudášová, Z., Dudás, A., Alemayehu, A., Vlasáková, D., Marková, E., Chovanec, M., Vlcková, V., Brozmanová, J. 2004. Disruption of the RAD51 gene sensitizes *S. cerevisiae* cells to the toxic and mutagenic effects of hydrogen peroxide. *Folia Microbiol (Praha)*;49(3):259-64

- Ellis, N. A., Groden, J., Ye, T. Z., Straughen, J., Lennon, D. J., Ciocchi, S., Proytcheva, M., German, J. 1995. The Bloom's syndrome gene product is homologous to RecQ helicases. *Cell* 83, 655-666.
- Gangloff, S., McDonald, J. P., Bendixen, C., Arthur, L., Rothstein, R. 1994. The yeast type I topoisomerase Top3 interacts with Sgs1, a DNA helicase homolog: a potential eukaryotic reverse gyrase. *Mol. Cell. Biol.* 14, 8391-8398.
- Gorbalenya A. E., Koonin, E. V., Donchenko, A. P., Blinov, V. M. 1988. A novel superfamily of nucleoside triphosphate-binding motif containing proteins which are probably involved in duplex unwinding in DNA and RNA replication and recombination. *FEBS Lett.* Aug 1; 235(1-2):16-24. Review.
- Gorbalenya A. E., Koonin E.V., Donchenko A.P., Blinov V.M. 1989. Two related superfamilies of putative helicases involved in replication, recombination, repair and expression of DNA and RNA genomes. *Nucleic Acids Res.* 17: 4713-4730 [PubMed: 2546125]
- Gorbalenya, A. E. y Koonin, E. V. 1993. Helicases: amino acid sequence comparisons and structure-function relationships. *Curr. Biol.*, 3, 419-429.
- Graceffa, P., Jancso, A. y K. Mabuchi. 1992. Modification of acidic residues normalizes sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis of caldesmon and other proteins that migrate anomalously. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, vol. 297, no. 1, pp. 46-51.
- Haaf, T., Golub, E. I., Reddy, G., Radding, C. M. & D. C. Wards. 1995. Nuclear foci of mammalian HRad51 recombination protein in somatic cells after DNA damage and its localization in synaptonemal complexes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 92:2298-2302.
- Hall, M. C. y Matson, S. W. 1999. Helicases motifs; the engine that powers DNA unwinding. *Mol. Microbiol.* 34,867-877.

- Harmon, F. G. y Kowalczykowski, S. C. 1998. RecQ helicase, in concert with RecA and SSB proteins, initiates and disrupts DNA recombination. *Genes Dev.*, 12, 1134-1144.
- Henning, W., Werner, S. H. 2003. Homologous recombination and cell cycle checkpoints: Rad51 in tumour progression and therapy resistance. *Toxicology* 193, 91-109.
- Herrera-Aguirre, M. E., Luna-Arias, J. P., Labra-Barrios, M. L. y Orozco, E. 2010. Identification of Four *Entamoeba histolytica* Organellar DNA Polymerases of the Family B and Cellular Localization of the Ehodp1 Gene and EhODP1 Protein. *J. Biom. Biotech.* Vol. 2010, Article ID 734898, pp 1-13.
- Huber, D. M., Lee, C. D. y N. Maizels. 2002. G4 DNA unwinding by BLM and Sgs1p: substrate specificity and substrate-specific inhibition. *Nucleic Acids Research*. 30: 18, 3954-3961.
- Iliyina, T., Gorbalenya, A. E., & Koonin, E. V. 1992. Organization and evolution of bacterial and bacteriophage primase helicase systems. *J. Mol. Evol.* 34:351-357.
- Karow, J. K., Chakraverty, R. K, y Hickson, I. D.1997. The Bloom's syndrome gene product is a 3'-5' DNA helicase. *J. Biol. Chem.*, 272. 30611-30614.
- Karow, J. K., Constantinou, A., Li, J. L., West, S. C., Hickson, I. D., 2000. The Blomm's syndrome gene product promotes branch migration of Holliday Junctions. *Proc. Natl. Aca. Sci. U.S.A.* 97 (12):6504-8.
- Kitao, S., Lindor, N. M., Shiratori, M., Furuichi, Y., Shimamoto, A. 1999. Rothmund-thomson syndrome responsible gene, RECQL4: genomic structure and products. *Genomics* 1;61 (3):268-76.
- Koonin, E. V. 1993. *Escherichia coli* dinG gene encodes a putative DNA helicase related to a group of eukaryotic helicases including Rad3 protein. *Nucleic Acids Res.* 21 1497 1993 [PubMed: 8385320]

- Kowalczykowski, S. C., Dixon, D. A., Eggleston, A.K., Lauder, S.D., Rehrauer, W. M. 1994. Biochemistry of homologous recombination in *Escherichia coli*. *Microbiol Rev.* Sep;58(3):401-65.
- Langland, G., Kordich, J., Creaney, J., Goss, K. H., Lillard-Wetherell, K., Bebenek, K., Kunkel, T.A., Groden, J. 2001. The Bloom's syndrome protein (BLM) interacts with MLH1 but is not required for DNA mismatch repair. *J Biol Chem.* 276(32):30031-5.
- Lieber, M. R. 2004. The biochemistry and biological significance of nonhomologous DNA end joining: an essential repair process in multicellular eukaryotes. *Genes Cells* 7:77-85.
- Levine, N. D., Corliss, J. O., Cox, F. E., Deroux, G. F., Grain, J., Honigberg, B. M. 1980. A newly revised classification of the protozoa. *J. Protozool.* 27:37-58.
- Lisby, M., Rothstein, R. 2004. DNA damage checkpoint and repair centers. *Curr Opin Cell Biol.* Jun;16(3):328-34.
- Linder, P., Daugeron, M. C. 1989. Are DEAD-box proteins becoming respectable helicases? *Nat. Struct Biol.* 7:97-99.
- López-Casamichana, M., Orozco, E., Marchat, A. L., y López-Camarillo, C. 2008. Transcriptional profile of the homologous recombination machinery and characterization of the EhRAD51 recombinase in response to DNA damage in *Entamoeba histolytica*. *BMC Mol. Biol.* 9:35
- López-Revilla, R., y Báez-Camargo, M. 1992. Immediate autoproteolysis and new proteinases in *Entamoeba invadens* and *Entamoeba moshkovskii* trophozoites. *Arch. Med Res.* 23: 95-97.
- Lohman, T. M. y Bjornson, K. P. 1992. Mechanisms of helicase-catalyzed DNA unwinding. *Annu. Rev. Biochem.* 65, 169-214.
- Lushbaugh, W. B., Miller, J. H. 1974. Fine structural topochemistry of *Entamoeba histolytica* Schaudinn, 1903. *J Parasitol.* Jun; 60(3):421-33.

- López-Revilla, R., y Báez-Camargo, M. 1992. Immediate autoproteolysis and new proteinases in *Entamoeba invadens* and *Entamoeba moshkovskii* trophozoites. *Arch. Med. Res.* 23:95-97.
- Machado-Silva, A., Teixeira, S. M., Franco, G. R., Macedo, A. M., Pena, S. D., McCulloch, R., Machado, C. R. 2008. Mismatch repair in *Trypanosoma brucei*: heterologous expression of MSH2 from *Trypanosoma cruzi* provides new insights into the response to oxidative damage. *Gene.* 31; 411(1-2):19-26.
- Marion, S., Tavares, P., Arhets, P., y Guillen, N. 2006. Signal transduction through the Gal-GalNac lectin of *Entamoeba histolytica* involves a spectrin-like protein. *Mol. Biochem Parasitol.* 135: 31-38.
- Martínez-Palomo, A. 1982. The biology of *Entamoeba histolytica* England: Research studies Press, John Wiley & Sons, pp. 5-56.
- Masson, J. Y., Tarsounas, M. C., Stasiak, A. Z., Stasiak, A., Shah, R., McIlwraith, M. J., Benson, F. E., West, S. C. 2001. Identification and purification of two distinct complexes containing the five Rad51 paralogs. *Genes Dev.* 15: 3296-3307.
- Matson, S. W., George, J. W. & Bean, D. W. 1994. DNA helicases: enzymes with essential roles in all aspects of DNA metabolism: *Bioessays* 16:13-22.
- Mendonca, V. M., Keplin, H. D. y Matson, S. W. 1995. *J. Bacteriol.* 177,1326-1335.
- McCulloch, R., Vassela, E., Burton, P., Boshart, M., Barry, J. D., 2004. Transformation of monomorphic and pleomorphic *Trypanosoma brucei*. *Methods Mol. Biol.* 53-86.
- McKean, P. G., Keen, J. K., Smith, D. F., Benson, F. E., 2001. Identification and characterization of a Rad51 gene from *Leishmania major*. *Mol. Biochem Parasitol.* 115: 209-16.
- Michel, B., Grompone, G., Flores, M. J., Bidnenko, V. 2004. Multiple pathways process stalled replication forks. *Proc. Natl. Acad. Sci USA.* 101:12783-8.

- Mohaghegh, P., Karow, K. J., Brosh, M. R. & Vilhelm, A. B. 2001. The Bloom's and Werner's syndrome proteins are DNA structure-specific helicases., *Nucl. Acid. Res.* 29:2843-2849.
- Morozov, V., Mushegian, A. R., Koonin, E. V., Bork, P. 1997. A putative nucleic acid-binding domain in Bloom's and Werner's syndrome helicases. *Trends Biochem Sci.* 22(11):417-8
- Nakayama, H., Nakayama, K., Nakayama, R., Irino, N., Nakayama, Y. y Hanawalt, P. C. 1984. Isolation and genetic characterization of a thymineless death resistant mutant of *E. coli* K12: Identification of a new mutation (*recQ1*) that blocks the RecF recombination pathway. *Mol. Gen. Genetics.*, 195, 474-480.
- Nakayama, K., Irino, N., & Nakayama, H. 1985. The *recQ* gene of *Escherichia coli* K12: molecular cloning and isolation of insertion mutants. *Mol. Gen. Genetics.* 200, 266-271.
- Onoda, F., Seki, M., Miyajima, A. y Enomoto T. 2000. Elevation of sister chromatid Exchange in *Saccharomyces cerevisiae* *sgs1* disruptants and the relevance of the disruptants as a system to evaluate mutations in Bloom's syndrome gene. *Mutat. Res.* 459, 203-209.
- Orozco, E., de la Cruz, H. F., y Rodríguez, M. A. 1985a. Isolation and characterization of *Entamoeba histolytica* mutants resistant to emetine. *Mol. Biochem Parasitol.* 15:49-59.
- Page, S. L., Hawley, R. S. 2003. Chromosome choreography: the meiotic ballet. *Science.* 301:785-9.
- Pastink, A., y Lohman, P. H. M. 1999. Repair and consequences of double-strand breaks in DNA. *Mutat. Res. Fundam. Mol. Mech. Mut.* 428:141-156.
- Pays, E., Vanhamme, L. & D. Pérez Morga. 2004. Antigenic variation in *Trypanosoma brucei*: facts, challenges and mysteries. *Curr. Opin. Microbiol.* 7:369-374.

- Pearson, W. R. 1996. Effective protein sequence comparison. *Methods Enzymol.* 226:227-258
- Pevsner, J. 2003. Bioinformatics and functional genomics. Wiley-Liss.
- Pérez-Tamayo, R. 1989. Patología de la amibiasis. Cell Signalling and motility in *Entamoeba histolytica*, pp. 42-45.
- Pirsell, M., Chovanec, M., Dudás, A., Kleibl, K., Van Houten, B. 2004. Fourth DNA repair workshop on DNA damage and repair: mechanisms and biological consequences DNA Repair (Amst). Dec 2; 3(12):1639-59. Smolenice Castle, 2-5 May 2004.
- Pradhan, A. Chauchan, V. S. & Tuteja, R. 2005. *Mol. Biochem. Parasitol.* 140: 55
- Ravdin, J. I., 2000. Amebiasis. Londres: Imperial Collage Press.
- Sambrook, J., Fritsh. E. F., Maniatis, T. 1989. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Edition, Cold Spring Harbor laboratory, New York.
- Sanan-Mishra, N., Pham, X. H., Sopory, S. K., Tuteja, N. 2005. *Proc.Natl. Acad. Sci. USA.* 102:509
- Sharma, S., Sommers, J. A., wu, L. B., Bohr, V. A., Hickson, I. D., & Robert M. Brosh. 2004 Stimulation of Flap endonuclease-1 by the Bloom's syndrome protein. *J. Biol. Chem.*, 279: 9847-9856.
- Schmid, S. R. y Linder, P. 1992. D-E-A-D- protein family of putative RNA helicases. *Mol. Microbiol.*6:283-292.
- Schwacha, A. & Kleckner, N. 1995. Identification of double Holliday junctions as intermediate in meiotic recombination. *Cell.* 83:783-791.
- Sharples, G. J., Benson, F. E., Illing, G. T. & Lloyd, R. G. 1999. Molecular and functional analysis of the *ruv* region of *Escherichia coli* K-12 reveals three genes involved in DNA repair and recombination. *Mol. Gen. Genet.* 221: 219-226.
- Smith, D. B. & K. S. Johnson. 2004. Single-step purification of polypeptides expressed in *Escherichia coli* as fusions with glutathione S-transferase. *Gene.* 67: 31-40.

- Spillare, E. A., Robles, A. I., Wang, X. W., Shen, J. C., Yu, C. E., Schellenberg, G. D., Harris, C. C. 1999. p53 mediated apoptosis is attenuated in Werner syndrome cells. *Genes Dev.* Jun 1;13(11):1355-60.
- Stürzbecher, H. W., Donzelmann, B., Henning, W., Knippschild, U., Buchhop, S. 1996. p53 is linked directly to homologous recombination processes via RAD51/RecA protein interaction. *EMBO J.* Apr 15;15(8):1992-2002.
- Stewart, E., Chapman, C. R., Al-Khodairy, F. Carr, A. M. & Enoch, T. 1997. rqh1+, a fission yeast gene related to the Bloom's and Werner's syndrome genes, is required for reversible S phase arrest. *EMBO J.*,16: 2682-2692.
- Subramanya, H. S., Bird, L. E., Brannigan, J. A. y Wigley, D. B. 1996. Crystal structure of DEXX box DNA helicase. *Nature*, 384, 379-383.
- Symington, L. S. 2002. Role of Rad52 epistasis group genes in homologous recombination and double-strand break repair. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 66:630-700.
- Szostak, J. W., On-Weaver, T. L., Rhostein, R. J., Stahl, F. W. 1983. The double strand break repair model for recombination, *Cell* 33: 25-35.
- Tan, T. L. R., Essers, J., Citterio, E., Swagemakers, S. M. A. Wit, J., Benson, F. E., Hoeijmakers, J. H. J. & Kanaar, R. 1999. Mouse Rad54 affects DNA conformation and DNA damage-induced Rad51 foci formation. *Curr. Biol.*, 9:325-328.
- Tanaka, K., Kagawa, W., Kinebuchi, T., Kurumizaka, H., Miyagawa, K. 2002. Human Rad54B is a double-stranded DNA-dependent ATPase and has biochemical properties different from its structural homolog in yeast, Tid1/Rdh54. *Nucleic Acids Res.* 15;30(6):1346-53.PMID: 11884632
- Tanner, N. K., Linder P. 2001. DEXD/H box RNA helicases: from generic motors to specific dissociation functions. *Mol. Cell.* 8:251-62
- Tanner, N. K., Linder, P. 2003. DEXD/H box RNA helicases: from generic motors to specific dissociation functions. *Mol. Cell.* 8:251-262.

- Tanuyksel, M., y Petri, W. A., Jr. 2003. Laboratory diagnosis of amebiasis. *Clin Microbiol Rev* 16:713-729.
- Tashiro, S., Walter, L., Shinohara, A., Kamada, N., Cremer, T. 2000. Rad51 accumulation at sites of DNA damage and in postreplicative chromatin. *J. Cell. Biol.*, 150:283-291.
- Thompson, L. H., Schild, D. 1999. The contribution of homologous recombination in preserving genome integrity in mammalian cells. *Biochimie.* 81(1-2):87-105.
- Thompson, L, H., Schild, D. 2001. Homologous recombinational repair of DNA ensures mammalian chromosome stability. *Mutat. Res.* 477:131-153.
- Tuteja, N. & Tuteja R. 1996. DNA helicases: the long unwinding road. *Nat. Genet.* 13: 1-12.
- Tuteja, R., Malhotra, P., Song, P., Tuteja, N. & Chauhan, V. S. 2002. Isolation and characterization of eIF-4A homologue from *Plasmodium cynomolgi*. *Mol. Biol. Parasitol.* 12:79-83.
- Tuteja, R., Tuteja N., Malhotra, P. y Chauhan, V. S. 2003. Replication fork stimulated eIF-4A from *Plasmodium cynomolgi* unwinds DNA in the 3' to 5' direction and is inhibited by DNA interacting compounds. *Arch. Biochem. Biophysics*, 414, 108-114.
- Tuteja, N. y Tuteja, R. 2004. Unraveling DNA helicases, motif, structure, mechanism and function. *Eur. J. Biochem*, 271, 1849-1863.
- Ulbert, S., Chávez, I., Borst, P. 2002. Expression site activation in *Trypanosoma brucei* with three marked variant surface glycoprotein gene expression sites. *Mol Biochem Parasitol.* Apr 9;120(2):225-35.
- Umez K., Nakayama, K. y Nakayama H. 1990. *Escherichia coli* RecQ protein is a DNA helicase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 87, 5363-5367

- Van Brabant, A. J., Stan, R. and Ellis, N. A. 2000. DNA helicases, genomic instability, and human genetic disease. *Annu. Rev. Genom. Hum. Genet.* 1, 409-459.
- Van der Woude, M. W., Bäumlner, A. J. 2004. Phase and antigenic variation in bacteria. *Clin Microbiol Rev.* 17(3):581-611,
- Venkatesan, M., Nossal, N. G. 1982. Bacteriophage T4 gene 44/62 and gene 45 polymerase accessory proteins stimulate hydrolysis of duplex DNA by T4 DNA polymerase. *J Biol Chem.* Oct 25;257(20):12435-43.
- Wei, S. C. Zeng, D. N. & Shibata, T. N. 2002. Molecular views of recombination proteins and their control. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 4:435-445.
- West, S. C. 2003. Molecular views of recombination proteins and their control. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 4:434-45.
- World Health Organization, 1997. A consultation with experts on amoebiasis. *Epidemiological bulletin.* 18(1).
- Wolf-Dietrich, H., Ehmse, K. T., & J. A. Solinger. 2003. Holliday Junctions in the eukaryotic nucleus: resolution in sight? *TRENDS in Biochem. Sciences.* 28:548-557.
- Wu, G. J., Sinclair, C. S., Paape, J., Ingle, J. N., Roche, P. C. James, C. D. & Couch, F. J. 2000. 17q23 amplifications in breast cancer involve the *PAT1*, *RAD51C*, *PS6K* and *SIGma1B* genes. *Cancer Res.* 60: 5371-5375.
- Yokoyama, H., Kurumizaka, H., Ikawa, S., Yokoyama, S., Shibata, T. 2003. Holliday junction binding activity of the human Rad51B protein. *J Biol Chem.* Jan 24;278(4):2767-72.PMID: 12441335
- Yu, C. E., Oshima, J., Fu, Y. H., Wijsman, E. M., Hisama, F., Alisch, R., Matthews, S., Najura, J., Miji, T., Ouais, S., Martin, G. M., Mulligan, J., y G. D. Schellenberg. 1996. Positional cloning of the Werner's syndrome gene, *Science*, 272: 258-262.

- Zou, L. & Ellege, S. J. 2000. Sensing DNA damage through ATRIP recognition of RPA-single stranded DNA complexes. *Science*. 300:1542-1548.