

UACM

Universidad Autónoma
de la Ciudad de México

Nada humano me es ajeno

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE LA CIUDAD DE MÉXICO

COLEGIO DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA

PROGRAMA DE CIENCIAS GENÓMICAS

**Interacción de la proteína EhTRF-like I con
proteínas relacionadas con la función telomérica en
*Entamoeba histolytica***

T E S I S

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS GENÓMICAS

P R E S E N T A :

Víctor Álvarez Hernández

DIRECTOR DE TESIS

**Elisa Irene Azuara Liceaga, Investigadora
Posgrado en Ciencias Genómicas**

**POSGRADO
EN CIENCIAS
GENÓMICAS**

Ciudad de México, Enero , 2018

SISTEMA BIBLIOTECARIO DE INFORMACIÓN Y DOCUMENTACIÓN



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE LA CIUDAD DE MÉXICO COORDINACIÓN ACADÉMICA

RESTRICCIONES DE USO PARA LAS TESIS DIGITALES

DERECHOS RESERVADOS[©]

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

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

INTEGRACIÓN DEL JURADO:

Presidente: Dr. Jesús Valdés Flores
Secretario: Dra. Elisa Irene Azuara Liceaga
Vocal: Dra. Lilia López Cánovas
1^{er}. Suplente: Dr. José de Jesús Olivares

Lugar donde se realizó el posgrado:

PLANTEL DEL VALLE, UACM.

Comité Tutorial:

Dra. Elisa Irene Azuara Liceaga, UACM
Dra. Lilia López Cánovas, UACM
Dr. Jesús Valdés Flores, Cinvestav-IPN
Dr. Francisco Rendón Gandarilla, UAGro
Dra. Rosa Elena Cárdenas Guerra, UNAM.

Lectores de tesis

Dra. Lilia López Cánovas, UACM
Dr. Jesús Valdés Flores, Cinvestav-IPN
Dr. José de Jesús Olivares Trejo, UACM

Este proyecto fue realizado en el laboratorio 2 del Posgrado en Ciencias Genómicas de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México plantel del Valle bajo la dirección de la Dra. Elisa Irene Azuara Liceaga en colaboración con el Centro de Investigación en Estudios Avanzados del IPN y gracias al apoyo financiero de CONACYT para la beca para realizar estudios de maestría (No. de becario 586852) y para el proyecto: Factores de unión a repetidos teloméricos (TRFs) de *E. histolytica*: la importancia de mantener la integridad del genoma (222956) otorgado a la Dra. Elisa Irene Azuara Liceaga.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Elisa, por permitirme formar parte de su equipo de trabajo, por su paciencia y apoyo que siempre me brindó para la realización y avance de este proyecto.

A la Dra. Abigail, por su disposición que tuvo conmigo en todo momento, por su atención y sugerencias que me prestó para el avance de este trabajo,

Al Dr. Jesús Valdés, por su valiosa asesoría y sus acertadas observaciones que fueron de gran ayuda en el desarrollo del proyecto.

A la Dra. Esther Orozco, por el apoyo que me dio al darme la oportunidad de colaborar con su grupo de investigación y con el cual aprendí más allá del tema con las aportaciones que me brindaron.

Al Dr. Francisco Rendón, por sus comentarios y sus atinadas observaciones que sin duda enriquecieron el avance de este proyecto.

A la Dra. Rosa E. Cárdenas, por su paciencia y asesoría que me brindó durante la realización de este proyecto y por sus enseñanzas en el ámbito científico que enriquecieron mi formación académica.

Al M. en C. Eduardo Carrillo, por su disposición que tuvo conmigo en el proceso de los experimentos de secuenciación.

Al QBP José Manuel Galindo Rosales por su colaboración en la clonación de los genes *ehtrf-like* y a Brenda Verenice Herrera Villalobos ya que gracias su trabajo tuve el material de laboratorio cuando era requerido.

A mis compañeros y amigos de laboratorio Vanessa, Francisco, David, Rosa, Jaqueline, Helios, Daniela, Karen, Luis, Euclides, Olga, Raúl, Ivon, Iraíz, Martha y Fany que hicieron ameno el ambiente de laboratorio y que sin duda aprendí algo de cada uno de ellos.

A mis amigos de la maestría Frederick, Yareli, David, Jorge, Mónica y Diana que con su compañía, apoyo y motivación incentivaron mis ganas de seguir aprendiendo y coadyuvaron de alguna manera en mi formación académica.

DEDICATORIA

A mi madre Graciela Hernández, por su apoyo en todo momento, por darme palabras de aliento y motivarme cada día para no decaer y poder seguir adelante en la lucha por cumplir mis metas y sueños.

A mi padre Fabián Álvarez por su apoyo incondicional, sus enseñanzas y el impulso que me brinda en esta vida para seguir superándome.

A mi hermano Manuel Álvarez por su apoyo, por los momentos agradables y divertidos que pasamos y que este logro te sirva de ejemplo para que tú también te superes y luches por tus metas.

ÍNDICE

1. RESUMEN	7
2. ABSTRACT	8
3. INTRODUCCIÓN	9
3.1. Telómeros.....	9
3.2. Complejo de <i>Shelterin</i>	12
3.2.1. Características de las proteínas del Shelterin	13
3.3. Modificaciones Postraduccionales de las proteínas TRF	18
3.4. Proteínas que interaccionan con TRF1 y TRF2.....	22
3.5. Complejo de Shelterin en otros microorganismos	24
3.6. Localización nuclear del complejo telomérico	27
3.7. Nucleosomas teloméricos.....	27
3.8. <i>Entamoeba histolytica</i>	28
3.9. Ciclo de vida de <i>E. histolytica</i>	29
3.10. El genoma de <i>E. histolytica</i>	30
3.11. Cromosomas en <i>E. histolytica</i>	32
3.12. Regiones teloméricas en <i>E. histolytica</i>	34
3.13. Dominio de unión a DNA MYB (DBD MYB) en <i>E. histolytica</i>	34
3.14. Proteínas EhTRF-like de <i>E. histolytica</i>	36
3.15. Antecedentes particulares	38
4. JUSTIFICACIÓN	40
5. HIPÓTESIS.....	40
6. OBJETIVO GENERAL	40
7. OBJETIVOS PARTICULARES.....	40
8. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.....	41
9. METODOLOGÍA	42
9.1. Cultivo de trofozoítos de <i>E. histolytica</i>	42
9.2. Clonación del gen <i>ehtrf-like I</i> en el vector pKT3M	42
9.3. Purificación de los fragmentos para la ligación	43
9.3.1. Purificación del plásmido pKT-3M.....	43
9.3.2. Purificación del gen <i>ehtrf-like I</i>	44
9.4. Ligación del vector pKT-3M y el gen <i>ehtrf-like I</i>	44

9.5. Transformación de células DH5 α con la reacción de ligación pKT-3M- <i>ehtrf-like I</i> ..	45
9.6. Extracción del DNAP de las clonas candidatas.....	45
9.7. Análisis del plásmido pKT-3M que contiene al gen <i>ehtrf-like I</i> mediante digestión con las enzimas de restricción <i>SmaI</i> y <i>XhoI</i>	45
9.8. Secuenciación de la construcción pEhTRF-like I ox.....	47
9.9. Purificación de las reacciones de secuenciación de las clonas positivas.....	49
9.10. Purificación del plasmido pKT-3M y el pEhTRF-like I ox para la transfección.....	50
9.11. Transfección de los trofozoítos con la construcción pEhTRF-like I ox.....	50
9.12. Extracción y cuantificación del RNA total.....	51
9.13. Ensayos de RT-PCR para determinar la sobreexpresión del gen <i>ehtrf-like I</i>	52
9.14. Ensayos de RT-qPCR para determinar la sobreexpresión del gen <i>ehtrf-like I</i>	55
9.15. Obtención de extractos totales de los trofozoítos de <i>E. histolytica</i>	55
9.16. Obtención de extractos citoplásmicos y nucleares solubles e insolubles.....	56
9.17. Ensayos de Inmunodetección para determinar la sobreexpresión de la proteína EhTRF-like I y su localización.....	57
9.18. Transferencia de las proteínas separadas por SDS-PAGE a membranas de nitrocelulosa.....	57
9.19. Ensayos de inmunolocalización para determinar la localización de la proteína EhTRF-like I y la colocalización de las proteína EhTRF-like I, EhTRF-like III, Laminina B1 y la marca telomérica H4K20me3 en trofozoítos transfectados.....	57
9.20. Marcaje de los anticuerpos α -EhTRF-like I, α -EhTRF-like III, α -Laminina B1 y α -H4K20me3.....	57
9.21. Ensayos de inmunoprecipitación para identificar proteínas que interactúen con EhTRF-like I.....	60
9.22. Cuantificación de las proteínas.....	61
9.23. Tinción de Plata.....	63
9.24. Búsqueda de proteínas homólogas en otros organismos.....	63
10. RESULTADOS.....	65
10.1. Localización de la proteína EhTRF-like I en las diferentes fracciones celulares...	65
10.2. Localización de la proteína EhTRF-like I por inmunofluorescencia.....	73
10.3. Localización de las proteínas Laminina B1, H4K20me3 y EhTRF-like III en trofozoítos de <i>E. histolytica</i>	73
10.4. Clonación del gen <i>ehtrf-like I</i> en el plásmido pKT-3M.....	76
10.5. Secuenciación de la construcción pEhTRF-like I ox.....	78
10.6. Análisis de la sobreexpresión del gen <i>ehtrf-like I</i>	82
10.7. Análisis de la sobreexpresión de la proteína EhTRF-like I.....	84
10.8. Localización subcelular de la proteína EhTRF-like I heteróloga.....	85

ÍNDICE DE TABLAS

	Página
Tabla 1. Secuencias teloméricas de diferentes organismos.	11
Tabla 2. Modificaciones postraduccionales de TRF1 y TRF2.	21
Tabla 3. Proteínas que interaccionan con las proteínas TRF1 y TRF2.	23
Tabla 4. Comparación de las proteínas EhTRF-like de <i>E. histolytica</i> con TRF1 y TRF2 de <i>Homo sapiens</i> .	37
Tabla 5. Reacción de ligación entre el vector pKT-3M y el inserto <i>ehtrf-like I</i> .	45
Tabla 6. Reacción de doble digestión de la construcción pEhTRF-like I ox.	47
Tabla 7. Reacción para la PCR de secuenciación de la construcción pEhTRF-like I ox.	48
Tabla 8. Condiciones de reacción de RT para la obtención de cDNA.	52
Tabla 9. Condiciones de reacción de PCR.	54
Tabla 10. BSA 1200 ng/μL.	57
Tabla 11. Curva de BSA 0-1200 ng/mL.	57
Tabla 12. PTMs predichas en la proteína EhTRF-like I.	69
Tabla 13. PTMs predichas en EhTRF-like I y genes que codifican para enzimas modificadoras presentes en el genoma de <i>E. histolytica</i> .	72
Tabla 14. Proteínas candidatas para formar parte del complejo de Shelterin de <i>E. histolytica</i> .	92
Tabla 15. Proteínas que interaccionan con EhTRF-like I.	94
Tabla 16. Proteínas de la vía ALT identificadas en <i>E. histolytica</i> .	95

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Estructura del telómero humano.	12
Figura 2. Complejo de <i>Shelterin</i> .	13
Figura 3. Características de las proteínas TRF1 y TRF2.	16
Figura 4. Modificaciones Postraduccionales en TRF1 y TRF2.	18
Figura 5. Proteínas que interaccionan con TRF1 y TRF2.	24
Figura 6. Complejos de protección telomérica en algunas especies.	26
Figura 7. Anclaje telomérico nuclear.	27
Figura 8. Marcas de heterocromatina telomérica.	28
Figura 9. Ciclo de vida de <i>E. histolytica</i> .	30
Figura 10. Análisis de isocoros de las regiones terminales de los cromosomas.	32
Figura 11. Estructura de un núcleo de <i>E. histolytica</i> en profase tardía.	33
Figura 12. Familias de proteínas que contienen el DBD MYB.	36
Figura 13. Dominio de unión a DNA (DBD MYB) de las proteínas EhTRF-like.	37
Figura 14. Esquema de la estructura de las proteínas EhTRF-like y hTRF.	38
Figura 15. Localización de la proteína EhTRF-like III en el núcleo de <i>E. histolytica</i> .	39
Figura 16. Vector de sobreexpresión pKT-3M.	43
Figura 17. Condiciones utilizadas para la amplificación del gen <i>ehtrf-like I</i> para su secuenciación de las clonas positivas obtenidas de la ligación.	49
Figura 18. Condiciones de RT para síntesis de cDNA.	53
Figura 19. Condiciones de amplificación para la reacción de PCR del gen <i>ehtrf-like I</i> .	54
Figura 20. Titulación de anticuerpo α -EhTRF-like I.	66
Figura 21. Detección de la proteína EhTRF-like I de <i>E. histolytica</i> en las diferentes fracciones celulares.	68
Figura 22. PTM conservadas en la proteína EhTRF-like I.	71
Figura 23. Esquema de las posibles PTM de la proteína EhTRF-like I.	72

Figura 24. Localización de la proteína EhTRF-like I.	74
Figura 25. Localización de las proteínas Laminina B1, H4K20me3 y EhTRF-like III en trofozoítos de <i>E. histolytica</i> .	75
Figura 26. Selección y purificación de los plásmidos para subclonar el gen <i>ehtrf-like I</i> .	77
Figura 27. Subclonación del gen <i>ehtrf-like I</i> en el plásmido pKT-3M.	78
Figura 28. Alineamiento de la secuencia del gen <i>ehtrf-like I</i> de la clona obtenida de la construcción pEhTRF-like I ox y la secuencia de la base de datos AmoebaDB.	80
Figura 29. Alineamiento de las secuencias de aminoácidos de la proteína codificada por el gen <i>ehtrf-like I</i> clonado y la secuencia de aminoácidos obtenida de la base de datos AmoebaDB de la proteína EhTRF-like I.	81
Figura 30. Plásmidos pKT-3M y pEhTRF-like I ox purificados para transfección.	82
Figura 31. Sobreexpresión del gen <i>ehtrf-like I</i> en los trofozoítos transfectados.	83
Figura 32. Sobreexpresión de la proteína EhTRF-like I.	84
Figura 33. Inmunodetección de la proteína EhTRF-like I en trofozoítos transfectantes.	86
Figura 34. Localización subcelular de proteína EhTRF-like I heteróloga en los trofozoítos.	87
Figura 35. Colocalización de EhTRF-like I y EhTRF-like III, Laminina B1 y H4K20me3.	89
Figura 36. . Interactomas de las proteínas TRF1 y EhTRF-like I.	93
Figura 37. Proteínas inmunoprecipitadas con los anticuerpos α -tag Myc y α -EhTRF-like I.	97
Figura 38. La proteína EhTRF-like I coprecipita con Laminina B1.	99
Figura 39. Modelo de la localización de la proteína EhTRF-like I.	107

ABREVIATURAS

A	Adenina
aa	Aminoácidos
ALT	Elongación alternativa de los telómeros
ATM	Ataxia Telangiectasia Mutada
APBs	cuerpos asociados a la vía alternativa de mantenimiento de telómeros del inglés ALT-associated bodies
ATR	Proteína relacionada Ataxia Telangiectasia Mutada y Rad3 del inglés, Ataxia Telangiectasea and Rad3 related
BSA	Albumina Bovina Sérica
°C	Grados Celsius
C	Citocina
c-MYB	Contraparte celular del gen del virus de la mieloblastosis aviar
Da	Daltones
DAPI	4',6-diamino-2-fenilindol
DBD-MYB	Dominio de unión a DNA tipo MYB
DDR	Respuesta al Daño en el DNA
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNAc	DNA plasmídico
DNAp	DNA complementario
dNTPs	Deoxinucleótidos trifosfatados
EDTA	Ácido etilendiamino tetra acético
EGTA	Ácido etilendiaminoglicol tetra acético
EhMYB	Proteína con dominio tipo MYB en <i>E. histolytica</i>
EhTRF	TRFs homólogas en <i>E. histolytica</i>
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
g	Gravedades

GAR	Región rica en Glicina y Arginina
G	Guanina
h	Hora
H	Histona
HTH	Conformación "hélice-vuelta-hélice"
KDa	Kilodaltones
Kb	Kilobases
KLH	Hemocianina de lapa californiana
mL	Mililitros
mg	Miligramos
μ M	Micromolar
mM	Milimolar
μ g	Microgramos
μ L	Microlitros
min	Minutos
nm	Nanómetros
ng	Nanogramos
NHEJ	Recombinación no homologa del inglés, Non Homologous End Joining
NLS	Señal de localización nuclear
OB	Dominio de reconocimiento de Oligosacáridos/Oligonucleótidos/Oligopéptidos
pb	pares de bases
PBS	Solución salina amortiguadora con fosfatos
PCR	Reacción en cadena de la Polimerasa
pH	Potencial de Hidrógeno
pI	Punto isoeléctrico
PM	Peso molecular
POT1	Proteína de protección a telómeros, del inglés, Protection of Telomeres Protein-1

PTM	Modificación post-traducciona, del inglés Post-Translational Modification
qRT-PCR	RT acoplada a l2a PCR cuantitativa
RAP1	Proteína represora/activadora del inglés, Represor/activador protein 1
RCT	C-terminal de RAP1
RNA	Ácido ribonucleico
RNAm	RNA mensajero
rpm	Revoluciones por minuto
RT	Retrotranscripción
RT (-)	Control negativo para RT
SDS-PAGE	Geles desnaturizantes de poliacrilamida
s	Segundos
T	Timina
TCA	Ácido Trichloroacetico
TEM	Microscopia electrónica de transmisión
TERT	Telomerasa
Tm	Temperatura de fusión para del primer
TIN2	Proteína de interacción a TRF1 del inglés, TRF1 interacting nuclear protein 2
TPP1	Proteína organizadora de POT1/TIN2, del inglés, POT1-TIN2 Organizing Protein
TRF1/2	Factor de unión a repetidos teloméricos 1 y 2, del inglés, Telomeric repeat binding factor 1
TRFH	Dominio de homodimerización de TRF
V	Volts
%ID	Porcentaje de identidad
WB	Western blot

1. RESUMEN

La regulación de la síntesis de los telómeros y la protección de los extremos de los cromosomas es llevada a cabo por la acción combinada de varias proteínas. Uno de los complejos más importantes en la función telomérica es el complejo de *Shelterin*, el cual está conformado por seis proteínas: TRF1, TRF2, RAP1, Pot1, TPP1 y TIN2. La especificidad de la unión al DNA telomérico es debida a los Factores de unión a repetidos teloméricos 1 y 2 (TRF1 y TRF2). TRF1 y TRF2 se unen al DNA de doble cadena como homodímeros a través de su dominio de unión a DNA tipo MYB (MDBD), mientras que la dimerización es mediada por su dominio de homología (TRFH). Previamente nuestro grupo de trabajo identificó 3 genes que codifican para proteínas tipo TRF en *Entamoeba histolytica*. Estas proteínas fueron llamadas EhTRF-like I, II y III. EhTRF-like I y II comparten similitud con TRF1, mientras que EhTRF-like III comparte similitud con TRF2. Para analizar la función de la proteína EhTRF-like I en este estudio se sobreexpresó el gen completo en trofozoítos de *E. histolytica* para producir una proteína heteróloga fusionada a una etiqueta *tag* de Myc. La sobreexpresión se corroboró por medio de qRT-PCR, western blot y por microscopía confocal. También se realizó un fraccionamiento subcelular y por medio de inmunodetección usando un anticuerpo policlonal α -EhTRF-like I generado en el laboratorio, donde se observó a la proteína EhTRF-like I en la fracción nuclear. La proteína EhTRF-like I fue localizada en periferia nuclear como ha sido reportado en levaduras, plantas y eucariontes superiores, colocalizando con otras proteínas como son EhTRF-like III, la marca de heterocromatina telomérica H4K20me3 y la proteína Laminina B1. Al realizar un ensayo de inmunoprecipitación utilizando el anticuerpo α -EhTRF-like I se inmunoprecipitó a la proteína Laminina B1 lo cual corrobora su interacción. También, se inmunoprecipitaron varias proteínas de bajo y alto peso molecular las cuales podrían corresponder a proteínas involucradas en los mecanismos de protección telomérica. Estos resultados sugieren que el papel de la proteína EhTRF-like I en *E. histolytica* podría ser similar a otros organismos participando en la protección de los extremos de los cromosomas.

2. ABSTRACT

The regulation of telomere synthesis and the protection of the ends of chromosomes is carried out by the combined action of several proteins. One of the most important complexes in the telomeric function is the Shelterin complex, which is composed by six proteins: TRF1, TRF2, RAP1, Pot1, TPP1 and TIN2. The specificity of the binding to telomeric DNA is due to the TRF1 and TRF2 proteins. TRF1 and TRF2 bind to double-stranded DNA as homodimers through their DNA-binding domain type MYB (MDBD), while dimerization is mediated by their homology domain (TRFH). Previously, our working group identified three genes that code for TRF type proteins in *Entamoeba histolytica*. These proteins were called EhTRF-like I, II and III. EhTRF-like I and II share similarity with TRF1, while EhTRF-like III shares similarity with TRF2. To analyze the function of the EhTRF-like I protein in this study, the complete gene was overexpressed in *E. histolytica* trophozoites to produce a heterologous protein fused to a Myc tag. Overexpression was corroborated by qRT-PCR, immunodetection and by confocal microscopy. Subcellular fractionation and immunodetection were also performed using an α -EhTRF-like I polyclonal antibody generated in the laboratory, where the EhTRF-like I protein was observed in the nuclear fraction. The EhTRF-like I protein was located in nuclear periphery as has been reported in yeasts, plants and upper eukaryotes, co-localizing with other proteins such as EhTRF-like III, the telomeric heterochromatin label H4K20me3 and the Laminin B1 protein. Several proteins of low and high molecular weight were observed in immunoprecipitation assays using the α -EhTRF-like I antibody, which could correspond to proteins involved in the telomeric protection mechanisms and which are carrying out a role together with the study protein EhTRF-like I. These results suggest that the role of this protein in *E. histolytica* could be similar to other organisms participating in the protection of the ends of chromosomes.

3. INTRODUCCIÓN

3.1. Telómeros

Los telómeros son complejos específicos de proteína-DNA que protegen los extremos de los cromosomas lineales eucarióticos que ayudan a mantener la integridad del genoma. Su principal función es prevenir que el extremo sea reconocido y procesado como DNA dañado, prevenir las fusiones entre cromosomas, y permitir la replicación completa de los extremos de DNA. La pérdida de la función de protección resulta en inestabilidad genética y pérdida de viabilidad celular (Rhodes *et al.*, 2002; Sandin *et al.*, 2004; Bianchi *et al.*, 2004). Las tres funciones principales de los telómeros son: 1) Estabilidad del cromosoma y protección de sus extremos: evitan que los extremos cromosomales sean degradados de las exonucleasas celulares así como la unión de los extremos no homólogos (NHEJ). Permiten a las células diferenciar entre los extremos naturales de los cromosomas y el ADN dañado y mantienen la integridad de los cromosomas permitiendo la replicación sin pérdida de secuencias codificantes. 2) Registran el número de divisiones celulares al mantener un registro del número de divisiones celulares y determinan la vida celular y el momento de ocurrencia de la senescencia replicativa. 3) Suministrar un mecanismo para replicar los extremos del DNA. Ya que la replicación discontinua en la hebra retrasada requiere la participación de los fragmentos de Okazaki, la telomerasa añade repeticiones de hexámeros a los extremos 3', permitiendo a la DNA polimerasa completar la síntesis de la hebra opuesta (Musgrove, 2017).

El DNA telomérico consiste de repeticiones de secuencias en *tándem* que contienen generalmente grupos de tres o cuatro guaninas (TTGGGG en *Tetrahymena thermophila* y TTAGGG en *Homo sapiens*) (Tabla 1). La cadena rica en G se extiende en la dirección 3' formando un extremo sobresaliente que actúa como sustrato para la elongación mediada por la enzima telomerasa (Rhodes *et al.*, 2012). La longitud de los repetidos teloméricos varía entre diferentes organismos siendo en humanos generalmente de 10-15 kilobases (kb) y el extremo 3' varía entre 50-500 nt (Palm, 2008). Se ha reportado que por ejemplo aunque en levaduras la organización telomérica es similar a la de otros eucariotes, algunas especies muestran variabilidad en la secuencia y longitud de sus

repetidos teloméricos siendo las unidades de repetidos frecuentemente muy largas de hasta >20 pb, a veces heterogéneos, y no siempre ricos en GC. Incluso especies estrechamente relacionadas como *Candida parapsilosis*, *C. orthopsilosis* y *C. metapsilosis* exhiben diferencias en la secuencias de sus repetidos teloméricos con una alta frecuencia de sustituciones de nucleótidos (Sepsiova, 2016). En *P. falciparum* la longitud del arreglo telomérico muestra variación por ejemplo su tamaño es de 1.2 kb y en *P. vivax* su tamaño es de 6.7 kb. Se ha descrito la presencia de repetidos llamados repetidos asociados a telómeros (TAREs) en este parásito los cuales siempre se encuentran en el mismo orden y abarcan de 20-40 kb e interesantemente se ha reportado que estas secuencias asociadas a telómeros no codificantes (TASs) son ricas en AT como las regiones codificantes (70% AT) (Scherf, 2001). En *Leishmania* spp. el extremo cromosomal contiene la secuencia de repetidos teloméricos conservada como 5'-TTAGGG-3' pero por ejemplo, los telómeros de *Leishmania braziliensis* tienen un repetido telomérico no conservado 5'-CCTAACCCGTGGA-3'. Adyacente a los telómeros hay regiones subteloméricas que contienen numerosos repetidos polimórficos en este parásito y estas secuencias adyacentes a los telómeros son referidas como secuencias conservadas asociadas a telómeros de *Leishmania* (LCTAS) que son de alrededor de 100 pb de longitud y se componen de dos bloques conservados CSB1 y CSB2 separados de 1-51 pb (Conte, 2005). En *Trypanosoma brucei* los telómeros consisten de secuencias de repetidos TTAGGG y las cuales son mantenidas por la enzima telomerasa y en las que interesantemente se ha reportado que contienen genes adyacentes tipo VSG que les confieren la capacidad de evadir la respuesta del huésped. Estas secuencias se localizan en regiones subteloméricas por lo que se ha sugerido que los telómeros de este organismo juegan un rol en la variación antigénica (Li, 2005).

Los telómeros se acortan en cada división celular debido a la incapacidad de la DNA polimerasa para replicar el DNA lineal hasta el final por lo que los telómeros al cortarse se vuelven no funcionales llevando a un arresto del ciclo celular llamado senescencia. En varios tipos celulares (en células troncales, células cancerígenas o de la línea germinal) y organismos esto es contrarrestado por la elongación la cuál es realizada por una enzima reversa transcriptasa específica de telómeros, llamada telomerasa. Cuando la actividad de la telomerasa es baja o ausente, la longitud del telómero es mantenida

por un sistema basado en recombinación denominado vía de Alargamiento alternativo del telómero (vía ALT) (Giarud, 2013).

Tabla 1. Secuencias teloméricas de diferentes organismos

ORGANISMOS	REPETIDO TELOMERICO
<u>Vertebrados</u> <i>Homo sapiens</i>	TTAGGG
<u>Artrópodos</u> <i>Bombix mori</i>	TTAGG
<u>Protistas</u> <i>Oxytricha</i> <i>Plasmodium</i> <i>Giardia</i> <i>Trypanosoma</i>	TTTTGGGG TT[T/C]AGGG TAGGG TTAGGG
<u>Algas verdes</u> <i>Chlamydomonas</i>	TTTTAGGG
<u>Plantas</u> <i>Arabidopsis thaliana</i>	TTTAGGG
<u>Hongos</u> <i>S. cerevisiae</i>	TG ₂₋₃ (TG) ₁₋₆
<i>Sch. Pombe</i>	G ₀₋₆ GGTTACAC ₀₋₁
<i>Kluyveromyces Lactis</i>	ACGGATTTGATTAGGTATGTGGTG (TGATTAGGTATGTGGTGTACGGATTT)

*Conte, 2005; Li, 2005; Scherf, 2001.

Los telómeros se encuentran organizados en una estructura de dúplex grande, el t-loop. El t-loop es formado a través de la invasión del dúplex telomérico por la cadena sobresaliente 3' apareándose en una estructura de tipo cuádruplex con la cadena rica en C y formando el sitio de desplazamiento denominado como D-loop. El t-loop también se ha encontrado en tripanosomas, ciliados, plantas, *Caenorhabditis elegans*, y en levaduras (Palm, 2008) (Fig. 1).



Figura 1. Estructura del telómero humano. Se muestra la formación del t-loop y el D-loop. Tomado de (Palm, W., 2008).

3.2. Complejo de *Shelterin*

Los repetidos TTAGGG de los extremos de los cromosomas en los mamíferos se asocian con un complejo de seis proteínas llamado “*Shelterin*” que permite a las células distinguir los extremos de los cromosomas normales del DNA dañado, reprimiendo reacciones de reparación y regulando el mantenimiento de la longitud del telómero a través de la telomerasa (Fig. 2). Los componentes del *Shelterin* son abundantes en los telómeros durante el ciclo celular y se ha visto que la pérdida de alguno de los componentes de este complejo puede inducir aberraciones cromosomales activando vías de reparación como la unión no homóloga (NHEJ) mediada por DNA ligasa IV o por activación directa de la vía de señalización por daño al DNA dependiente de ATM (Palm, 2008).

La especificidad del *Shelterin* por el DNA telomérico es debida al reconocimiento de los repetidos TTAGGG por tres de sus componentes: Factor de unión a repetidos teloméricos 1 y 2 (TRF1 y TRF2) que se unen a la cadena doble, mientras que la proteína de Protección de Telómeros 1 (POT 1) puede unirse a repetidos de cadena sencilla en el extremo 3' (Diotti, 2011). TRF1 y TRF2 reclutan los otros cuatro componentes del *Shelterin* a los telómeros: a TIN2, la proteína de interacción nuclear 2 de TRF 1 y 2, Rap1 (Proteína Activadora/Represora 1), TPP1 (anteriormente conocido como TINT1, PTOP, o PIP1) y POT 1 (Diotti, 2011; De Lange, 2005) (Fig. 2).

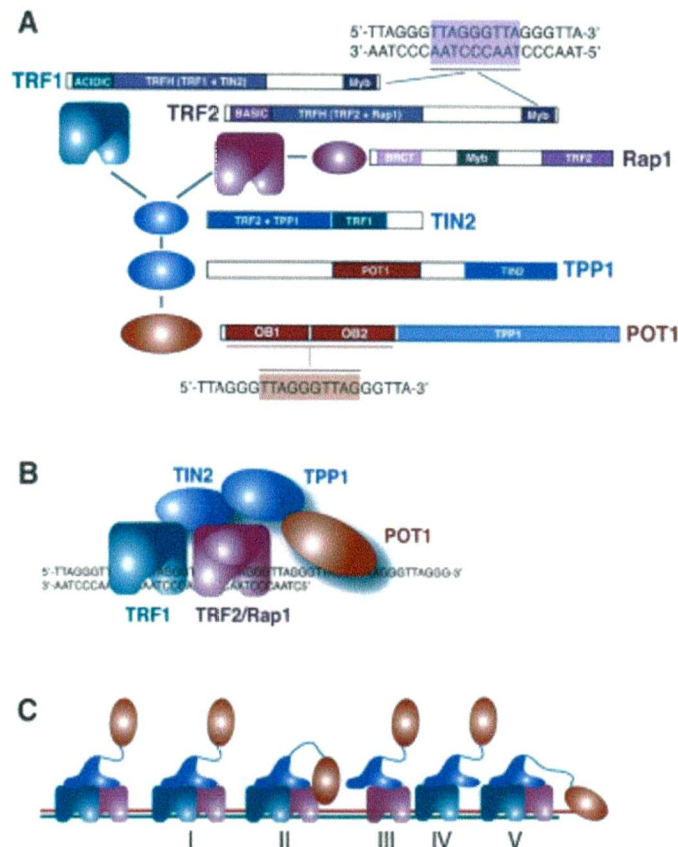


Fig. 2. Complejo de Shelterin. A) Se muestran las seis subunidades del complejo Shelterin, sus dominios, interacciones y secuencias de unión al DNA. B) Esquema del complejo Shelterin sobre los telómeros. C) Subcomplejos del Shelterin sobre los telómeros (De Lange, T., 2005).

3.2.1. Características de las proteínas del Shelterin

- **TRF1 (Factor de unión a repetidos teloméricos 1 del inglés, Telomeric Repeat Binding Factor 1).** Proteína de aprox. 50 kDa, contiene un dominio común homólogo denominado TRFH, una región N-terminal rica en aminoácidos ácidos y un dominio de unión a DNA (DBD) MYB en su extremo C-terminal específico para la unión a la secuencia de DNA de doble cadena 5'-TTAGGG-3' (Fig. 3). Se expresa de manera ubicua a lo largo del ciclo celular y son muy abundantes ya que se requieren para proteger a los telómeros con miles de dímeros. TRF1 interactúa con otras proteínas como PINX1, ATM, BLM, DNA-PKcs, Tankirasa 1/2 y es conectado al complejo por TIN2. Ha sido propuesto como un inhibidor de la telomerasa actuando en *cis* para limitar la elongación del extremo cromosomal. Previene la activación de ATM y ATR,

además TRF1 puede ser modificado postraduccionalmente por medio de parsilaciones, ubiquitinaciones, SUMOilaciones y fosforilaciones (De Lange, 2005; Palm, 2008).

TRF1, está implicada en la replicación del telómero, protección del telómero, mantenimiento de la longitud telomérica y la resolución de telómeros hermanos. El gen de *trf1* es esencial ya que se ha reportado que el knockout de TRF1 lleva a la letalidad embrionaria. También se ha reportado que la delección de *trf1* promueve la formación de telómeros frágiles, un tipo de anormalidad que puede ser causada por defectos dependientes de la replicación. Ha sido sugerido que TRF1 es requerida para mantener la replicación eficiente del DNA telomérico (Sfeir, 2009). La sobreexpresión de TRF1 promueve el acortamiento telomérico, mientras que la pérdida de TRF1 de los telómeros ha mostrado que induce un alargamiento dependiente de la telomerasa, sugiriendo que TRF1 regula negativamente la extensión de los telómeros dependiente de telomerasa dado que restringe el acceso de ésta al extremo telomérico (Walker, 2012).

TRF1 también ha sido implicado en la regulación del huso mitótico así como también en la regulación de los telómeros en las cromátidas hermanas ya que recientemente se ha mostrado que la sobreexpresión de TRF1 mutada en la una Serina la cual es fosforilada por la cinasa dependiente de ciclina B (Cdk1) lleva al bloqueo de la resolución de las cromátidas hermanas (McKerlie, 2011).

- **TRF2 (Factor de unión a repetidos teloméricos 2 del inglés, Telomeric Repeat Binding Factor 2).** Proteína con un peso molecular de 59 kDa contiene un dominio común homólogo (TRFH), una región N-terminal rica en aminoácidos básicos conteniendo Gly/Arg (dominio GAR) y un dominio de unión a DNA MYB en su extremo C-terminal (Figura 3). Se expresa de manera ubicua a lo largo del ciclo celular y es una proteína igual de abundante que TRF1. TRF2 ha sido implicado en la remodelación del DNA telomérico en el t-loop, puede reclutar proteínas como ATM, MRN, WRN, BLM, Ku86, ERCC1/XPF y es conectado al complejo por TIN2 y RAP1.

Se ha encontrado que TRF2 se une inhibiendo la unión de la proteína ATM y reprimiendo una respuesta de daño a DNA. TRF2 puede ser también fosforilada o SUMOilata y su asociación telomérica se incrementa en la fase S (De Lange, 2005; Palm, 2008).

TRF2 es mejor conocida por su protección en los telómeros ya que se ha reportado que la remoción de TRF2 de los telómeros ya sea a través de la sobreexpresión de un alelo dominante negativo de TRF2 sin el dominio básico GAR y sin el DBD MYB o la delección de TRF2 resulta en la pérdida de los extremos sobresalientes del telómero, y ésta pérdida se sugiere que es mediada por el complejo XPF/ERCC1, una endonucleasa que está involucrada en la reparación por excisión de nucleótidos (vía NER) (Walker, 2012).

Se ha reportado que al sobreexpresar versión mutada de la proteína TRF2 la cual carece de su dominio GAR promueve la recombinación del DNA en los telómeros resultando en la disminución de la longitud telomérica y la formación de círculos teloméricos, además se ha visto que sustituciones de argininas a lisinas en el dominio básico de TRF2 induce la acumulación de dobletes teloméricos. Estos hallazgos han sugerido un rol crucial de TRF2 en el mantenimiento de la integridad de la estructura telomérica (Walker, 2012).

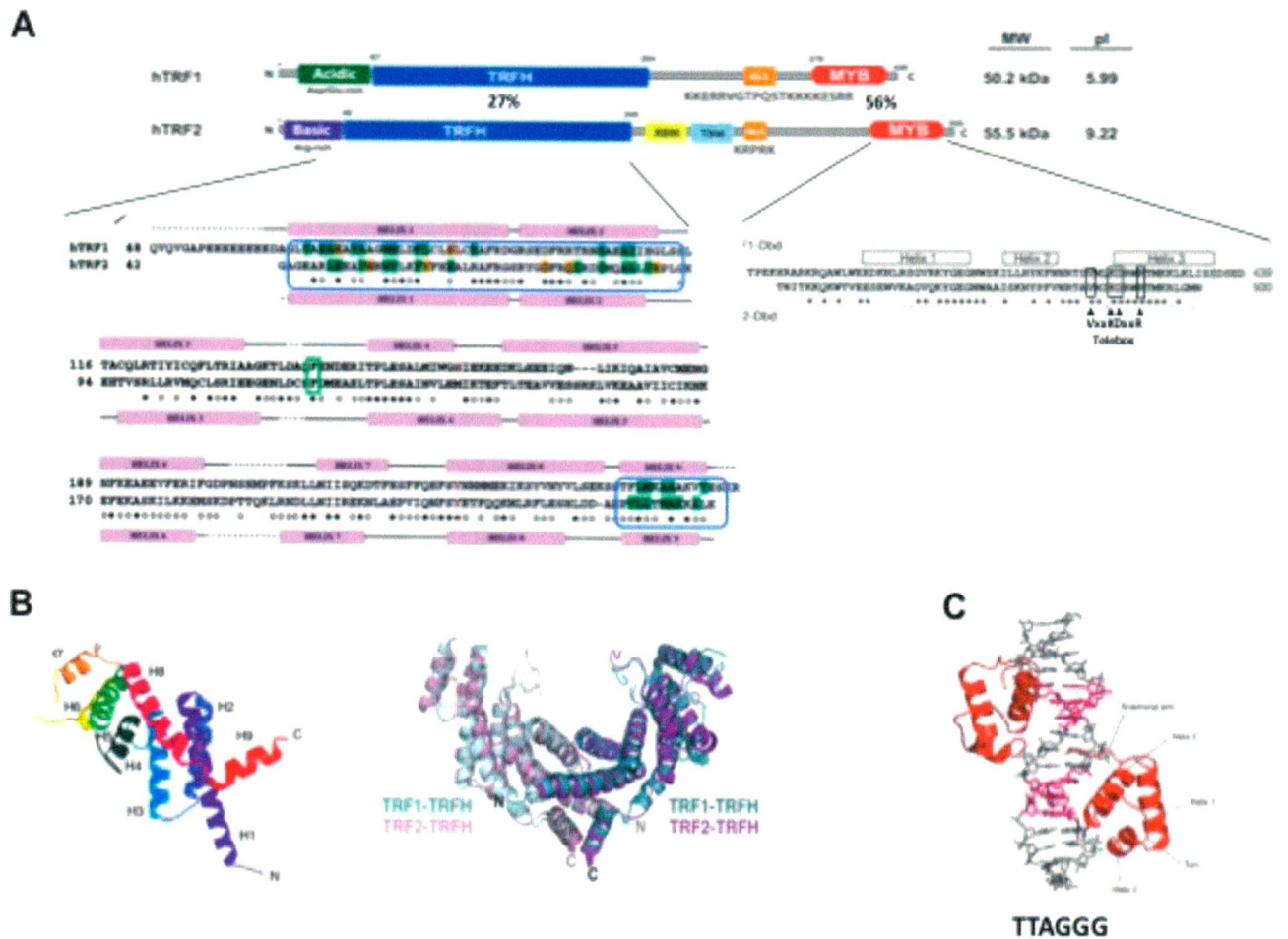


Figura 3. Características de las proteínas TRF1 y TRF2. En A) se muestra un esquema de TRF1 y 2 mostrando su dominio amino terminal ácido para TRF1 y básico para TRF2, su dominio de homodimerización en azul y DBD MYB. En la derecha se muestra el peso molecular teórico y el punto isoeléctrico de las proteínas TRF1 y TRF2. B) Estructura tridimensional del dominio TRFH de las proteínas TRF mostrando sus 9 alfa hélices, también se muestra la estructura tridimensional del dominio homodimerizado. C) Estructura tridimensional del DBD MYB de las proteínas TRF, el cual muestra las tres alfa hélices del DBD interaccionando en el surco mayor del DNA y la secuencia telomérica canónica (Tomado de Lewis, 2012).

- **TIN2 (del inglés TRF1 Interacting Nuclear Protein 2)** de aprox. 50 kDa ocupa una posición central en el complejo de shelterin capaz de unirse a TRF1, TRF2, y TPP1, lo que provee un vínculo de unión entre los componentes del *Shelterin* que se unen al DNA de una y doble cadena. TIN2 también recluta a TPP1 y entonces a POT1 al complejo usando un sitio de interacción localizado en su región N-terminal manteniendo así la estructura del complejo (Palm, 2008). Las principales funciones de esta proteína son: 1) Regular la longitud del telómero a través de la unión del

extremo NH₂-terminal con TRF1. 2) Mutaciones en TIN2 que carecen del extremo NH₂-terminal está relacionada con telómeros más largos. 3) Promueve el emparejamiento de las repeticiones teloméricas dependientes de TRF1.

- **TPP1 (formalmente conocida como TINT1, PTOP, ó PIP1, del inglés POT1-TIN2 Organizing Protein)** con un peso molecular de aprox. 61 kDa conecta a POT1 con TIN2 a través de su dominio de interacción con POT1 y su dominio de interacción en C-terminal con TIN2. Esta proteína puede reclutar a la telomerasa por un dominio en su N-terminal por lo que tiene función de reclutamiento y regulación de la telomerasa (Palm, 2008).
- **POT1 (del inglés Protection of telomeres protein-1)** con una masa molecular de aprox. 71 kDa sirve para proteger el extremo telomérico 3' de la telomerasa y del mecanismo de senso de daño a DNA mediante inhibición la inhibición de la proteína ATR. Esta proteína posee dos dominios en su región N-terminal con los cuales puede reconocer la cadena rica en G telomérica, el dominio OB-fold (oligonucleotide/oligosaccharide binding fold) que se une al DNA de una sola hebra. Este dominio OB-fold es caracterizado por tener una combinación de secuencias conservadas con una estructura tridimensional conservada; esta forma un barril beta de aproximadamente 100 residuos compuestos de dos hojas beta antiparalelas, la primer cadena beta corresponde a ambas hojas beta y son cubiertas por un α -hélice en un extremo, y presentan un sitio de unión en el otro extremo. La conexión de los loops entre las hojas beta varían entre especies en términos de secuencia, longitud, y conformación, contribuyendo a las especificidades de los dominios OB-folds (Giraud, 2013; Palm, 2008; De Lange, 2005; Broccoli, 1997; Giannone, 2010).

RAP1. (Proteína represora/activadora del inglés, Represor/activador protein 1). Regula negativamente la longitud del telómero. Su extremo C-terminal media la interacción con TRF2. Su principal función está relacionada con la determinación de la longitud relativa del telómero. La proteína Rap1 forma un complejo con TRF2 y su localización y estabilidad es dependiente de TRF2. Esta proteína también contiene

un dominio MYB que en mamíferos no tiene actividad de unión a DNA por lo que mantiene la estructura del complejo dependiente de su interacción con TRF2 (Walker, 2012).

3.3. Modificaciones Postraduccionales de las proteínas TRF

TRF1 y TRF2 están sujetos a una serie de modificaciones post-traduccionales las cuales contribuyen a la regulación de su estabilidad, a su actividad de unión y a su localización. TRF1 es modificada mediante PARsilación, ubiquitinación, SUMOilación y fosforilación, mientras que TRF2 es modificada mediante SUMOilaciones fosforilaciones y metilaciones, que dan mayor o menor afinidad y potencia a las interacciones proteína-proteína y proteína-ADN, durante el paso de la fase S hacia la Mitosis (Li y cols., 2008). Las principales modificaciones post-traduccionales que se llevan a cabo en estas proteínas están ejemplificadas en la figura 4 y resumidas en la tabla 2. De estas las más relevantes son las fosforilaciones, SUMOilaciones y ubiquitinaciones.

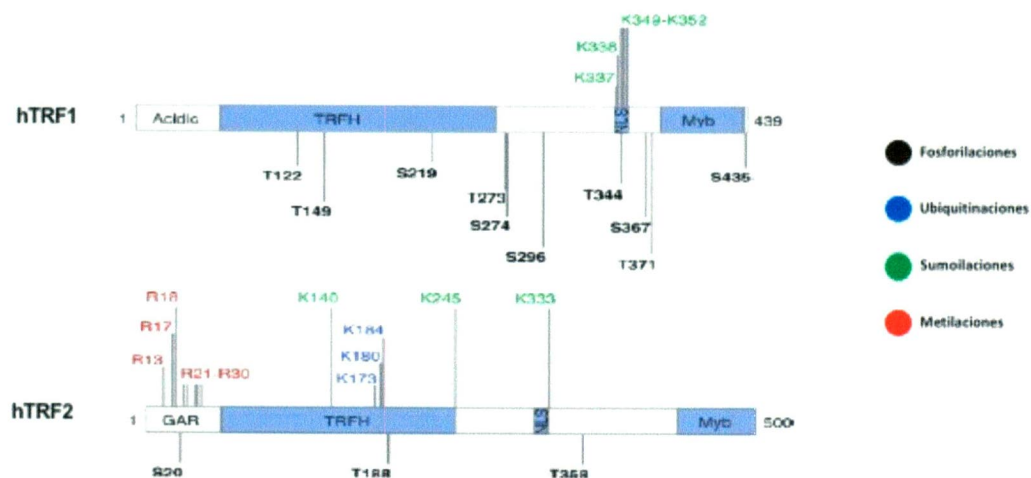


Figura 4. Modificaciones Postraduccionales en TRF1 y TRF2. Se indican los sitios de modificación postraduccionales de TRF1 y TRF2. En la derecha se muestra el código de colores para cada modificación señalada. Negro, Fosforilaciones. Azul, Ubiquitinaciones. Verde, SUMOilaciones. Rojo, Metilaciones (Tomado de Walker, 2012).

Fosforilaciones: TRF1 y TRF2 se fosforilan *in vivo* siendo en el caso de TRF1 la fosforilación relevante en la regulación de la unión al DNA, su estabilidad y su localización. En el caso de TRF2 los residuos que se fosforilan están relacionados a la

respuesta al daño al DNA y a la regulación de su extremo amino terminal donde está el motivo GAR. TRF1 es fosforilado en su residuo de T273 por la cinasa AKT, así como por ATM en sus residuos S219, S274 y S367 en la secuencia consenso SQ en respuesta al daño al DNA. ATM regula negativamente a TRF1 ya que al fosforilarse disminuye su unión al DNA, así como se propicia su degradación en el núcleo. Otra cinasa que fosforila a TRF1 es la Cdk1 (Cinasa dependiente de Ciclina B) la cual la fosforila en los sitios S11, T149, T344 y T371. Su efecto está asociado a la pérdida de heterocromatina telomérica y una parcial desprotección de los telómeros en la mitosis temprana. TRF2 interacciona directamente con ATM y Chk2 lo cual ocasiona la inhibición de la respuesta al daño al DNA. Cuando ATM fosforila el residuo T188 de TRF2 cuando hay daño al DNA, ésta fosforilación es la vía más rápida para iniciar una respuesta de reparación de DNA de doble cadena (Walker, 2012).

SUMOilación: esta modificación es similar a la ubiquitinación la cual inicia con una cascada enzimática en donde participan una enzima activadora-SUMO, una enzima conjuradora SUMO y una SUMO-Ligase la cual asiste la transferencia del péptido SUMO de la enzima conjuradora a la proteína blanco. Las proteínas que se modifican con esta PTM no se degradan, sino que las SUMOilaciones controlan su localización celular, sus interacciones con otras proteínas y su función regulatoria. TRF1 y TRF2 se SUMOilan mediante la enzima MMS21 un miembro del complejo SMC5/6 el cual está implicado en la respuesta al daño al DNA y el mantenimiento de los telómeros. Se ha reportado que en células que carecen de telomerasa la SUMOilación de TRF1 y 2 es muy importante para el mantenimiento de los telómeros principalmente en el mecanismo alternativo de mantenimiento (vía ALT), lo cual facilita la recombinación homóloga en los telómeros y promueve la formación de cuerpos APB (Walker, 2012; Hilgarth, 2005).

Ubiquitinación: esta modificación es la más empleada para marcar proteínas y sean degradadas en el proteosoma. Los componentes principales están conformados por tres enzimas: la E1 (de activación), la E2 (de conjugación) y la E3 (de ligación). En la monoubiquitinación y multi-monoubiquitinación, una molécula de ubiquitina (Ub) típicamente es activada mediante la formación de un enlace covalente en un residuo de glicina en su extremo carboxilo terminal, en donde existe el motivo Leu-Arg-Gly-Gly. Diferentes ligasas E3 se unen a TRF1 y TRF2 marcándolas para su degradación.

Cuando TRF1 no está unido al DNA telomérico este es poliubiquitinado y por lo tanto es degradado en el proteosoma. De igual manera ocurre para TRF2 en el cual sus residuos K180 y K184 lo cual ocasiona la pérdida de TRF2 del telómeros y la fusión cromosómica lo cual induce la senescencia celular o la apoptosis dependiente de ATM-p53 (Walker, 2012).

Metilación: La metilación se lleva a cabo en los residuos de arginina por medio de las enzimas arginina metiltransferasas (PRMTs) las cuales catalizan un residuo de metilo el cual es donado por la S-adenosyl metinina. La PRMT1 es la enzima que metila proteínas que contienen un motivo característico rico en los residuos glicinas y argininas, el motivo GAR. El extremo amino terminal de la proteína TRF2 es rico en G y R17 y 18 similares al motivo GAR. La metilación de TRF2 tiene un papel muy importante en el mantenimiento telomérico y la proliferación celular ya que se incrementa su unión al DNA telomérico (Walker, 2012).

ADPribosilación (parsingilación): Las polimerasas poliADP-ribosas (PARPs) son una familia de enzimas que usan el NAD como sustrato para generar polímeros de ADP-ribosa en residuos de ácido glutámico modificando drásticamente las propiedades de la proteína blanco. Las Tankyrasas son las PARPs que modifican a las proteínas TRF1 y 2 liberándolas del DNA telomérico y ocasionando su degradación dependiente del proteosoma (Walker, 2012).

Tabla 2. Modificaciones postraduccionales de TRF1 y TRF2

MODIFICACIÓN	AMINOÁCIDOS	FUNCIÓN
TRF1		
Fosforilación	T273	AKT. Incrementa niveles de TRF1 y promueve acortamiento del telómero
	S367	ATM. Inhibe unión de TRF1 a DNA telomérico
	T122	CK2. Su inhibición interfiere en la unión de TRF1 a DNA telomérico.
	S435	Pikl. Implicado en la estimulación de unión de TRF1 a DNA telomérico
Ubiquitinación	ND	Knockdown de Fbx4 incrementa niveles de TRF1 resultando en acortamiento de telómero
SUMOilación	K337, K338, K349, K352	MMS21. Su depleción promueve acortamiento e inestabilidad del telómero
Parsilación	ND	Tanquirasa 1, 2. Poli ADP ribosilación de TRF1 por tanquirasa 1 remueve TRF1 de telómeros permitiendo el acceso de telomerasa a extremos de telómeros.
TRF2		
Fosforilación	S20	Chk2. Fosforilación de TRF2 disminuye su unión a DNA telomérico
	T188	ATM. Implicado en respuesta de daño a DNA y la vía de reparación de doble hebra de DNA.
Ubiquitinación	K173, K180, K184	Siah1. Knockdown de Siah1 estabiliza TRF2
SUMOilación	K140,, K245, K333	MMS21. Mutaciones de los sitios de SUMOilación previenen la formación de APB en células ALT
Parsilación	ND	Poli ADP ribosilación de TRF2 reduce la unión de TRF2 a telómeros induciendo telómeros disfuncionales
Metilación	R13, R17, R18, R21, R25, R27, R28, R30	PRMT1. Falta de metilación promueve la acumulación de telómeros dobles induciendo senescencia celular

Tomado de Walker, 2012.

3.4. Proteínas que interaccionan con TRF1 y TRF2

Las proteínas TRF1 y TRF2 se unen al DNA a través de sus DBD MYB como homodímeros u oligómeros formados por interacciones entre sus dominios TRFH (Figura 3), y contienen sitios de unión a péptidos con los cuales reclutan otras proteínas a los telómeros. Estos sitios de unión son diferencialmente utilizados para interaccionar con proteínas que contienen el motivo FxLxP con el cual se unen con TRF1, y el motivo YxLxP para unirse con TRF2. Por ejemplo, TRF1 se une al motivo FxLxP de TIN2 mientras que TRF2 se une al motivo YxLxP de varios factores accesorios del shelterin como la proteína Apollo, una nucleasa la cual contribuye al mantenimiento del extremo de cadena sencilla 3'(3'overhang) (Figura 5) (Walker, 2012).

Asimismo TRF1 y TRF2 interaccionan con proteínas a través de sus dominios amino terminal con enzimas que están involucradas en modificarlas post-traduccionalmente, por ejemplo TRF1 contiene la secuencia RxxADG en la cual se une a tanquirasa 1 y tanquirasa 2, que como se había descrito anteriormente ribosila a TRF1 lo cual la remueve de los telómeros permitiendo el acceso de telomerasa permitiendo la elongación telomérica (Palm, 2008).

Sin embargo, no solo la maquinaria de Shelterin interacciona con los telómeros, además estas regiones actúan como reservorios de diferentes proteínas entre las cuales están las proteínas de detección y reparación del DNA, tanto para ser destinadas al mantenimiento de los telómeros como para ser liberadas a sitios de daño en DNA genómico en respuesta a estrés genotóxico. Estas proteínas son ATM, PARP/Tankirasa, complejo DNA-PK, BRCA-1 y 2 así como el complejo RAD50-MRE11-NBS1, XPF las cuales interaccionan con las proteínas TRF1 y TRF2. Por ejemplo, en el extremo amino terminal o el carboxilo terminal de TRF2 interaccionan WRN, ORC y FEN1 lo cual restringe la unión de la telomerasa (Walker, 2012) Figura 5. Una lista de todas las proteínas que interaccionan con TRF1 y 2 se muestra en la tabla 3.

Tabla 3. Proteínas que interaccionan con las proteínas TRF1 y TRF2.			
Proteínas	Actividad	Proteínas	Actividad
Unión a TRF1		Unión a TRF2	
Tankirasa 1,2	PARsilación: Protección y resolución de reacciones de cohesión	Apollo	Procesamiento de los extremos cohesivos.
PINX 1	Inhibición de la telomerasa	Complejo ORC	Protección de los telómeros.
ATM	Fosforilación. Regulación de la longitud del telómero.	ATM	Inhibición
Ku70/80	Inhibición de la Reparación directa por Homología (HDR)	Complejo MRE11	Procesamiento de los extremos cohesivos en telómeros disfuncionales/longitud telomérica.
FBX4/Nucleostemina	Ubiquitinación. Degradación	WRN/FEN1	Procesamiento de los extremos cohesivos.
PIN1/GNL3L	Plegamiento y dimerización	Ku70/80	Inhibición de la Reparación directa por Homología (HDR) junto con Rap1, supresión de los t-loops
		PNUTS	Replicación de los telómeros
		MCPH 1	Regulación de la longitud telomérica
Otros		Actividad Recombinante	
ATR	Desplazamiento de Pot1 y TTP1	XRC3/RAD51/RTEL1	Mantenimiento de telómeros, puede inducir la delección rápida (TRD)
Metilación de Arginina			
TRIP6/LPP		Reclutamiento de Arg-metilasas (dominio LIM)	
PRMT1		Arg-metilasas que modifican a TRF2	

* Abhyankar, 2008.

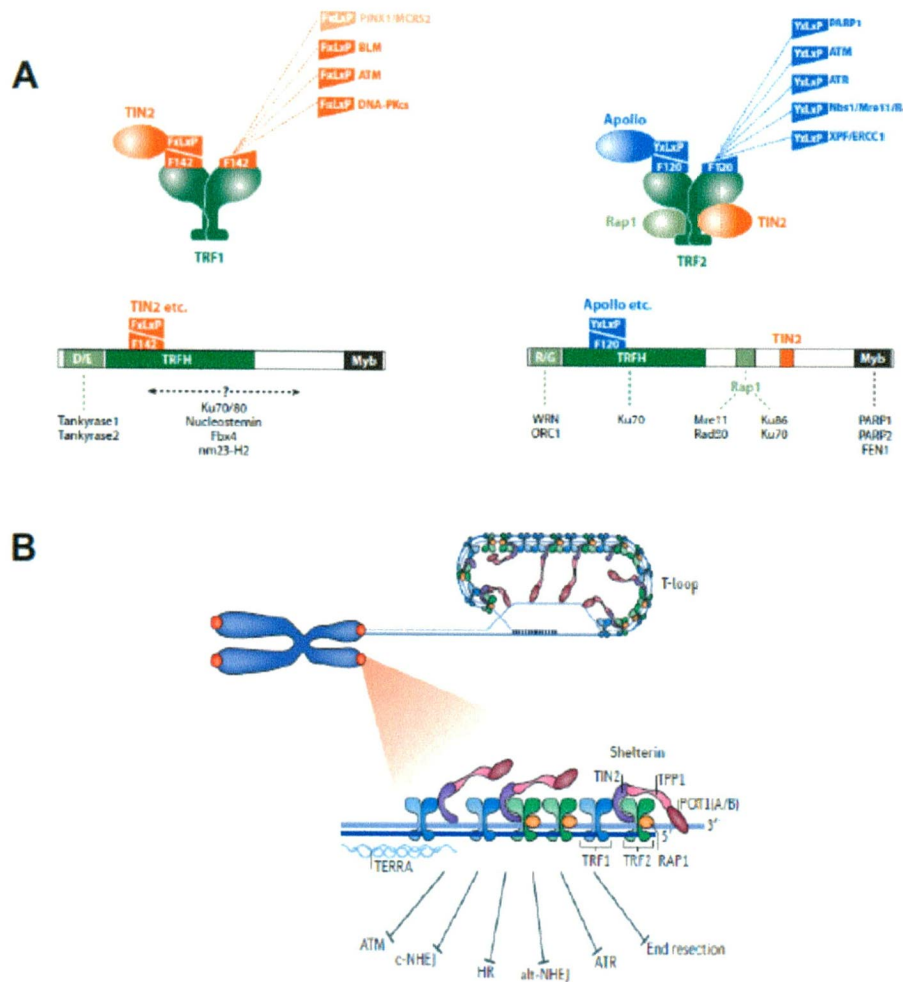


Figura 5. Proteínas que interaccionan con TRF1 y TRF2. En A) se muestran los motivos FxLxP y YxLxP conservados de interacción de TRF1 y TRF2 con otras proteínas. B) Se muestran proteínas de la maquinaria de reparación del DNA que interactúan con estas proteínas (Tomado de Palm, 2008).

3.5. Complejo de Shelterin en otros microorganismos

Varias características del *Shelterin* son altamente conservadas. POT1 y TPP1 son ortólogos de las proteínas teloméricas TEBP α y TEBP β de ciliados y se ha probado la conservación de estas subunidades en *Schizosacharomyces pombe*. Además una proteína de unión al dúplex de DNA telomérico puede ser reconocido en *S. pombe* y *Trypanosoma brucei*, y en cada caso el ortólogo se une a Rap1 (Cooper, 1997; Li, 2005).

En vertebrados el dímero TPP1/POT1 es conectado a TRF/Rap1 y en *S. pombe* esta conexión es mediada por Poz1, la cual se une a Rap1 y el ortólogo de TPP1 es Tpz1, y la proteína de unión a DNA de cadena doble es Taz1 (Figura 6) mientras que en vertebrados, TIN2 se une a TPP1 y a ambas TRFs. La arquitectura conservada de esta estructura general del Shelterin en eucariotes sugiere que el complejo ha existido en su ancestro común (Palm, 2008).

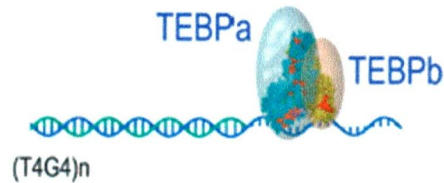
Es de fundamental importancia que las funciones teloméricas sean llevadas a cabo en gran medida por el reclutamiento de proteínas de protección específicas al extremo de los cromosomas. La organización de estas proteínas que componen al complejo de shelterin puede variar entre distintos microorganismos y conservarse de una manera simplificada como es el caso de *Oxytricha nova*, un organismo ciliado en el que se han encontrado estas dos proteínas teloméricas TEBP α y TEBP β que forman un complejo heterodímero con el extremo sobresaliente 3' (Figura 6). En proteínas TEBP tres OB-fold están involucrados en la interacción con el DNA, dos en TEBP- β , y uno de TEBP- α . Ortólogos de los heterodímeros TEBP han sido descritos en levaduras (Pot1-Tpz1), mamíferos (POT1-TPP1), levaduras de gemación (Cdc13-Stn1-Ten1) y plantas (CTC1-Stn1) (Giraud, 2013)

Otro organismo es *Saccharomyces cerevisiae* el cual incluye el complejo de unión a DNA de cadena sencilla, el complejo CST (Cdc13-Stn1-Tel1) y de cadena doble Rap1-Rif1-Rif2 (Figura 6). La conservación de estas proteínas teloméricas puede explicar la diversidad de proteínas de protección de los extremos cromosomales encontradas en distintos organismos (Giraud, 2013).

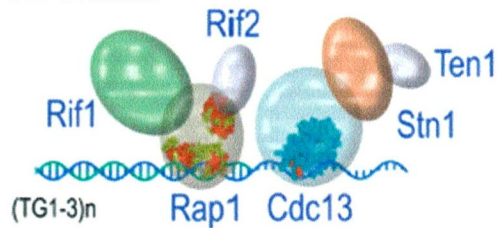
Varias características del *Shelterin* son altamente conservadas. POT1 y TPP1 son ortólogos de las proteínas teloméricas TEBP α y TEBP β de ciliados y se ha probado la conservación de estas subunidades en *Schizosaccharomyces pombe*. Además una proteína de unión al dúplex de DNA telomérico puede ser reconocido en *S. pombe* y *Trypanosoma brucei*, y en cada caso el ortólogo se une a Rap1 (Cooper, 1997; Li, 2005). En vertebrados el dímero TPP1/POT1 es conectado a TRF/Rap1 y en *S. pombe* esta conexión es mediada por Poz1, la cual se une a Rap1 y el ortólogo de TPP1 Tpz1, mientras que en vertebrados, TIN2 une TPP1 a ambas TRFs. La arquitectura conservada

de esta estructura general del Shelterin en eucariotes sugiere que el complejo ha existido en su ancestro común (Palm, 2008).

Oxytricha nova



Saccharomyces cerevisiae



Schizosaccharomyces pombe

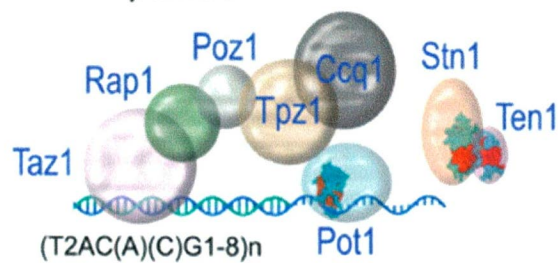


Figura 6. Complejos de protección telomérica en algunas especies. Se muestran las proteínas que componen distintos complejos teloméricos similares a shelterin que se encuentran simplificados en *Oxytricha nova*, *Saccharomyces cerevisiae* y *Schizosaccharomyces pombe*. (Tomado de Giraud-Panis, 2013).

3.6. Localización nuclear del complejo telomérico

A finales del siglo XIX, Carl Rabl reportó que los telómeros en el núcleo en interfase se localizan cerca de la envoltura nuclear en el núcleo. A esta organización desde entonces se le llamó organización “Rabl” y ha sido observada en varias especies desde levaduras, hasta plantas y animales. La levadura *S. cerevisiae* muestra una organización tipo Rabl donde los telómeros son agrupados y anclados a la envoltura nuclear. La asociación de los telómeros en la envoltura nuclear es también observada en *S. pombe*, sin embargo en este organismo los telómeros son dispersados a lo largo de la envoltura nuclear.

También se ha reportado una asociación a la matriz nuclear de los telómeros en humanos y se ha propuesto que en esta asociación está involucrada una isoforma de TIN2 (TIN2L) mediante su unión a la Laminina tipo A y su anclaje a la membrana nuclear interna a través de la interacción de una proteína SUN con la proteína KASH (Figura 7) (Giraud, 2013), por lo que cabe destacar que esta organización telomérica en la periferia nuclear podría estar conservada en otros organismos como en *E. histolytica*.

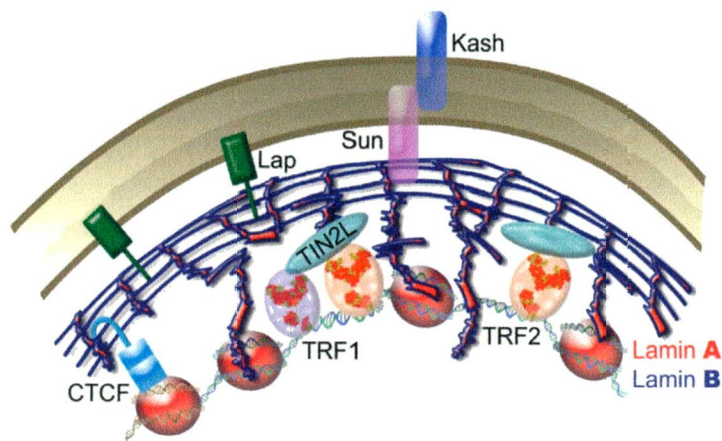


Figura 7. Anclaje telomérico nuclear. Esquematización propuesta del anclaje telomérico humano a la matriz nuclear (Tomado de Giraud, 2013).

3.7. Nucleosomas teloméricos

De manera similar al resto del DNA cromosomal, los telómeros de organismos eucariontes superiores están organizados en nucleosomas. Sin embargo el DNA

telomérico tiene una estructura inusual de organización de la cromatina, caracterizada por nucleosomas altamente empaquetados con regiones linkers más pequeñas que en el resto del DNA cromosómico. La cromatina telomérica generalmente es considerada como heterocromatina en donde se considera esencial el estado de mayor condensación para la protección de los extremos de los cromosomas. RAP, un miembro del complejo de Shelterin al estar unido al DNA telomérico recluta proteínas como el complejo Sir (Silent Information Regulators, Sir2, Sir3, y Sir4), el cual es esencial para la formación de heterocromatina lo cual ocasiona represión de la expresión de los genes cercanos a los telómeros. En humanos, los telómeros y subtelómeros se ha reportado la presencia de H3K9 (trimetilación de la histona 3 en la lisina 9) y de H4K20 (trimetilación de la histona 4 en la lisina 20) en los dominios teloméricos (Figura 8) (O'Sullivan, 2016).

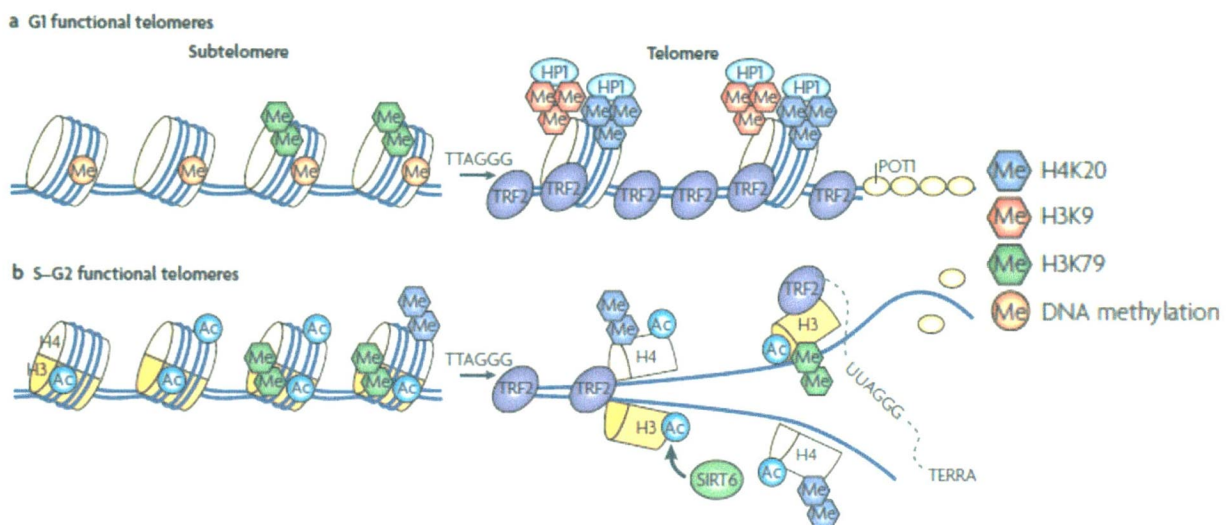


Figura 8. Marcas de heterocromatina telomérica. En la imagen se muestran las marcas de histonas específicas de regiones teloméricas (H4K20, H3K9) así como de regiones subteloméricas (H3K79) conservadas durante el proceso de replicación (Tomado de O'Sullivan, 2016).

3.8. *Entamoeba histolytica*

E. histolytica es un parásito entérico protozoario anaerobio que infecta a humanos, es causante de la amebiasis la segunda causa de muerte debido a infecciones parasitarias intestinales que provocan diarrea, disentería, abscesos hepáticos y pulmonares y que afecta a 50 millones de personas anualmente causando más de 100,000 muertes (Burgess, 2016). La transmisión ocurre vía ingestión de comida o agua contaminada con

quistes amebianos y la mayoría de infecciones es asintomática, mientras que aproximadamente un 20% de los casos desarrollan manifestaciones clínicas (Nakada, 2016; Luna, 2016).

3.9. Ciclo de vida de *E. histolytica*

El proceso de infección comienza con la ingestión de agua o comida contaminada donde los quistes de *E. histolytica* pueden ser encontrados. Durante esta primera etapa en el cuerpo humano, el quiste comienza a diferenciarse en trofozoítos a su paso por el estómago y el intestino delgado. Entonces una vez que llegan al colon, los trofozoítos se unen a los enterocitos, colonizan el colon y sobreviven (Figura 9). El proceso de invasión dentro de los tejidos comienza cuando los trofozoítos residentes en el colon disrupten la barrera del intestino. Estos eventos necesitan la adhesión del parásito a las células humanas, lo cual es llevado a cabo por un grupo de proteínas llamadas factores de virulencia que están presentes en la superficie del trofozoíto. La lectina Gal/GalNAc media los mecanismos para la adherencia y la citotoxicidad en las células huésped y previene la eliminación de la ameba por el complejo del complemento (Petri, et al., 1987; Pineda y Perdomo, 2017).

El estrecho contacto entre el trofozoíto y la célula huésped es necesario para que los efectores citolíticos actúen. Las cisteín proteasas escinden la mucina del colon del huésped llevando a la disrupción de la capa mucosa y subsecuentemente a la destrucción del epitelio del colon. Las cisteín peptidasas debilitan las uniones estrechas de las células huésped e inactivan inmunoglobulinas y componentes de la cascada del complemento contribuyendo a la evasión de la respuesta inmune del huésped. Además la capacidad selectiva del parásito para degradar células humanas y fagocitar eritrocitos, bacterias y otras células circundantes no solo contribuye al proceso invasivo sino también a la sobrevivencia del parásito y el establecimiento en el huésped (Pineda y Perdomo, 2017).

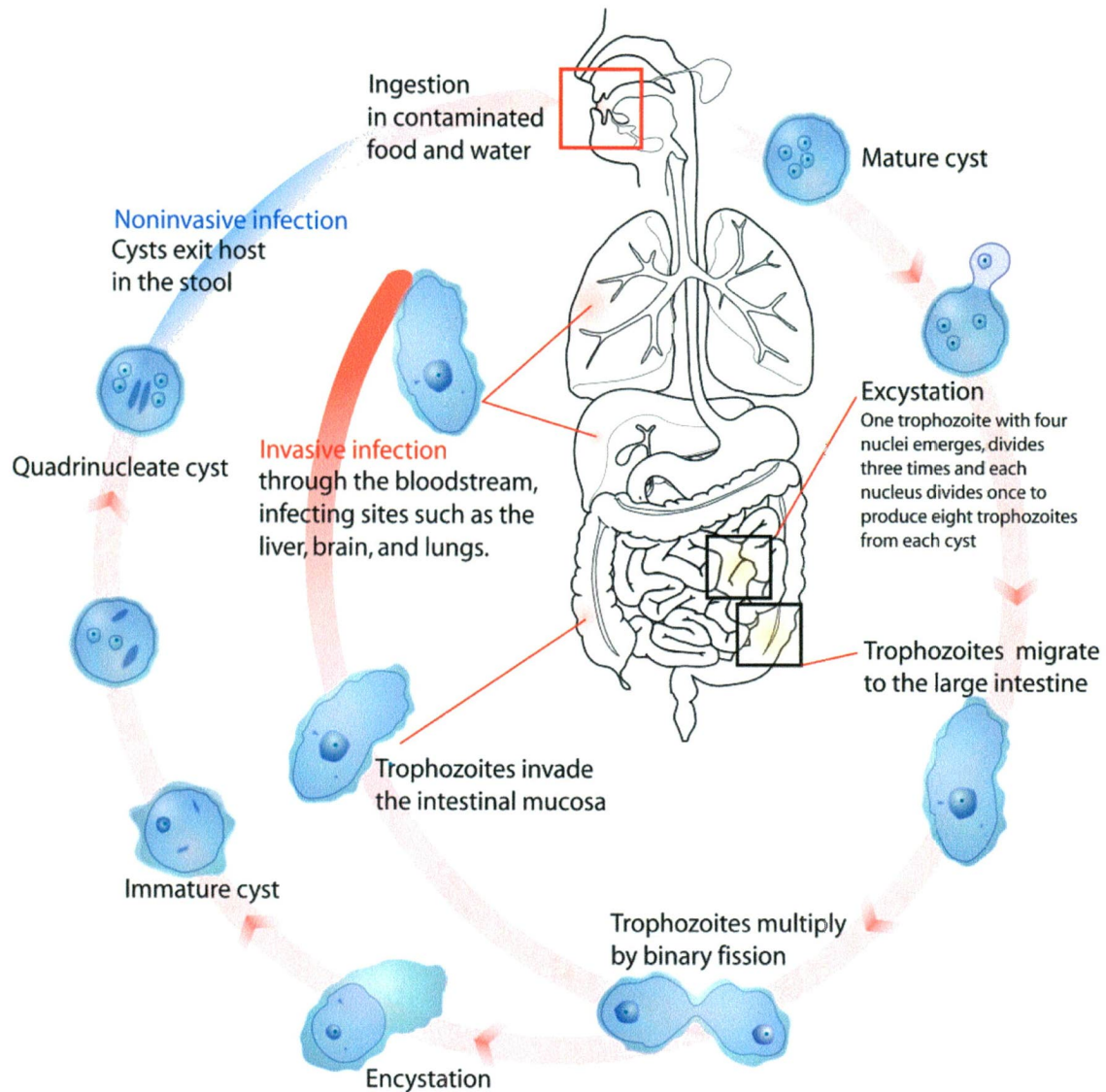


Figura 9. Ciclo de vida de *E. histolytica*. Se muestran las etapas del ciclo de infección del parásito *E. histolytica* en el ser humano desde su desenquistamiento, pasando a su forma invasiva como trofozoítos y su maduración al quiste, su forma no invasiva (https://commons.wikimedia.org/wiki/File%3AEntamoeba_histolytica_life_cycle-en.svg).

3.10. El genoma de *E. histolytica*

El genoma de este parásito tiene un tamaño de 23 Mb y contiene aproximadamente 8,201 genes distribuidos en alrededor de 1,496 scaffolds. Debido a la gran cantidad de elementos repetidos ha sido difícil organizar estos scaffolds en cromosomas. Las regiones intergénicas son de aprox. 400 pb a 2.3 kb sugiriendo un denso

empaquetamiento de genes. Los genes de rRNA se localizan en moléculas de DNA circulares extracromosomales con un tamaño aproximado de 26 kb (Loftus, 2005; Lorenzi, 2010).

Esto es relevante debido a que a pesar de la reanotación del genoma no se ha logrado identificar secuencias de repetidos teloméricas o subteloméricas, así como genes que codifiquen para la enzima telomerasa (Lorenzi, 2016). Sin embargo, existe evidencia circunstancial de que los extremos pueden estar formados por genes de ARN de transferencia (tARN), lo que permite inferir que la localización de estos genes es, por lo general, en los sitios terminales, (Clark et al., 2006). La variación en el tamaño de los cromosomas puede ser explicada por la expansión y contracción de repeticiones subteloméricas, como en otros protistas. Las regiones cromosómicas que flanquean estos arreglos, habitualmente se encuentran desprovistos de genes que codifican proteínas, presentan un contenido limitado de elementos incompletos transponibles y otras secuencias repetitivas, lo que es coherente con la posible ubicación telomérica, (Clark y cols., 2006).

Recientemente al realizar un análisis de isocóros en 6 diferentes scaffolds del genoma de *E. histolytica* los cuales fueron proporcionados por Neil Hall del Instituto Earlham en Inglaterra, es posible evidenciar la presencia segmentos repetidos (Figura 10). Estos segmentos consisten en arreglos de genes de tRNAs en *tándem* que varían de 490 a 1775 pb los cuales contienen de 1 a 5 genes tRNAs y diferentes repetidos tipo STR ,los cuales se podrían ubicar en las regiones terminales de los cromosomas, por lo que se ha propuesto que podrían funcionar como secuencias teloméricas (Clark, 2006).

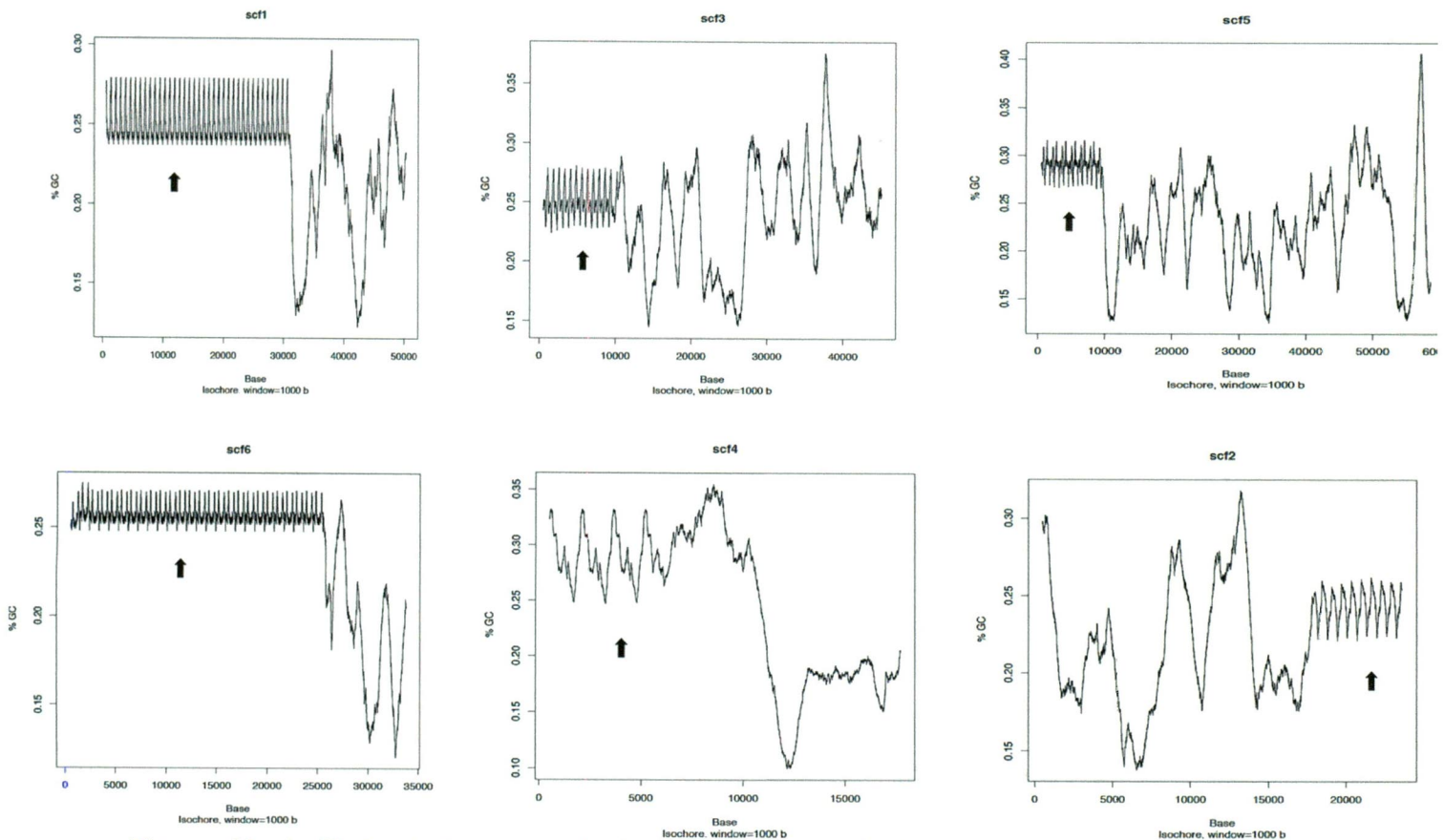


Figura 10. Análisis de isocoros de las regiones terminales de los cromosomas. Los extremos terminales presentan secuencias repetitivas y estos son ricos en GC las cuales son indicadas con una flecha (Comunicación personal por Neil Hall y Helios Cárdenas, 2016).

3.11. Cromosomas en *E. histolytica*

Diferentes enfoques se han empleado para estudiar los cromosomas de este parásito. Por ejemplo mediante estudios relacionados con la estructura de sus cromosomas, Willhoeft y Tannich (2000) identificaron por medio de microscopía de fluorescencia de 30-50 cromosomas por núcleo mostrando una estructura lineal (Willhoeft, 1999). También Chávez Munguía y colaboradores (2006) por microscopía electrónica mostraron que los cromosomas de este organismo muestran estas estructuras lineales aunque a la fecha no se ha determinado su número exacto y al menos 15 cromosomas pudieron ser visualizados (Figura 11) (Chávez, 2006).

También se ha tratado de determinar el número de cromosomas en este parásito empleando electroforesis de campos pulsados donde Valdés y cols. resolvieron de 6 a 9 bandas de DNA, las cuales se estimaron en 47 cromosomas (Valdés, 1990). Posteriormente, el grupo de Willhoeft y Tannich (1999) identificó y pudo definir de 31 a

35 cromosomas de un tamaño de 0.3 a 2.2 Mb por el mismo método (Willhoeft, 1999). Posteriormente Riveron y colaboradores (1999) estimaron las velocidades de migración y reorientación de los cromosomas y se sugirió que las bandas de migración a 227 y 631 kb contenían DNA lineal y circular dificultando la interpretación del cariotipo molecular en este organismo (Riveron, 2000).

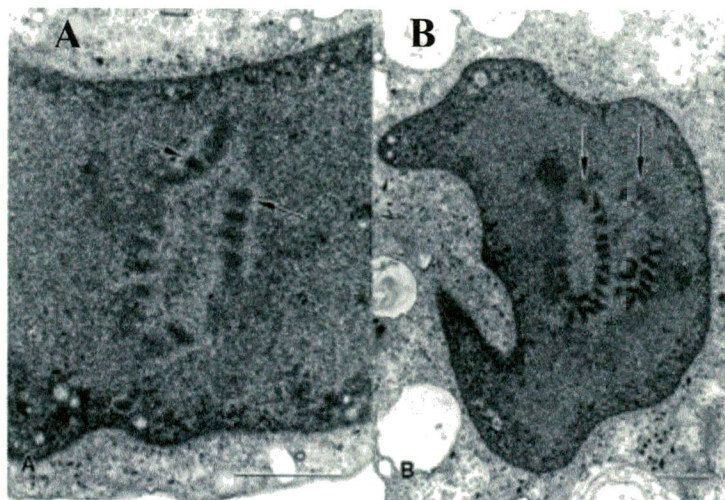


Fig. 11. Estructura de un núcleo de *E. histolytica* en profase tardía. El núcleo muestra al menos 15 cromosomas arreglados en un círculo irregular (A) y un núcleo en telofase mostrando cromosomas formando dos semicírculos (B). (Tomado de Chávez Munguía, 2006).

Por otro lado, se ha reportado que el genoma de *E. histolytica* está organizado en cromatina cuya unidad fundamental es el nucleosoma y contiene genes que codifican histonas H2A, H2B, H3 y H4, que contienen residuos de lisina y arginina que pueden ser blanco de modificaciones pos-traduccionales tales como acetilación y metilación por acetiltransferasas (HATs) o bien metiltransferasas de lisina o arginina (HKMTs o PRMTs) respectivamente las cuales podrían regular la accesibilidad de la cromatina para las diferentes funciones nucleares como la replicación y la transcripción (Borbolla, 2015; Lozano, 2016).

3.12. Regiones teloméricas en *E. histolytica*

En organismos superiores se encuentran marcas epigenéticas de heterocromatina en histonas dentro de regiones de cromatina telomérica y subtelomérica, particularmente la trimetilación de lisina 9 de la histona 3 (H3K9me3) y la trimetilación de la lisina 20 de la histona 4 (H4K20me3) (Jorgensen, 2013; Kourmouli, 2004; O'Sullivan, 2010). A la fecha se han reportado algunas modificaciones en la cromatina de *E. histolytica* que incluyen la di- y trimetilación en la lisina 4 de la histona H3 (H3K4me2/3) correlacionada con actividad transcripcional, la dimetilación en la lisina 27 de la histona H3 (H3K27me2), el cual es enriquecido en genes silenciados por RNA de interferencia, la dimetilación de la arginina 3 H4(H4R3me2) y acetilación de la histona H4 en su región N-terminal relacionadas con activación transcripcional (Borbolla, 2015; Foda, 2015; Mirelman, 2008).

Una manera de abordar la búsqueda de las secuencias teloméricas ha sido mediante el análisis de estas marcas epigenéticas de heterocromatina telomérica y subtelomérica, como la trimetilación de lisina 9 de la histona 3 (H3K9me3) y la trimetilación de la lisina 20 de la histona 4 (H4K20me3) que también son importantes en el mantenimiento de la integridad del genoma (Jorgensen, 2013; Kourmouli, 2004; O'Sullivan, 2010). Es por ello que la búsqueda de estas marcas epigenéticas específicas de regiones teloméricas pueden ser herramientas útiles para la localización e identificación de regiones teloméricas en *E. histolytica*.

3.13. Dominio de unión a DNA MYB (DBD MYB) en *E. histolytica*

Finalmente, otra manera de dirigir a la búsqueda de las regiones teloméricas en *E. histolytica* es mediante el estudio de las proteínas con dominio de unión a DNA MYB. En el genoma de este parásito están codificadas un grupo de proteínas que contienen el DBD MYB, las cuales se relacionan con las proteínas de unión a telómeros TRF1 y 2 (Meneses, *et al.*, 2010 y Cooper, 1997). Anteriormente se han realizado análisis filogenéticos donde se muestra que las proteínas de unión a DNA con dominios MYB en *E. histolytica* se agrupan en tres familias. La familia I denominada EhMybR2R3 la cual

tiene dos repetidos MYB, y las familias II y III las cuales tienen un solo repetido. La familia II tiene homología a proteínas tipo teloméricas y la familia III se denominó EhMybSHAQKYF. Las familias I y III están relacionadas con la actividad de factores de transcripción mientras que la familia II se relaciona con proteínas de unión a telómeros humanos es por ello que se les denominó EhTRF-like (Figura 12) (Meneses, *et al.*, 2010).

Estas proteínas están codificadas por los genes ubicados en los *loci* EHI_148140, EHI_001110 y EHI_001090 presentan dominios de unión al DNA tipo MYB (DBD MYB) y son similares a las proteínas TRF de *Homo sapiens*, conservan un motivo denominado *telebox* VDLKDKWRT en la tercer alfa hélice de su DBD MYB, el cual está involucrado en el reconocimiento de la secuencia telomérica. Estas proteínas se denominaron EhTRF-like I, II y III (Cooper, 1997; Meneses, *et al.*, 2010).

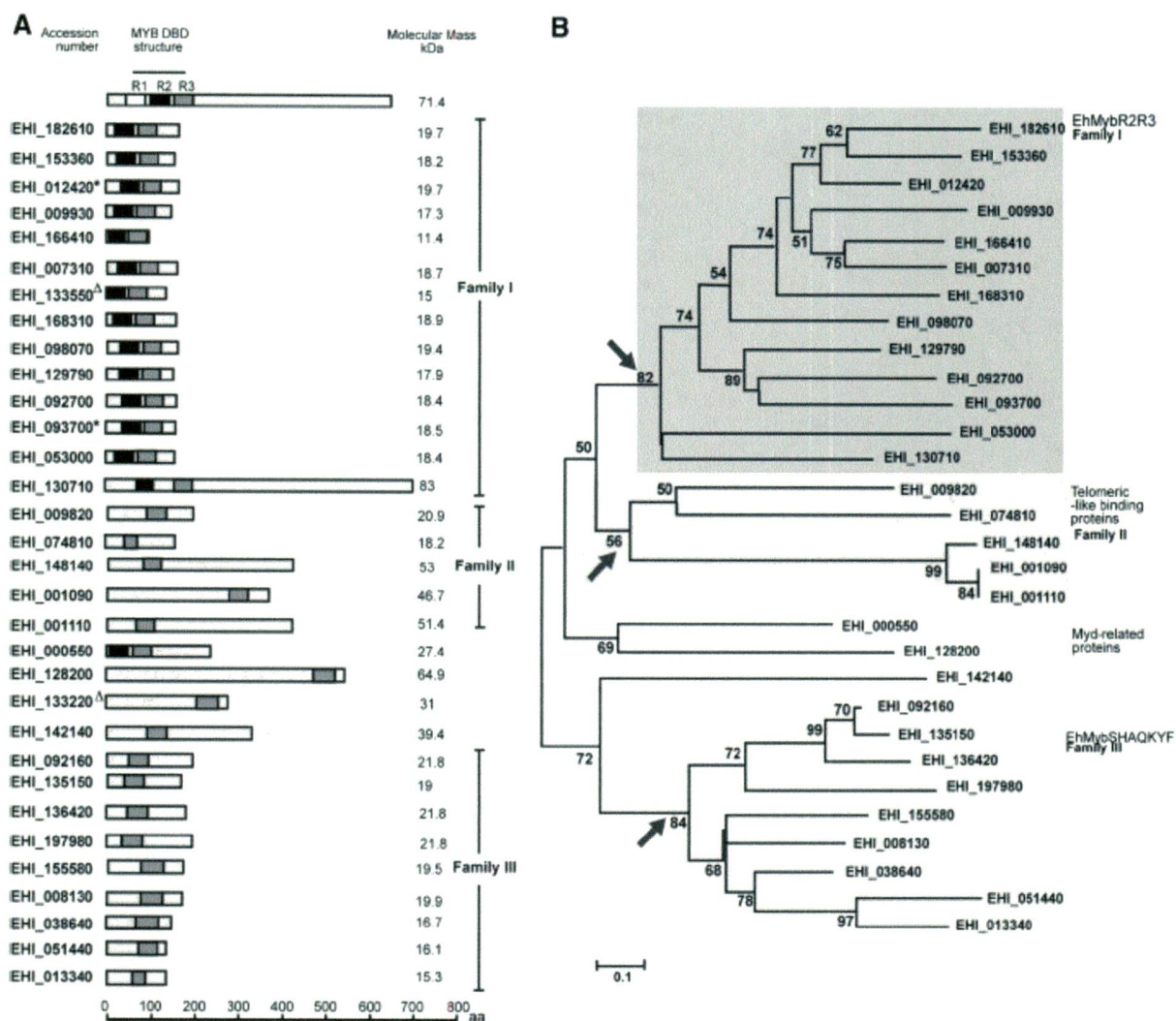


Figura 12. Familias de proteínas que contienen el DBD MYB. En A) Familias de genes con dominios de unión a DNA en *E. histolytica*. En B) el árbol filogenético muestra a la familia II de proteínas que conservan el dominio de unión a DNA telomérico (Meneses, *et al.*, 2010).

3.14. Proteínas EhTRF-like de *E. histolytica*

A diferencia de *H. sapiens*, el cual tiene solo un gen para la proteína TRF1 y uno para TRF2, este protozooario parásito tiene tres genes codificantes para proteínas TRF, los cuales están ubicados en los *loci*: EHI_001110, EHI_001090 y EHI_148140. En *E. histolytica* los genes EHI_001110 y EHI_001090 están localizados dentro del

mismo *contig*, lo cual podría suponer que ocurrió una duplicación génica en el genoma de este parásito. A las proteínas codificadas por estos genes se le denominó EhTRF-like I, II y III y aunque en la base de datos están anotadas como proteínas hipotéticas, debido a su alta identidad con proteínas de unión a telómeros su posible función está relacionada al reconocimiento de las secuencias teloméricas (Tabla 4).

Tabla 4. Comparación de las proteínas EhTRF-like de *E. histolytica* con TRF1 y TRF2 de *Homo sapiens*.

<i>Entamoeba histolytica</i>	<i>Homo sapiens</i>	Número de acceso	e-value	H (%)	I (%)
EHI_001090	telomeric repeat factor 2	C4M119	2e-06	52.8	14
EHI_148140	telomeric repeat-binding factor 1 isoform 1	C4LSY4	1e-07	57.0	32
EHI_001110	telomeric repeat-binding factor 1 isoform 2	C4M1J1	2e-07	56.2	39

Las proteínas EhTRF-like además tienen el motivo VDLKDKWRT presente en la tercer hélice del dominio DBD MYB, los cuales están involucrados en los contactos DNA-proteína de los factores de unión a repetidos teloméricos de eucariontes superiores (Figura 13).

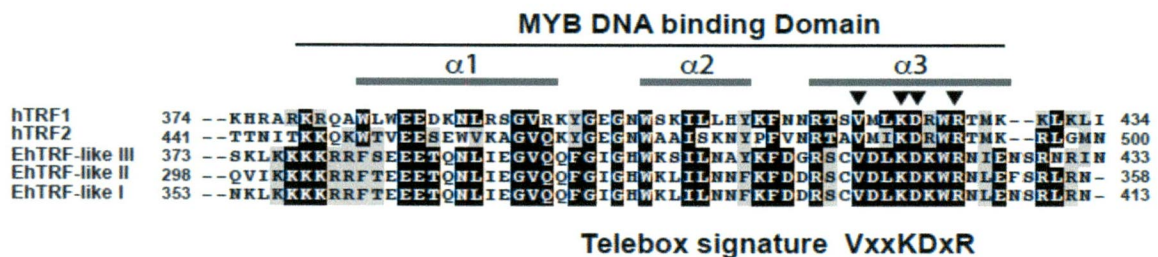


Figura 13. Dominio de unión a DNA (DBD MYB) de las proteínas EhTRF-like. Alineamiento DBD MYB de las proteínas EhTRF-like de *E. histolytica* con las proteínas TRF de *H. sapiens* en donde se muestra el motivo Telebox característico de las proteínas de unión a telómeros (Manuscrito en reparación Francisco R. G. 2016)

En estas proteínas se ha propuesto la presencia de un dominio similar al TRFH, el cual es muy divergente, sin embargo conserva en la misma posición las 9 α -hélices presentes en el dominio TRFH de *H. Sapiens*. Se analizaron sus extremos amino terminal para buscar aminoácidos de naturaleza básica o ácida y se encontró que EhTRF-like I y II

tienen un extremo amino terminal ácido similar al extremo rico en Acido aspártico y ácido glutámico de TRF1 con un pl de pl de 5.8 y 7.14 respectivamente. Contrastando con el extremo amino terminal de EhTRF-like III que tiene una mayor cantidad de aminoácidos básicos y su pl de 8.29 lo cual coincide con las características del extremo amino de TRF2. En las proteínas EhTRF-like también se realizó una búsqueda de las secuencias de aminoácidos de las proteínas para determinar si presentan señales de localización nuclear las cuales se identificaron en las tres proteínas EhTRF-like. Finalmente, el motivo RBM (importante para la unión a Rap1, del inglés Rap1 binding motif) se identificó en la proteína EhTRF-like III (Fig. 14). Es por estas características que nuestro grupo de investigación propone que las proteínas EhTRF-like I y II podrían estar más relacionadas con la proteína TRF1 y la proteína EhTRF-like III con la proteína TRF2 de *H. sapiens*.

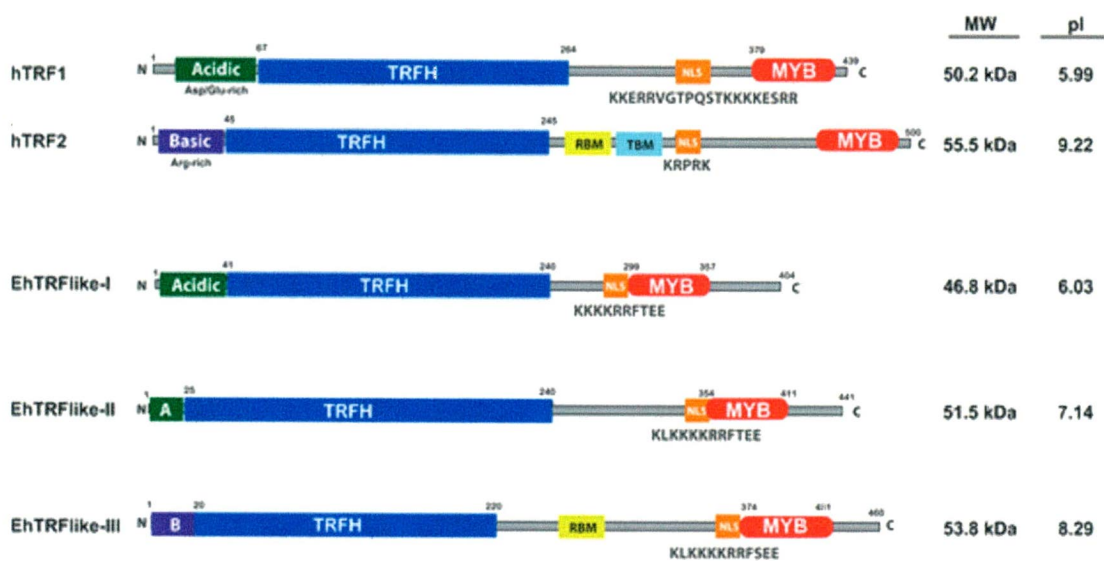


Fig. 14. Esquema de la estructura de las proteínas EhTRF-like y hTRF. Se muestran las estructuras de las proteínas hTRF y EhTRF-like donde se muestran sus diferentes dominios. (Tomado de Rendón-Gandarilla, manuscrito en preparación, 2016).

3.15. Antecedentes particulares

Los genes que codifican para las proteínas EhTRF-like I y tienen una expresión muy similar sin embargo el gen codificante para EhTRF-like III es el que se expresa más abundantemente en amibas en condiciones basales de cultivo. Con la idea de iniciar la caracterización funcional de una de las proteínas EhTRF-like de *E. histolytica* se realizó una construcción con el gen *ehtrf-like III* en el vector de sobreexpresión pKT-3M el cual

se transfectó en trofozoítos de *E. histolytica*. Mediante esta estrategia se analizó la localización nuclear de la proteína EhTRF-like III por medio de WB usando fraccionamiento subcelular así como por inmunofluorescencia indirecta y microscopía de electrónica de transmisión (TEM). La proteína EhTRF like III se inmunolocalizó en la fracción nuclear y en los núcleos de trofozoítos de *E. histolytica* a través de microscopías de fluorescencia, con anticuerpos anti-EhTRF like III y anti-Myc, confirmando su localización dentro del núcleo, en la periferia nuclear (ver figura 15 A). De manera interesante, los análisis empleando TEM localizaron a la proteína EhTRF like III en regiones de heterocromatina condensada (véase figura 15 B), lo cual correlaciona con la ubicación de las regiones teloméricas las cuales como se describió anteriormente se ubican en la periferia nuclear y en regiones de heterocromatina condensada. Finalmente, mediante ensayos de EMSA determinamos que la proteína EhTRF-like III forma complejos específicos de DNA-Proteína con secuencias de DNA tipo telomérica.

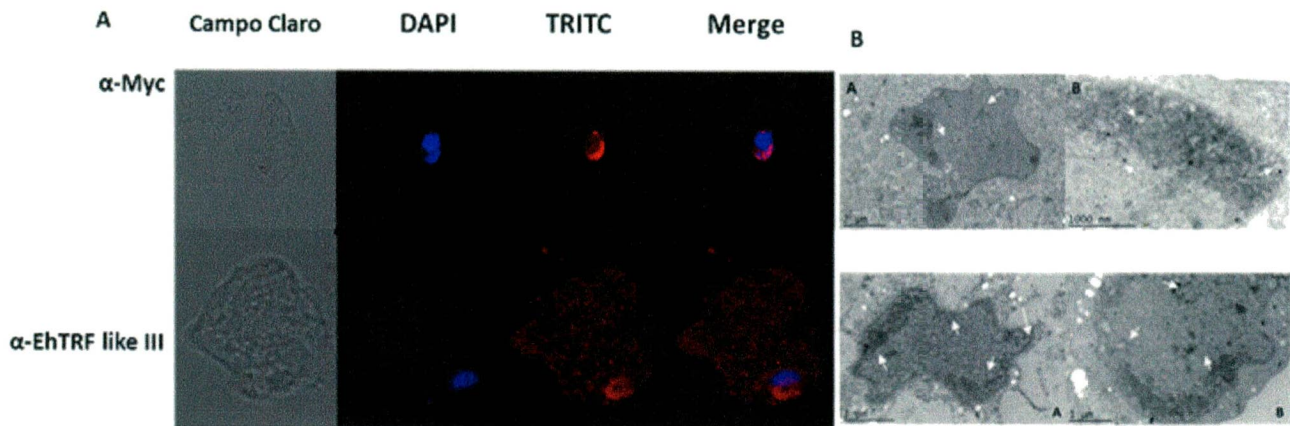


Fig. 15. Localización de la proteína EhTRF-like III en el núcleo de *E. histolytica*. En A) Microscopía confocal mostrando núcleos de trofozoítos de *E. histolytica* en los cuales se localiza a la proteína EhTRF-like III con anticuerpos α -Myc y α -EhTRF-like III (Tesis de Díaz V.). B) Microscopías electrónicas mostrando EhTRF-like III en núcleos de trofozoítos de *E. histolytica*. En A) Núcleo. B) Periferia nuclear. Las flechas blancas indican marca anti-Myc (manuscrito en preparación de Rendón Gandarilla F. J.).

Tomando en consideración los resultados mostrados anteriormente en este trabajo nos plantemos iniciar con la caracterización de la proteína EhTRF-like I analizando su expresión en condiciones basales mediante inmunodetección y microscopía de

fluorescencia para determinar su localización subcelular. Adicionalmente y tomando en cuenta la información referente a las marcas de heterocromatina telomérica en este trabajo también se plantea colocalizar mediante microscopía confocal a la proteína EhTRF-like I con EhTRF-like III así como con la marca epigenética de cromatina telomérica H4K20me3 y con el marcador de periferia nuclear Laminina B1. Además se plantea identificar o encontrar proteínas que interaccionen con EhTRF-like I que pudieran estar involucradas en el funcionamiento de una maquinaria telomérica en *E. histolytica*.

4. JUSTIFICACIÓN

Estudios de secuenciación del genoma de *E. histolytica*, la homología con TRFs de humano, y la localización nuclear de algunas de las proteínas EhTRF-like sugieren su posible papel en la maquinaria que protege los extremos de los cromosomas, es por ello que el estudio de la proteína EhTRF-like I nos permitirá entender los mecanismos moleculares que podrían estar participando en la protección de los extremos terminales de los cromosomas en *E. histolytica*.

5. HIPÓTESIS

EhTRF-like I colocaliza con EhTRF-like III, H4K20me3 y Laminina en regiones de heterocromatina e interacciona con proteínas asociadas a la maquinaria de protección telomérica.

6. OBJETIVO GENERAL

Determinar la localización subcelular de la proteína EhTRF-like I y sus interacciones con otras proteínas.

7. OBJETIVOS PARTICULARES

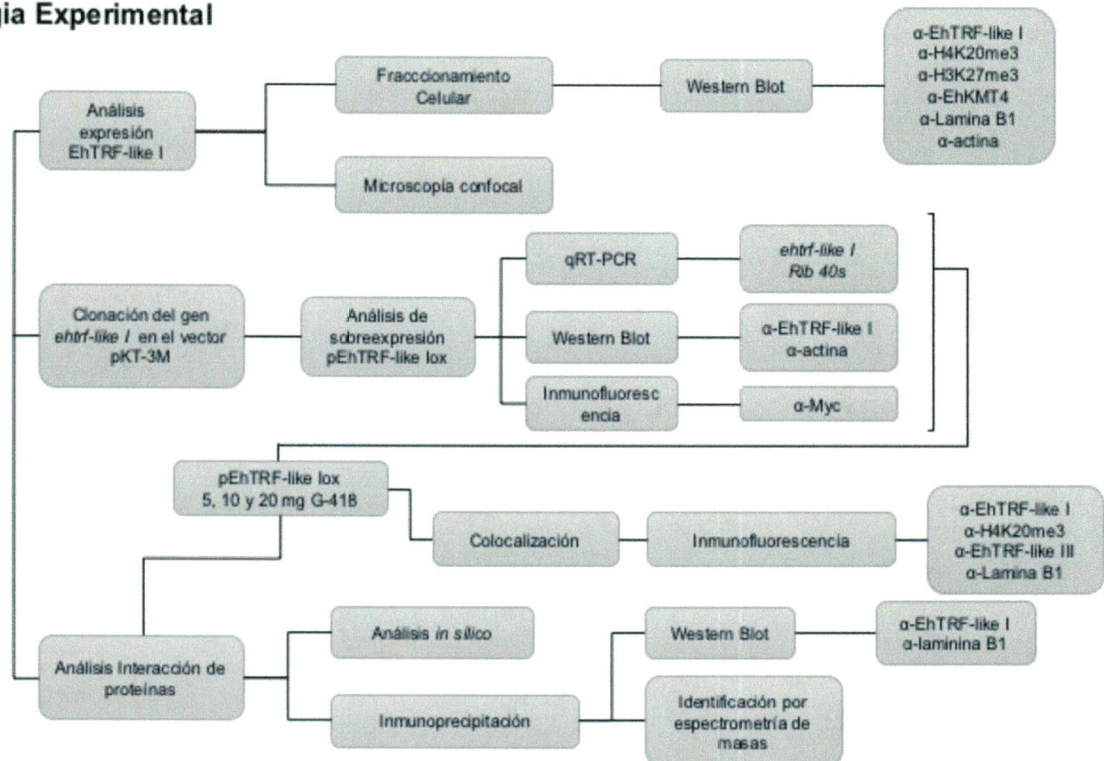
1.- Determinar la expresión y localización subcelular de la proteína EhTRF-like I en trofozoítos de *E. histolytica* en condiciones basales.

2.- Determinar la co-localización de EhTRF-like I con Laminina B1 y proteínas relacionadas con la función telomérica

3.- Determinar la interacción de EhTRF-like I con proteínas relacionadas con la función telomérica en *E. histolytica*.

8. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

Estrategia Experimental



9. METODOLOGÍA

9.1. Cultivo de trofozoítos de *E. histolytica*

Los trofozoítos de las clonas A (Cepa HM1: IMSS) se cultivaron axénicamente a 37°C en tubos en medio TYI-S-33 (Diamond *et al.* 1978) suplementado con suero bovino (Microlab) al 15% (inactivado por calor), 3% de vitaminas de Diamond (Sigma-Aldrich), penicilina 0.25 µg/mL (Pengesod, Lakeside) y estreptomycin 35 µg/mL (SULFESTREP, Pisa). Para realizar los experimentos, se usaron a los trofozoítos en fase de crecimiento logarítmica, los cuales se incubaron en un baño de hielo durante 10 min y se cosecharon por centrifugación a 1500 rpm durante 5 min a 4°C.

9.2. Clonación del gen *ehtrf-like I* en el vector pKT3M

Para la clonación y sobre-expresión del gen *ehtrf-like I* ubicado en el *locus* EHI_001090 se utilizó el vector pKT-3M el cual contiene el promotor del gen de la *cisteína sintasa* en el extremo 5' UTR y los sitios de restricción para las enzimas *SmaI* y *XhoI*. Este plásmido contiene además una secuencia que codifica para la etiqueta de Myc (EQKLISEEDL) (Figura 16). El gen *ehtrf-like I* se obtuvo a partir de la construcción previa del plásmido pBackbone-EhTRF-like I mediante una restricción con las enzimas *SmaI* y *XhoI*. El plásmido pKT3M y el gen *ehtrf-like I* obtenido se ligaron y se transformaron en células de *Escherichia coli* DH5α. Una vez obtenidas las colonias positivas, se obtuvo su DNA plasmídico y se restringió con las enzimas mencionadas considerándose positivas aquellas clonas que liberaron el inserto que corresponde al tamaño del gen *ehtrf-like I* y así obtener la construcción pEhTRF-like I ox.

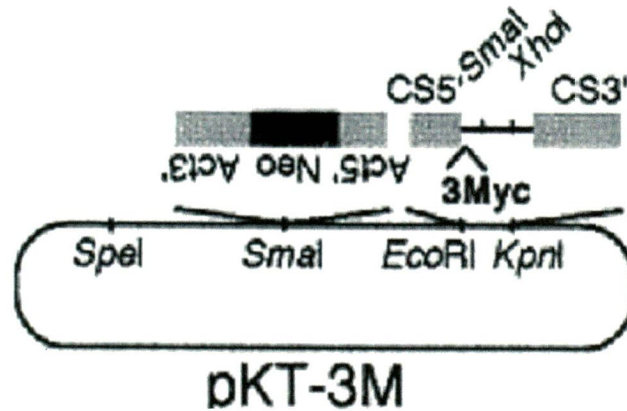


Figura 16. Vector de sobreexpresión pKT-3M. Se muestra esquema del vector de sobreexpresión pKT-3M que contiene el promotor del gen de la *cisteín sintasa* para la expresión del gen en estudio, la etiqueta del *tag* de Myc (el cual consta del 3 veces repetido el péptido EQKLISEEDL), los sitios de restricción *SmaI* y *XhoI* y el gen de resistencia al antibiótico neomicina, el cual se expresa bajo el promotor del gen de *actina* (Tomado de Saito, 2004).

9.3. Purificación de los fragmentos para la ligación

9.3.1. Purificación del plásmido pKT-3M

Para llevar a cabo la ligación primeramente se purificó el plásmido pKT-3M mediante el kit Plasmid Midi Purification QIAGEN en donde bacterias *dH5α* transformadas con este plásmido se crecieron en un matraz con 100 ml de medio Luria (LB) a 100 µg/mL del antibiótico ampicilina (Sigma-Aldrich) a una concentración de 100 µg/mL y se incubaron overnight a 200 rpm a 37°C. Al siguiente día se cosecharon las bacterias por centrifugación a 8000 rpm por 10 min a 4°C, se resuspendió el pellet en 4 mL de buffer de resuspensión P1. Se agregaron 4 mL de buffer de disolución P2 y se mezcló por inversión e incubó a temperatura ambiente por 5 min. Posteriormente, se adicionaron 4 mL de buffer de precipitación P3 mezclando e incubando en hielo por 15 min. Se centrifugó la mezcla a 9000 rpm por 30 min a 4°C y se removió el sobrenadante conteniendo el DNA. La mezcla fue centrifugada nuevamente a 9000 rpm a 4°C durante 15 min para recuperar más DNA.

Se dejó equilibrar una columna QIAGEN-TIP adicionando 4 mL de buffer de lavado QBT dejando vaciar la columna por flujo continuo. Después se aplicó el sobrenadante conteniendo el DNA en la columna permitiendo el paso por flujo continuo. Se lavó la columna 2 veces con 10 mL de buffer de lavado QC para remover contaminantes. Se

eluyó el DNA adicionando 5 mL de buffer de elución QF y se colectó la muestra en un tubo de 50 mL conteniendo 3.5 mL de isopropanol para precipitar el DNA. La muestra se centrifugó a 9000 rpm por 30 min, se decantó y se agregaron 2 mL de etanol al 70% y se centrifugó a 9000 rpm durante 10 min. La muestra se secó al aire por 20 min y se resuspendió en 200 µL de H₂O de ampolleta y se cuantificó en el equipo NanoDrop Lite (Thermo Fisher Scientific).

9.3.2. Purificación del gen *ehtrf-like I*

Una vez realizada la restricción del plásmido pBackbone-EhTRF-like I se liberó el inserto el cual fue visualizado, cortado y transferido a un tubo eppendorf para llevar a cabo su purificación mediante el kit QIAEX II Gel Extraction Kit (QIAGEN) en el cual se le adicionó 900 µL de buffer de resuspensión QX1. Se agitaron las partículas de sílice QIAEX II en vórtex por 30 segundos y se agregaron 30 µL a la muestra. Se incubó el tubo por 10 min a 50°C para solubilizar agarosa mezclando cada 2 min. El tubo fue centrifugado a 13000 rpm por 30 segundos y se lavó la pastilla con 500 µL de buffer QX1. Se resuspendió en vórtex por 30 seg y se centrifugó nuevamente a 13000 rpm por 30 seg. Se decantó el sobrenadante conteniendo contaminantes de agarosa. El pellet se lavó 2 veces con buffer de lavado PE, se vortexeó la muestra y se centrifugó por 30 segundos para remover sobrenadante conteniendo sales contaminantes. La muestra se dejó secar al aire por 30 min hasta que tomó un color blanco. Se eluyó el DNA con 20 µL de H₂O, se resuspendió y se dejó incubando por 5 min a temperatura ambiente. Finalmente, se centrifugó por 30 seg a 13000 rpm y se obtuvo el sobrenadante conteniendo el DNA purificado el cual fue cuantificado en el equipo NanoDrop Lite (Thermo Fisher Scientific).

9.4. Ligación del vector pKT-3M y el gen *ehtrf-like I*

Una vez purificados y cuantificados el vector y el inserto se calculó la relación vector: inserto para determinar las proporciones que permitieron realizar la reacción de ligación. La relación vector:inserto utilizada fue de 1:3 se calculó mediante la siguiente fórmula:

$$\text{ng de inserto} = R (3) \left(\frac{\text{Concentración del vector en ng/}\mu\text{l}}{\# \text{ pares de bases del inserto}} \right) / \# \text{ pares de bases del vector}$$

Las reacciones de ligación fueron realizadas en un volumen de 10 μ l como se muestra en la siguiente tabla:

COMPONENTES	VOLUMEN
Buffer de reacción 10X (Invitrogen)	1 μ L
Inserto	1.36 μ L
Plasmido	1 μ L
Enzima ligasa	1 μ L
H ₂ O cpb	10 μ L

Una vez realizada la reacción se incubó a una temperatura de 16°C durante 16 h. Al finalizar el tiempo de incubación se almacenó la reacción a -20°C para seguir con el proceso de transformación.

9.5. Transformación de células DH5 α con la reacción de ligación pKT-3M-*ehtrf-like I*

Se realizó la técnica de transformación en condiciones de esterilidad en el cual 50 μ l de células competentes DH5- α fueron mezcladas con 5 μ L de la reacción de ligación e incubadas por 20 min en hielo. Las células fueron sometidas a choque térmico durante 90 seg a una temperatura de 42°C. Inmediatamente las células se colocaron en hielo y se dejaron incubar por 5 min. Se adicionaron 300 μ l de medio LB y se incubó a una temperatura de 37°C durante 50 min con una agitación de 200 rpm. Pasado el tiempo de incubación se plaquearon las células en una caja Petri con LB agar preparada con ampicilina a una concentración de 100 μ g/mL la cual fue incubada por 16 h a una temperatura de 37°C. El siguiente día se obtuvieron colonias candidatas crecidas en las cajas de cultivo que fueron procesadas para extraer el DNA plasmídico.

9.6. Extracción del DNAp de las clonas candidatas

Para llevar a cabo el proceso de extracción del DNA plasmídico (DNAp) de las clonas candidatas se utilizó el kit Wizard Plus SV Miniprep DNA Purification System (Promega) en el cual se picaron las colonias aisladas y se inocularon en 5 ml de medio LB (Sigma-

Aldrich) con ampicilina a una concentración de 100 µg/mL. Estos cultivos fueron incubados toda la noche a 37°C en agitación constante de 200 rpm. Al siguiente día se cosecharon los cultivos centrifugando 3 mL a 13000 rpm por 3 min a temperatura ambiente en tubos eppendorf. Se agregaron 250 µL de la solución Cell Resuspension Solution (CRA) y se resuspendieron por inversión. Después se adicionaron 250 µL de la solución Cell Lysis Solution (CLA) y se mezclaron los tubos suavemente. Se dejaron incubar por 5 min y pasado este tiempo se adicionaron 10 µL de la solución Alkaline Protease Solution, se mezclaron suavemente por inversión y se dejaron incubar por 3 min. Enseguida se adicionaron 350 µL de Neutralization Solution y se mezcló suavemente, se centrifugó el lisado bacterial a 13000 rpm durante 10 min a temperatura ambiente. El sobrenadante fue transferido a una columna spin provista en el kit evitando transferir precipitados blancos. Se centrifugó a 13000 rpm durante 1 min y el flujo recuperado en el tubo colector se desechó y se volvió a reinsertar la columna en el tubo colector. Se adicionaron 750 µL de Column Wash Solution y se centrifugó a 13000 rpm por 1 min. El flujo fue descartado y se reinserto la columna en el tubo colector. Se agregaron 250 µL de Column Wash Solution y se centrifugaron por 2 min a 13000 rpm a temperatura ambiente. La columna fue transferida a tubos eppendorf de 1.5 mL y se adicionaron 75 µL de agua libre de nucleasas para llevar a cabo la elución. Se centrifugaron los tubos a 13000 rpm durante 1 min a temperatura ambiente en los cuales se obtuvo el DNAp eluído y se conservaron a -20°C para su posterior cuantificación y análisis de integridad en un gel de agarosa al 1% y mediante doble digestión enzimas de restricción *SmaI* y *XhoI*.

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

Una vez obtenido y visualizado la integridad del DNA plasmídico de las clonas candidatas se verificó la liberación del inserto que corresponde al gen *ehtrf-like I*, para esto se sometieron de 100-200 ng de DNAp a una reacción de doble digestión utilizando las enzimas de restricción *SmaI* y *XhoI* también se utilizó buffer para las enzimas 4 (New

England Biolabs), BSA (New England Biolabs) y las reacciones se realizaron en un volumen final de 10 μL como se muestra en la tabla 6.

REACTIVOS	VOLUMEN
DNAp	3 μL
Buffer 4 para enzima de restricción	1 μL
BSA	1 μL
<i>Sma</i>	0.25 μL
<i>XhoI</i>	0.25 μL
H ₂ O cbp	10 μL

Las reacciones se dejaron incubando 4 horas a 25°C para permitir la actividad de la enzima *SmaI* y toda la noche a 37°C para permitir la actividad de la enzima *XhoI* en un equipo Multitemp III Thermostatic circulation (GE Healthcare Life Sciences). Posteriormente, se corrieron muestras de las reacciones en un gel de agarosa al 1% donde se visualizó la restricción de las clonas candidatas y se consideraron como positivas de la construcción pEhTRF-like I ox aquellas clonas que liberaron al inserto que correspondía al gen *ehtrf-like I*.

9.8. Secuenciación de la construcción pEhTRF-like I ox

Para corroborar que la construcción pEhTRF-like I ox contuviera al gen clonado *ehtrf-like I* sin mutaciones en sitios importantes del gen que modifiquen aminoácidos funcionales de la proteína las clonas positivas que liberaron el inserto se secuenciaron empleando el BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Thermo Fisher Scientific). Para este proceso se hicieron dos reacciones empleando los oligonucleótido sentido Fw (5'-TCCCCCGGGATGAATAACCCTCAGTTGC-3') y antisentido Rv (5'-GCGCGCCTCGAGTTATTGAGAAAGATCCAATTGTTTAAAT-3') los cuales amplifican la secuencia completa del gen *ehtrf-like I*, se utilizaron 400 ng de DNAp como templado,

amortiguador de BigDye™ Terminator v1.1 5X y la mezcla de reacción de BigDye™ Terminator v3.1 Ready Reaction Mix en un volumen final de reacción de 20 µL como se muestra en la tabla 7.

Tabla 7. Reacción para la PCR de secuenciación de la construcción pEhTRF-like I ox

REACTIVOS	VOLUMEN
DNAp	3 µL
Oligonucleótido (Fw ó Rv)	1 µL
BigDye™ Terminator v1.1 5X Sequencing Buffer	2 µL
BigDye™ Terminator v3.1 Ready Reaction Mix	0.25 µL
H ₂ O cbp	20 µL

Las reacciones se colocaron en el termociclador GeneAmp® PCR System 9700 (Applied Biosystems) con las siguientes condiciones:

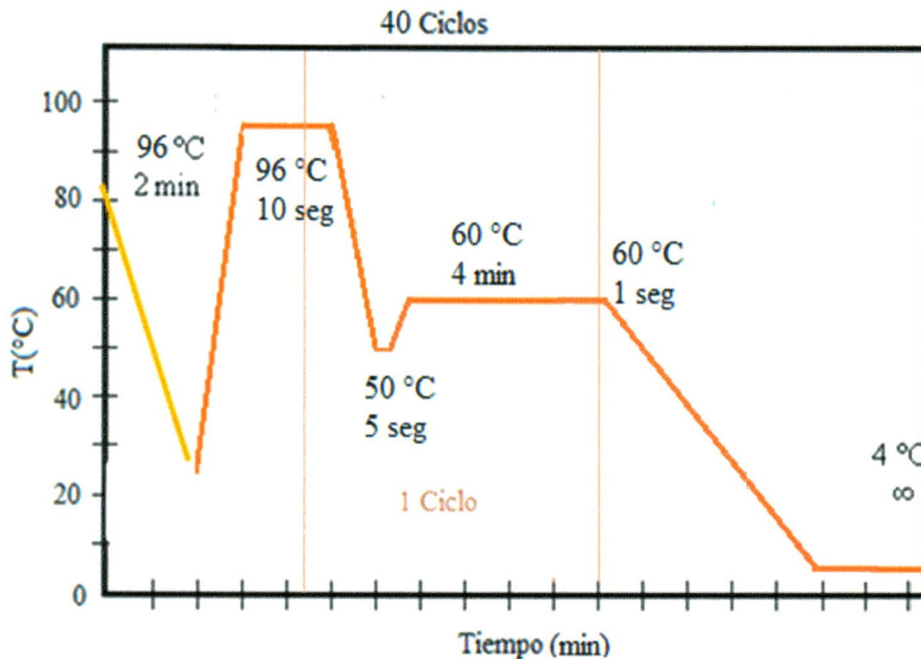


Figura 17. Condiciones utilizadas para la amplificación del gen *ehtrf-like 1* para su secuenciación de las clonas positivas obtenidas de la ligación.

9.9. Purificación de las reacciones de secuenciación de las clonas positivas

Una vez terminada las reacciones de secuenciación fueron purificadas utilizando el kit DyeEx 2.0 Spin (Qiagen) en el cual se vortexeó la columna provista en el kit para resuspender la resina, se aflojó la tapa un cuarto de vuelta para evitar la generación de vacío dentro de la columna. Se rompió el sello inferior de la columna y se colocó en un tubo de colección de 2 mL provisto en el kit, éste se centrifugó a 750 g durante 3 min. Posteriormente, la columna fue transferida a un tubo de centrifuga limpio y lentamente se aplicaron los 20 µL de la reacción de secuenciación en el centro de la resina permitiendo la absorción de la reacción. Se centrifugó la columna a 750 g por 3 min y la columna fue removida del tubo colector. Este eluido contenía el DNA purificado el cual fue protegido de la luz con aluminio y secado al vacío en un concentrador-evaporador (EPPENDORF) durante 45 min. Posteriormente, la muestra fue conservada a -20°C para ser llevadas al M. en C. Eduardo Carrillo Tapia responsable del secuenciador del Posgrado en Ciencias Genómicas de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México.

Una vez obtenidas las secuencias se editaron en el programa BioEdit, se analizaron y alinearon utilizando el programa MUSCLE (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/muscle/>), este alineamiento fue sombreado utilizando la herramienta BOXSHADE (https://embnet.vital-it.ch/software/BOX_form.html).

9.10. Purificación del plásmido pKT-3M y el pEhTRF-like I ox para la transfección.

Para llevar a cabo la transfección los plásmidos pKT-3M y la construcción pEhTRF-like I ox fueron purificados mediante el kit Plasmid Midi Purification (QIAGEN) como previamente se describió.

9.11. Transfección de los trofozoítos con la construcción pEhTRF-like I ox

La transfección de los trofozoítos de *E. histolytica* se realizó mediante lipofección a partir de dos tubos de 12 ml con medio TYI-S-33 a una confluencia de 80 a 90%, con ellos se sembró una caja de 25 cm², llenándola completamente con medio TYI-S-33, transcurridas las 24 horas estas células se utilizaron para sembrar una caja de 6 pozos con 800,000 trofozoítos por pozo. Se adicionaron 5 ml de medio TYI-S-33 tibio por pozo y se incubaron a 37 °C con CO₂ durante 30 min para permitir que los trofozoítos se adhirieran a los pozos. Durante los 30 minutos de incubación se realizó en esterilidad la mezcla de transfección en tubos eppendorf mezclando 20 µL del reactivo Superfect (Qiagen), 20 µg de los plásmidos pEhTRF-like I ox y pKT-3M (control de vector vacío), 100 µL de medio M199 (Invitrogen, CA) suplementado con 5.7 mM cisteína, 1 mM ácido ascórbico, y 25 mM HEPES y se ajustó su pH a 6.8 (este medio se le llamó M199s) de acuerdo a lo descrito por Abhyankar y cols. (2008) y se incubó a temperatura ambiente por 10 min. Transcurrido el tiempo de incubación se retiró el medio TYI-S-33 de la placa de 6 pozos y se adicionó la mezcla de transfección lentamente gota a gota sobre la monocapa de trofozoítos formada en cada uno de los pozos. Posteriormente, se incubaron a 37°C por 4 h. Al terminar este periodo de tiempo se enfrió la placa en un baño de hielo-agua durante 15 min y se colectó el medio con trofozoítos en tubos de 12 mL con medio TYI-S-33 previamente entibiado y se incubaron a 37°C durante 48 h. Transcurrido este tiempo se inició con la selección con antibiótico G418 a una

concentración de 1 µg/mL, la concentración se incrementó conforme los tubos alcanzaron una confluencia de 80% hasta llegar a 20 µg. Se mantuvieron cultivos de estas células transfectadas en las concentraciones 5, 10 y 20 µg de G-418. Los cultivos a las concentraciones de antibiótico empleadas, se expandieron en cajas de 25 cm² para extraer RNAm, proteínas (totales, citoplásmicas y nucleares) y realizar microscopias de fluorescencia.

9.12. Extracción y cuantificación del RNA total

Para llevar a cabo el proceso de extracción del RNA total de los trofozoítos transfectados se utilizó la solución TRIzol (Invitrogen) donde 3×10^6 trofozoítos de cada condición fueron cosechados por incubación a 4°C por 15 minutos y centrifugadas a 1500 rpm durante 5 min a una temperatura de 4°C para la obtención del pellet celular en donde se adicionó 1 mL de TRIzol a cada muestra y se transfirió la suspensión a tubos de 1.5 mL los cuales fueron conservados a -70°C hasta su uso. Para la extracción, las muestras fueron incubadas a temperatura ambiente por 15 min, posteriormente se les adicionaron 200 µL de cloroformo a cada tubo y se agitaron vigorosamente durante 15 seg. La mezcla se dejó incubando durante 3 min a temperatura ambiente y se centrifugaron a 12000 g por 15 min a una temperatura de 4°C. La fase acuosa se recuperó y se transfirió a nuevos tubos donde se adicionaron 500 µL de isopropanol dejándose incubar a temperatura ambiente por 10 min, se centrifugaron a 12000 g a 4°C durante 10 min y se decantaron los tubos.

Las pastillas fueron lavadas con 1 mL de etanol al 75% por vortexeó, se centrifugaron a 7500 g a 4°C durante 5 min y se decantó para posteriormente dejar secar al aire las pastillas durante 10 min. El RNA se solubilizó y se hidrató en 100 µL de agua libre de nucleasas y se cuantificó en el NanoDrop Lite. El RNA obtenido fue tratado con DNAsa I (Promega) en donde se utilizaron 5-8 µg de RNA, 5 µL de buffer para RT 5X, 1 µL de DNAsa I en un volumen final de 25 µL y se incubaron a 37°C durante 1 h.

Posteriormente, se realizó un tratamiento con fenol-cloroformo-álcohol isoamílico (Sigma-Aldrich) para limpiar impurezas adicionando a la muestra de RNA un volumen en

relación 1:1, se agitó durante 15 seg y se centrifugó a 12000 g durante 15 min. La fase acuosa fue recuperada y transferida a otro tubo nuevo donde se estimó el volumen obtenido y se agregó acetato de amonio 0.5 M con la finalidad de tener la muestra a una concentración final de 1 M. Después se adicionó isopropanol en una relación 1:1, la muestra se incubó en hielo por 10 min, se centrifugó a 14000 g durante 20 min a una temperatura de 4°C, se decantó y lavó el pellet con 200 µL de etanol al 75%, se dejó secar la muestra a 37°C y se agregaron 100 µL de agua libre de nucleasas. Se adicionó acetato de amonio como se menciona anteriormente y se agregó etanol absoluto en una relación de volumen 3:1 para precipitar el RNA, el cual se mantuvo a -70°C para su uso posterior.

9.13. Ensayos de RT-PCR para determinar la sobreexpresión del gen *ehtrf-like I*

Para los ensayos de RT-PCR se tomaron 20 µL de la muestra de RNA, se centrifugaron a 14000 g a 4°C durante 20 min, se decantó el sobrenadante y se lavó 2 veces con 100 µL de etanol al 75%, se dejó secar las pastillas y se hidrataron con 10 µL de agua libre de nucleasas. El RNA fue cuantificado a una longitud de onda de 280 nm en el NanoDrop Lite y se llevó a una concentración de 500 ng/µL, del cual se tomó 1 µL de cada condición para realizar la mezcla de la reacción de retrotranscripción como se muestra en la Tabla 8 y se incubaron en el termociclador modelo GeneAmp® PCR System 9700 thermal cycler con las condiciones mostradas en la figura 18.

Tabla 8. Condiciones de reacción de RT para la obtención de cDNA

Reactivos	Volumen
RNA	1 µL
Oligo dT (0.02M) (Promega)	1 µL
Buffer Improm II 5X	4 µL
MgCl ₂ 25mM	2.4 µL

dNTPs 10mM	1 μ L
RNAasin 1U/ μ L (Promega)	0.5 μ L
RetroTranscriptasa Improm II (Promega)	1 μ L
H ₂ O cbp	20 μ L

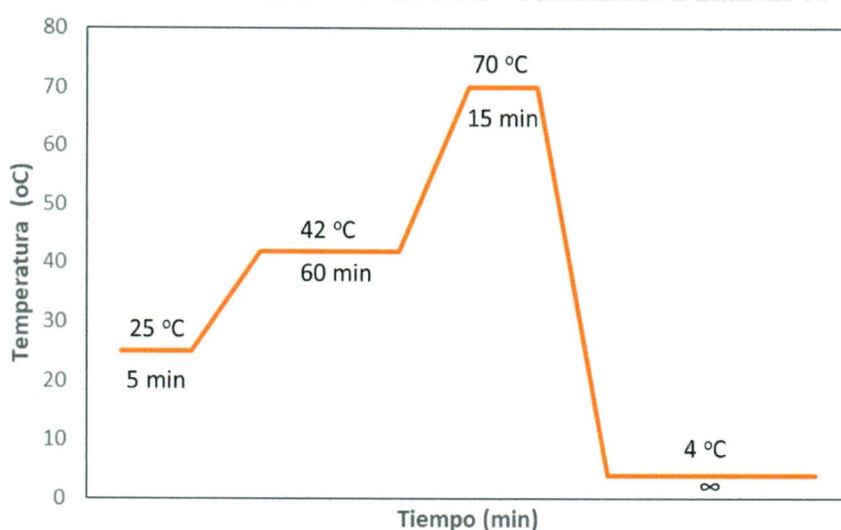


Figura 18. Condiciones de RT para síntesis de cDNA.

Una vez obtenidos los productos de cDNA se amplificaron los genes *ehtrf-like I* y *Rib40s*, empleando los oligonucleótidos EhTRFl_{ike}001090Fw (5'-ACCCTCAGTTTGCAACCCTT-3') y EhTRFl_{ike}001090Rv (5'-AGGACTTTGTTCCATTTTACTTCA-3') para amplificar un fragmento interno del gen de 98 pb. Como normalizador se utilizaron los oligonucleótidos para el gen ribosomal 40s *rib40s* (5'-ATTCGGAATAGAAGAGGAGG-3') y *rib40as* (5'-ACTAATCTTCCAAGCTTGGT-3'). Como control de RT (-) se realizó la reacción de PCR del RNA total sin tratar con retrotranscriptasa. Los reactivos se agregaron de acuerdo a la tabla 9 y las condiciones de amplificación de la Figura 19.

Tabla 9. Condiciones de reacción de PCR.

Reactivos	Volumen
cDNA	2 μ L
Oligo Fw	1 μ L
Oligo Rv	1 μ L
MgCl ₂ 25mM	4 μ L
dNTPs 10mM	1 μ L
Buffer Go Taq Pol 5X	0.25 μ L
Go Taq Polimerasa (Promega)	5 μ L
H ₂ O cbp	25 μ L

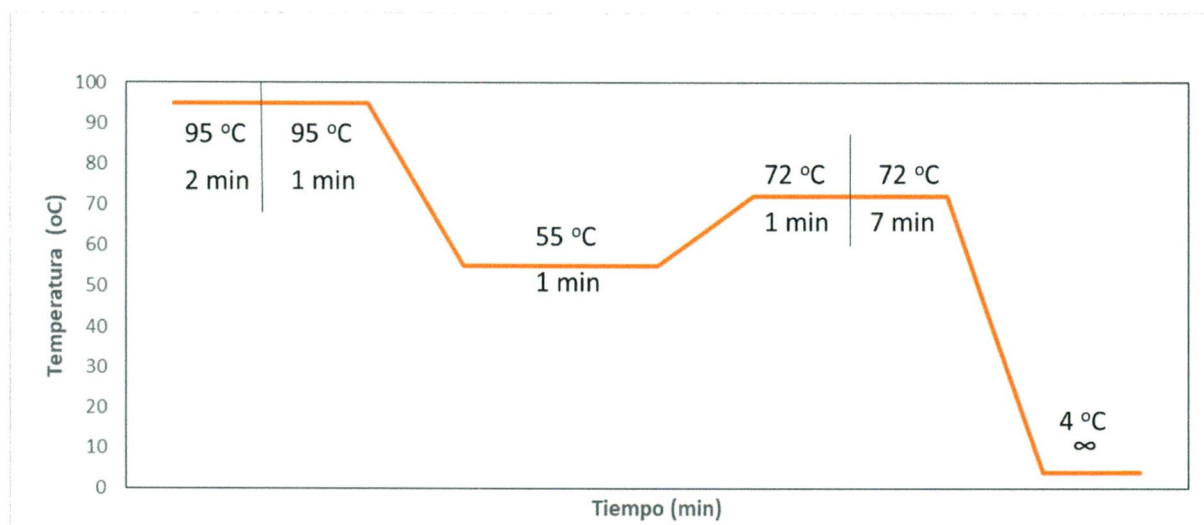


Figura 19. Condiciones de amplificación para la reacción de PCR del gen *ehtrf-like I*.

9.14. Ensayos de RT-qPCR para determinar la sobreexpresión del gen *ehtrf-like I*

Para realizar las cuantificaciones de los transcritos de los genes *ehtrf-like I* y *Rib40s* se empleó QuantiFast SYBR Green RT-PCR (Qiagen). La amplificación fue realizada en placa de 96 pozos en la cual se tomaron 2 μ l de la RT respectiva y se adicionaron 25 μ l de 2x QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix y se llevó a un volumen final de 50 μ l con H₂O libre de RNAsas. Posteriormente se evaluó la expresión mediante el análisis del $\Delta\Delta$ Ct donde el la siguiente formula:

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

9.15. Obtención de extractos totales de los trofozoítos de *E. histolytica*

Para obtener las proteínas totales se cosecharon trofozoítos de *E. histolytica* (clona A o transfectadas con los plásmidos pKT-3M o pEhTRF-like I ox) y se lavaron en PBS 1X pH 6.8 a 1500 rpm por 5 min. Posteriormente, se realizó el conteo celular en una cámara Neubauer y se hicieron alícuotas de 3×10^6 de células en tubos eppendorf. Los tubos se centrifugaron y se les adicionó TCA al 10% en PBS 1X pH 6.8 de y se incubaron a 4 °C durante la noche. Al finalizar la incubación se realizaron lavados con 1 mL de PBS 1X a 13000 rpm por 5 min. La pastilla obtenida se resuspendió en 300 μ l de buffer de muestra 1X y se conservó a -20°C. También, para la extracción de proteínas totales se utilizó TRIS-pHMB 100 mM (Sigma-Aldrich) se cosecharon los trofozoítos y se lavaron con PBS 1X pH 6.8 a 1500 rpm por 5 min. Se realizó el conteo celular y se dejaron alícuotas de 3×10^6 células en tubos eppendorf, los cuales se centrifugaron y se adicionaron 100 μ l de TRIS pHMB 100mM, 1 μ l de E64 10mM (Sigma-Aldrich), 1 μ l de PMSF 200mM (Sigma-Aldrich) y 5 μ l de Coctel de inhibidores 50x cOmplete™ Protease Inhibitor Cocktail (Sigma-Aldrich) y posteriormente se realizaron ciclos de congelamiento-descongelamiento para posteriormente centrifugarlos 5 min a 14000 rpm a 4°C y recuperar los sobrenadantes. Los extractos obtenidos de esta manera se cuantificaron por el método de Bradford y se analizó su integridad por SDS-PAGE.

9.16. Obtención de extractos citoplásmicos y nucleares solubles e insolubles

Para obtener las proteínas citoplasmáticas y nucleares de *E. histolytica* se utilizó el protocolo descrito por Schreiber et al. 1989, para ello los trofozoítos (1×10^6) en fase de crecimiento logarítmica se incubaron en un baño de agua-hielo durante 10-15 min, agitándose suavemente hasta ser despegadas de las paredes de cultivo, luego se cosecharon por centrifugación a 1500 rpm durante 5 minutos a 4°C y se lavaron en 1 ml de PBS 1X pH 6.8 para lavarlas. Las pastillas de células se resuspendieron en 400 μl de buffer A (10 mM HEPES pH 7.9, 10 mM KCl, 0.1 mM EDTA, 0.1 mM EGTA, 1mM DTT, 0.5 mM PMSF) por cada 1×10^6 trofozoítos mezclando suavemente. Luego de 5 a 10 minutos, cuando las células se hincharon, se añadieron 25 μl de NP40 al 10% por cada 1×10^6 trofozoítos. Estas se agitaron vigorosamente en el vórtex y se centrifugaron a 14000 rpm durante 10 min. El sobrenadante conteniendo a las proteínas citoplasmáticas se transfirió a nuevos tubos. Se resuspendió la pastilla en el mismo volumen de buffer A y se colocó sobre un colchón de sacarosa 0.3M (1mL). Enseguida la pastilla nuclear se resuspendió en 12.5 μl de buffer C (HEPES 20 mM pH 7.9, NaCl 400 mM, EDTA 1mM; EGTA 1 mM; DTT 1 mM; PMSF 1 mM, 1X cocktail inhibidor de proteasas) agregando además 20 mL de cocktail de inhibidores de proteasas por cada 1×10^6 trofozoítos. Para obtener las fracciones nucleares solubles, los tubos se agitaron energéticamente en el vórtex a 4°C durante 30 min. Finalmente, se centrifugaron durante 5 min a 4°C y los sobrenadantes, conteniendo las proteínas nucleares solubles, se alicuotaron en tubos eppendorf, se congelaron y se almacenaron a -70°C junto con los extractos citoplásmicos previamente obtenidos. A los núcleos remanentes se les agregó buffer de RIPA (20 mM Tris-HCl (pH 7.5). 150 mM NaCl, 1 mM Na₂EDTA. 1 mM EGTA. 1% NP-40) y sonicaron para clarificarlos utilizando 3 ciclos de 30s con amplificación de 60% y de esta manera se obtuvieron la fracción nuclear insolubles. Los extractos nucleares insolubles se cuantificaron por el método de Lowry empleando el kit DC™ (detergent compatible) protein assay y se analizó su integridad por SDS-PAGE.

9.17. Cuantificación de las proteínas

La cuantificación de las proteínas obtenidas se realizó utilizando el reactivo del kit Proteín Assay II (Bio-Rad) en el cual está basado en el método de Bradford que se preparó a una dilución 1:5 en agua destilada y se filtró en un Whatman #1 para remover partículas precipitadas. También se preparó una solución concentrada de BSA a una concentración de 1480 ng/ μ L, en agua desionizada y a partir de esta se preparó una solución concentrada de BSA como se muestra en la siguiente tabla 10.

Tabla 10. BSA 1200 ng/ μ L.

Reactivo	Volumen
BSA 1480 ng/ μ L	900 μ L
H ₂ O	210 μ L
Vol. Final	1110 μ L

Se preparó una curva de BSA en tubos de 1.5 mL, como se muestra en la tabla 11.

Posteriormente, en una placa de 96 pozos se adicionaron 200 μ L de la solución diluída de Bradford a cada pozo considerando los pozos para la curva como para las muestras por triplicado. Se adicionaron 10 μ L de cada punto de la curva y de muestra a su pozo correspondiente y se incubó la placa a temperatura ambiente por 5 min cuidando de no sobrepasar el tiempo de incubación. Pasado el tiempo de incubación se midió la absorbancia a 595 nm en un lector de placas para ELISA y con base en las lecturas se determinó la cantidad de proteína a cargar en los geles SDS-PAGE.

Tabla 11. Curva de BSA 0-1200 ng/mL

Reactivo	Concentración ng/mL									
	0	150	300	450	600	750	900	1050	1200	
BSA 1200 ng/ μ L (μ L)	0	12.5	25	37.5	50	62.5	75	87.5	100	
H ₂ O (μ L)	100	87.5	75	62.5	50	37.5	25	12.5	0	
Vol. Final (μ L)	100	100	100	100	100	100	100	100	100	

9.18. Ensayos de Inmunodetección para determinar la sobreexpresión de la proteína EhTRF-like I y su localización.

Se usaron anticuerpos policlonales contra la proteína EhTRF-like I obtenidos al inmunizar un conejo macho Nueva Zelanda con un péptido diferencial para esta proteína (CIEDKCVVAHHIIDQ) acoplado a KLH, los cuales fueron diseñados, obtenidos y purificados por el Dr. Francisco Javier Rendón Gandarilla (Estancia Posdoctoral-CONACYT). Este anticuerpo primeramente se tituló en ensayos de inmunodetección para determinar la dilución de reconocimiento de la proteína EhTRF-like I en extractos totales de trofozoítos de *E. histolytica*. Las proteínas de las células wt o las transfectadas con las construcciones pEhTRF-like I ox y pKT-3M se separaron por electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE) de la siguiente manera: el gel separador se preparó con acrilamida al 10%, Bis-acrilamida 0.9%, Tris- HCl 0.375 M (pH 8.8) y SDS al 0.1 %. El gel se polimerizó agregando 0.05% de persulfato de amonio (PSA) y 0.003% de TEMED. El gel concentrador se preparó con acrilamida al 5%, Bis-acrilamida 0.36%, Tris-HCl 0.125 M (pH 6.8), SDS al 0.1%, PSA 0.05% y TEMED 0.005%. Para correr el gel, se utilizó una solución amortiguadora de Tris 0.25 M, glicina 1.92 M, 0.1% de SDS (pH 8.3) y se llevó a cabo manteniendo un voltaje constante de 100 V durante 1.5 horas. Posteriormente, las proteínas separadas por SDS-PAGE se transfirieron a membranas de nitrocelulosa.

9.19. Transferencia de las proteínas separadas por SDS-PAGE a membranas de nitrocelulosa

Para transferir las proteínas separadas por SDS-PAGE a membranas de nitrocelulosa, inicialmente las membranas de nitrocelulosa y los papeles de Whatman fueron incubados por 5 minutos en solución de transferencia de proteína (20% metanol, 10% Tris-Glicina). Posteriormente, se armó y conectó la cámara de transferencia para permitir migrar a las proteínas del polo negativo al positivo, de esta manera transfirieron del gel de poliacrilamida a la membrana de nitrocelulosa. Para ello, primero se colocó una fibra, de papel Whatman y la membrana de nitrocelulosa y a continuación la matriz de poliacrilamida, otro papel Whatman y por último otra fibra. Una vez armado el dispositivo se corrió a 20 Volts por 20 minutos. Finalmente, la presencia de las proteínas en la

membrana se confirmó por medio de tinción con rojo Ponceau 100 mg rojo (Ponceau Sigma-Aldrich) por 3 min. Después las membranas se lavaron con PBS-Tween 20 al 0.1% para retirar el colorante, una vez transferidas las proteínas a las membranas, estas se incubaron overnight en una solución bloqueadora, que contiene 5% de leche descremada (Svelty) con PBS-Tween 20 al 0.1%.

Posteriormente, se le agregó los anticuerpos primarios α -EhTRF-like I (1:2500) en una solución que contiene 1% de BSA en PBS-Tween 20 al 0.1%, α -EhKMT4 (1:1000), donado por el Dr. Mario Rodríguez del Departamento de Infectómica y Patogénesis Molecular); α -H3K27me3 (1:1000, Cell Signaling Technology), α -H4K20me3 (1:1000, Abcam), α -Laminina B1 (1:1000, Abcam), α -actina (1:1000, Sigma-Aldrich) overnight en agitación constante a una temperatura de 4° C. Después las membranas se lavaron cinco veces con PBS-Tween 20 al 0.1% y se les adicionó el anticuerpo secundario acoplado a peroxidasa (anti-IgG de conejo marca Jackson Immune Research) diluido 1:5000 en una solución de PBS-Tween 20 al 0.1% y leche descremada al 2.5% por 1 hora a 37°C en agitación; las membranas se lavaron cinco veces con PBS-Tween 20 al 0.1%, se adicionó sustrato para la peroxidasa Luminata Forte HRP (Millipore) y se visualizaron las membranas en el equipo ChemiDoc MP (BIO-RAD) para detectar a la proteína.

9.20. Ensayos de inmunolocalización para determinar la localización de la proteína EhTRF-like I y la colocación de las proteína EhTRF-like I, EhTRF-like III, Laminina B1 y la marca telomérica H4K20me3 en trofozoítos transfectados

Para determinar la localización de la proteína EhTRF-like I los trofozoítos se centrifugaron a 1500 rpm durante 5 min a 4 °C, y se añadió la cantidad de 800,000 trofozoítos en 200 μ l de medio TYI-S33 a los pozos de una placa de 6 pozos (Corning), dentro de los cuales previamente se colocaron cubreobjetos tratados con etanol absoluto y acetona y estériles. Las placas se incubaron durante 15 min a 37 °C hasta que las células quedaron adheridas, enseguida se les retiró el medio y estas fueron permeabilizadas con etanol absoluto a -20°C por 20 minutos y se lavaron 3 veces con PBS pH 6.8, se mantuvieron a 4°C para su uso posterior. Las preparaciones se lavaron

2 veces con PBS tibio y se adicionó 1 ml de NH_4Cl a 50 mM incubándose por 30 minutos a 37°C . Se retiró el NH_4Cl y para evitar uniones inespecíficas de los anticuerpos, las preparaciones se bloquearon con solución de BSA al 1% a 37°C durante 30 minutos, posteriormente se adicionaron los anticuerpos primarios $\alpha\text{-EhTRF-like I}$ (1:200) y $\alpha\text{-Myc}$ (1:200, Cell Signaling Technology) $\alpha\text{-EhTRF-like III}$ (1:200), $\alpha\text{-H4K20me3}$ (1:200, Abcam) y $\alpha\text{-Laminina B1}$ (1:50, Abcam) incubándose toda la noche a 4°C . Al día siguiente se añadió el anticuerpo secundario anti IgG de conejo acoplado a fluoresceína FITC (Zymed) en una dilución 1:200, se realizaron tres lavados con PBS pH 6.8 para posteriormente montar los cubreobjetos en portaobjetos estériles con 15 μL de Vectashield DAPI (Vector Laboratories) para así teñir el núcleo con DAPI. Las preparaciones se observaron en un microscopio confocal Leica (SP2) en CINVESTAV con ayuda de la Dra. Abigail Betanzos Fernández, Catedrática CONACYT, del Departamento de Infectómica y Patogénesis Molecular. Las imágenes obtenidas se procesaron y analizaron usando el programa Image J.

9.21. Marcaje de los anticuerpos $\alpha\text{-EhTRF-like I}$, $\alpha\text{-EhTRF-like III}$, $\alpha\text{-Laminina B1}$ y $\alpha\text{-H4K20me3}$

Para los ensayos de colocación los anticuerpos $\alpha\text{-EhTRF-like I}$, $\alpha\text{-EhTRF-like III}$, $\alpha\text{-Laminina B1}$ y $\alpha\text{-H4K20me3}$ se marcaron utilizando el kit Alexa Fluor Protein Labeling Kit (ThermoFisher Scientific), el cual se basa en la unión del fluoróforo que contiene un grupo succinimidil éster que reacciona con las aminas de las proteínas para formar un conjugado fluoróforo-proteína muy estable. Para el marcaje se usaron los siguientes fluoróforos: Alexa-647 para el marcaje del anticuerpo $\alpha\text{-EhTRF-like I}$, Alexa-555 para el marcaje de $\alpha\text{-Laminina B1}$ y Alexa-488 para los anticuerpos $\alpha\text{-EhTRF-like III}$ y $\alpha\text{-H4K20me3}$.

Se siguió el protocolo provisto en el kit para lo cual se preparó una solución de bicarbonato de sodio 1 M por adición de 1 mL de agua desionizada en el vial provisto en el kit de bicarbonato de sodio (Componente B), se vortexeó hasta disolverse totalmente. Se agregó un 10% de esta solución al vial que contenía el anticuerpo a ser marcado (10-100 μg). Se transfirió la solución del anticuerpo a ser marcado a un vial de marcaje Alexa Fluor (Componente A), se tapó el vial y se mezcló por inversión hasta disolver

completamente. La solución se incubó por 1 hora a temperatura ambiente mezclando el vial por inversión cada 10-15 minutos para incrementar la eficiencia del marcaje.

Se preparó la columna en un soporte de manera que su posición fuera vertical y la resina de purificación (Componente C) se vortexeó, entonces se agregó 1 mL de la resina en la columna permitiendo el flujo. Se continuó agregando suspensión hasta alcanzar un volumen de 1.5 mL en la columna y se dejó drenar el buffer por gravedad ejerciendo una presión al inicio para comenzar a eluir. La columna fue transferida a uno de los tubos colectores y se centrifugó por 3 minutos a 1100 g. Se descartó el buffer y se adicionó la solución de marcaje a la columna por goteo en el centro de la columna permitiendo la absorción en la resina. Posteriormente, la columna fue colocada en el tubo de colección y centrifugada por 5 minutos a 1100 g. Después de la centrifugación se obtuvo la proteína marcada en el tubo de colección y se descartó la columna que contenía la marca libre. Una vez teniendo los anticuerpos marcados se procedió a realizar la preparación de las muestras de inmunofluorescencia de los trofozoítos como previamente se describió, sin embargo para estos ensayos de colocalización los anticuerpos primarios marcados se mezclaron a sus diluciones correspondientes α -EhTRF-like I (1:100), α -EhTRF-like III (1:200), α -H4K20me3 (1:200), α -Laminina B1 (1:50) y se incubaron directamente sobre las preparaciones overnight. Posteriormente, se realizaron tres lavados con PBS pH 6.8 para después montar los cubreobjetos en portaobjetos estériles con 15 μ L de Vectashield DAPI (Vector Laboratories) para así contra teñir el núcleo con DAPI. Las preparaciones se observaron en un microscopio confocal Leica (SP2) en CINVESTAV con ayuda de la Dra. Abigail Betanzos Fernández, Catedrática CONACYT, del departamento de Infectómica y Patogénesis Molecular. Las imágenes obtenidas se procesaron y analizaron usando el programa Image J.

9.22. Ensayos de inmunoprecipitación para identificar proteínas que interactúen con EhTRF-like I

Para identificar a las proteínas que interaccionen con EhTRF-like I se realizaron ensayos de inmunoprecipitación para ello cultivos de las células transfectadas se enfriaron y se cosecharon en un tubo de 50 mL. Posteriormente, se lavaron 2 veces a 4° C centrifugando a 1,500 rpm por 5 min con 30 ml PBS pH 6.8 en frío. Antes de la última

centrifugación (es decir el segundo lavado) se tomó una alícuota para contar las células en una cámara de Neubauer. Después del último lavado se decantó el tubo y escurrió perfectamente. Se adicionó por cada 15×10^6 de amibas 1 ml de Tris-HCl 100 mM-pHMB, el cual contenía inhibidores de proteasas (Complete Protease inhibitors 1X (Roche), PMSF 1mM, y E-64 5 μ M).

Posteriormente, las amibas se lisaron mediante 3 ciclos de congelación y descongelación en hielo seco y agitando por medio de un vórtex. Los lisados se centrifugaron a 20,000 x g a 4°C por 15 min. y se separó el sobrenadante. El sobrenadante se utilizó para la inmunoprecipitación o bien se almacenó a -80°C hasta su posterior uso. Para iniciar el protocolo de inmunoprecipitación, los extractos se clarificaron incubándolos con sepharosa Anti-c-Myc Agarose Affinity Gel (Sigma-Aldrich) durante 1.30 hr a 4° C, y posteriormente se centrifugaron y se obtuvieron los sobrenadantes. Se les adicionó de 40 a 100 μ l de la suspensión 1:1 de anti c-Myc agarose Affinity Gel adicionando E-64 y coctel de inhibidores y se incubaron overnight a 4° C en agitación. Posteriormente, se lavó la resina 4 veces con 1mL de PBS pH 7.4. Después del lavado final, se aspiró el sobrenadante y se dejaron ~10 μ L por encima de las perlas. Se eluyó con 20 a 50 μ L de buffer de muestra 2X SDS. El tubo se tapó y se incubó 5 minutos a 95° C. Se vortexeó y centrifugó durante 5 segundos (spin), enseguida se cargó el sobrenadante en un gel SDS-PAGE.

Para llevar a cabo la inmunoprecipitación utilizando el anticuerpo α -EhTRF-like I se utilizó el kit Sure Beads Magnetic Beads (Bio-Rad) del cual se utilizaron perlas magnéticas acopladas a la proteína A que es la adecuada para el anticuerpo isotipo de conejo IgG y las cuales se lavaron 3 veces con 1 ml de PBS-Tween 20 al 0.1% a pH 7.4 magnetizando y descartando sobrenadante. Posteriormente, se les adicionó 100 μ g del extracto de proteína para llevar a cabo el pre-clarificado por 1 hora a una temperatura de 4°C del cual se obtuvo el sobrenadante que contenía a las proteínas preclarificadas. Por otro lado se incubó de 1-10 μ g de anticuerpo α -EhTRF-like I con las perlas durante 20 minutos a una temperatura de 4°C, se lavaron con PBS-Tween 20 al 0.1% con ayuda del magneto provisto por el kit. El lisado de proteínas (100 μ g) obtenido en el preclarificado se adicionó a las perlas conteniendo el anticuerpo α -EhTRF-like I (10 μ g) y se dejó interaccionar toda la noche a una temperatura de 4°C en agitación. Se realizaron 3 lavados con PBS-Tween

20 con ayuda del magneto para descartar sobrenadante y posteriormente se eluyó con 30 μ l de buffer de muestra para proteínas 2x; las muestras fueron hervidas por 10 min a 70°C y las perlas fueron magnetizadas para descartarlas y el sobrenadante fue transferido a un nuevo vial para así tener únicamente a las proteínas eluidas las cuales fueron analizadas en un gel SDS-PAGE para posteriormente teñirse por la técnica de tinción por plata o bien fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa para inmunodetectarse con el anticuerpo anti α -Laminina B1. Esto se realizó con extractos de proteínas provenientes de trofozoítos wt, o transfectados pKT-3M y pEhTRF-like I ox.

9.23. Tinción de Plata

Para la tinción con plata se utilizó el kit Silver Stain Plus (Bio-Rad) en el cual el gel se incubó por 20 min en solución fijadora y enseguida se dio un lavado de 20 min con agua destilada cambiando el agua al min 10. Posteriormente se decantó el agua y se sometió a la tinción en la solución de teñido por 20 min en agitación suave, la solución está compuesta por 5 ml de solución de plata, 5 ml de solución moderadora de reducción, 5 ml de solución de desarrollo de imagen y 35 ml de agua desionizada. Una vez que se observó el patrón de bandas se adicionó la solución de paro que se es una solución que está al 5% de ácido acético en agua desionizada y se incubó por un tiempo de 15 min para detener la reacción del teñido con plata.

9.24. Búsqueda de proteínas homólogas en otros organismos

Los ortólogos de la proteína EhTRF-like II fueron identificados mediante blastp (protein-protein BLAST) (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE=Proteins>) para ello se utilizó la secuencia completa de la proteína EhTRF-like II obtenida de AmoebaDB (<http://amoebadb.org/amoeba/>). Para seleccionar a los ortólogos se emplearon los siguientes criterios: que estuvieran anotadas como PREDICTED: Telomeric repeat-binding factor 1-like, que tuvieran los scores más altos y estuvieran ya caracterizadas experimentalmente. Las secuencias obtenidas se analizaron y se seleccionaron para realizar alineamientos de los DBD MYB empleando el programa Clustal Omega en la página del EMBL-EBI (<https://www.ebi.ac.uk>) y representados con la herramienta

BoxShade Server (https://www.ch.embnet.org/software/BOX_form.html). En este alineamiento se incluyeron las secuencias de aminoácidos de las TRF1 y TRF2 de *H. Sapiens* con los identificadores XP_016869281 y XP_005256178 en el NCBI respectivamente. También se realizaron alineamientos de las secuencias aminoacídicas completas entre las proteínas TRF1, TRF2 y EhTRF-like II.

9.25. Búsqueda de dominios funcionales y posibles modificaciones post-traduccionales (PTM) en la proteína EhTRF-like I

Inicialmente se analizó el peso molecular y el punto isoeléctrico teóricos de la proteína EhTRF-like I empleando la herramienta de ExPaSy: Compute pI/Mw tool (https://web.expasy.org/compute_pi/) y ProtPi (<https://www.protpi.ch/>). Para buscar y analizar los dominios funcionales presentes en la proteína EhTRF-like I se empleó la herramienta bioinformática Pfam (<http://pfam.xfam.org/>). Además, se buscaron señales de localización nuclear por medio de las herramientas SeqNLS (<http://mleg.cse.sc.edu/seqNLS/>) y cNLS (<http://nls-mapper.iab.keio.ac.jp/c>). La determinación de las modificaciones postraduccionales a las que es susceptible la proteína EhTRF-like I se realizó empleando las herramientas localizadas en la base de datos ExPASy (<https://www.expasy.org/>) y usando el programa ModPred (<http://www.modpred.org/>). Con la información se realizó una minería de datos mediante la búsqueda en la literatura de las modificaciones postraduccionales identificadas y caracterizadas en la proteína TRF1, lo que permitió localizar los aminoácidos conservados entre TRF1 y EhTRF-like I que son blanco de estas modificaciones por parte de diferentes enzimas. Los genes codificantes de las enzimas modificadoras involucradas también se buscaron en el genoma de *E. histolytica* empleando la herramienta de Blastp la base de datos AmoebaDB. A través de la herramienta STRING (<https://string-db.org/>) se buscaron las interacciones proteína-proteína específicas para la proteína EhTRF-like I de *E. histolytica*. Con la secuencia de las proteínas de *E. histolytica* obtenidas en este análisis se realizó una búsqueda mediante blastp restringido a *H. sapiens* para identificar a las proteínas ortólogas y analizar su porcentaje de identidad y la presencia de dominios conservados.

10. RESULTADOS

Objetivo 1. Determinar la expresión y localización subcelular de la proteína EhTRF-like I en trofozoítos de *E. histolytica* en condiciones basales.

10.1. Localización de la proteína EhTRF-like I en las diferentes fracciones celulares.

E. histolytica tiene tres genes que codifican para proteínas EhTRF-like, anteriormente ya se determinó que sus transcritos se expresan en condiciones basales de cultivo, sin embargo hasta ahora solo se ha estudiado a la proteína EhTRF-like III. En este trabajo nos propusimos iniciar la caracterización funcional de la proteína EhTRF-like I (número de acceso EHI_001090). Inicialmente nos planteamos analizar la expresión de la proteína en trofozoítos de la clona A de *E. histolytica* (donada por la Dra. Esther Orozco, Cinvestav-IPN) empleando un anticuerpo policlonal obtenido al inmunizar un conejo con un péptido diferencial (CIEDKCVAAHHIIDQ-KLH) acoplado a KLH el cual fue diseñado mediante el programa ABCpred (<http://www.imtech.res.in/raghava/abcpred/>). Este anticuerpo fue obtenido y purificado a través de cromatografía de afinidad por el Dr. Francisco Javier Rendón Gandarilla (Estancia Post-doctoral en el Posgrado en Ciencias Genómicas). Primeramente, se determinó la dilución adecuada para los ensayos de inmunodetección utilizando extractos totales de trofozoítos de *E. histolytica*, en donde se observó que la dilución 1:2500 era la adecuada para detectar a la proteína EhTRF-like I lo cual corrobora que la proteína se expresa en condiciones basales de cultivo (Figura 20).

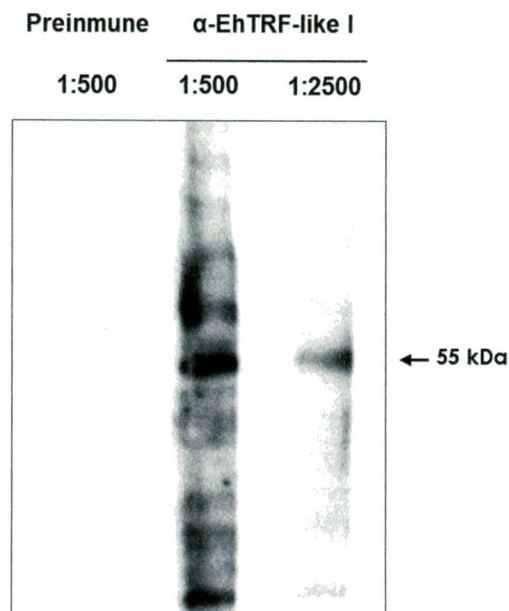


Figura 20. Titulación de anticuerpo α -EhTRF-like I. El anticuerpo α -EhTRF-like I fue probado a una dilución 1:500 y 1:2500 en extractos totales de *E. histolytica* dónde se muestra que a una dilución de 1:2500 hay un mejor reconocimiento de la proteína EhTRF-like I bajo condiciones basales de cultivo. Como control negativo se utilizó suero preimmune a una dilución de 1:500.

Posteriormente, se planteó determinar su localización subcelular y para ello se realizó un fraccionamiento celular (Schreiber et al., 1989) en el cual se obtuvieron una fracción citoplasmática y una fracción nuclear soluble. Para obtener una fracción nuclear insoluble a los núcleos remanentes se les adicionó buffer de RIPA el cual permitió solubilizar las proteínas de membrana nuclear, adicionalmente a esto las muestras también fueron sonicadas para romper la cromatina. En este ensayo también, se incluyó un extracto total de trofozoítos como control positivo y para detectar a la proteína empleamos el α -EhTRF-like I. EhTRF-like I se inmunodetectó en los extractos totales, en las fracciones citoplásmicas, y nucleares de los trofozoítos de *E. histolytica* de la clona A con un peso aproximado de 54-55 kDa. Asimismo, se incluyó como control positivo la proteína recombinante rEhTRF-like I (Obtenida por la Dra. Rosa Elena Cárdenas Guerra, Estancia Posdoctoral) la cual es reconocida por este anticuerpo en el peso predicho de 48 kDa. Es interesante que la proteína inmunodetectada en los extractos de los trofozoítos de la clona A tenga un peso molecular mayor al predicho, en donde se observa una diferencia

de 7 kDa, lo que cual podría explicarse a que esta proteína sufra algunas modificaciones postraduccionales como fosforilaciones, glicosilaciones, ubiquitinaciones o SUMOilaciones en los trozoitos de este parásito. Sin embargo, de manera interesante, en la fracción insoluble se encontró a EhTRF-like I con un peso molecular de 36 kDa (Figura 21B), esta diferencia podría explicarse al hecho de que el pI de la proteína es 5.88, el cual es ácido y proponemos que podría afectar su corrimiento electroforético (Guan, 2015). En este ensayo se incluyeron diferentes anticuerpos para como marcadores de fraccionamiento. Por ejemplo se incluyó el anticuerpo que reconoce a la enzima metiltransferasa EhKMT4 de *E. histolytica*, proteína con actividades nucleares y citoplásmicas (Borbolla, 2016), la cual se encontró en extractos totales, citoplásmicos y nucleares solubles con un peso de 46 kDa en correspondencia con su peso reportado (Figura 21 B). Para tener un control de la fracción nuclear insoluble se utilizó un anticuerpo comercial α -Laminina B1 ya que esta proteína se sitúa en la periferia del nucleoplasma en contacto con la cara interna de la envoltura nuclear y como resultado se detectó una proteína de 46 kDa en las fracciones totales e insolubles (Figura 21B), como se esperaba. Como control de fracción nuclear se utilizó el anticuerpo comercial α -H3K27me3 encontrándose a esta proteína en las fracciones total y nuclear con un peso de 47 kDa. Este peso fue diferente al reportado el cual es de 13 kDa, lo cual podría ser debido a la formación de trímeros o tetrámeros (Figura 21B), sin embargo se encontró en la fracción nuclear soluble. También se incluyó el anticuerpo α -H4K20me3, ya que esta modificación de la H4 es específica de heterocromatina relacionada con regiones teloméricas. Esta proteína se detectó en la fracción nuclear y en los extractos totales en un peso molecular de 48 kDa, también diferente al reportado lo cual podría ser también debido a la formación de trímeros o tetrámeros. En estos fraccionamientos celulares también se utilizó un anticuerpo α -actina como control de carga, sin embargo se observó una menor detección en los fraccionamientos nuclear y nuclear insoluble, esto podría explicarse debido al estado de polimerización de la actina (monomérica o polimerizada) dentro del núcleo, lo que dependiendo del anticuerpo utilizado puede hacerlas menos detectables en estas fracciones a pesar de tener la misma cantidad de proteína como se muestra en el gel teñido con azul de coomasie de las fracciones obtenidas (Figura 21 A).

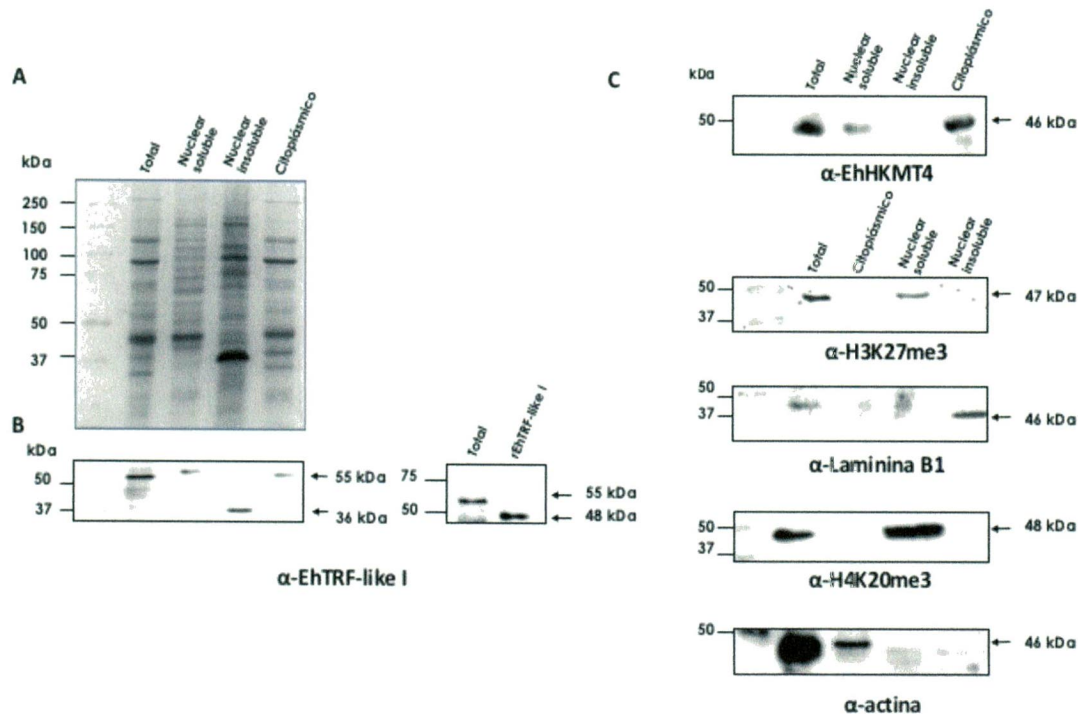


Figura 21. Detección de la proteína EhTRF-like I de *E. histolytica* en las diferentes fracciones celulares. A) Gel teñido con azul de Coomassie de las diferentes fracciones obtenidas. B) Inmunodetección en las diferentes fracciones proteicas empleando el anticuerpo α -EhTRF-like I. Se usó como control positivo a la proteína rEhTRF-like I purificada. C) Inmunodetección empleando los anticuerpos α -EhKMT4, como marcador de fracción nuclear y citoplásmica; α -H3K27me3, como marcador de la fracción nuclear soluble; α -H4K20me3, marca telomérica; α -Laminina B1 como marcador nuclear de la fracción insoluble y α -actina como control de carga.

Ya que se encontraron diferencias en el peso molecular de la proteína EhTRF-like I predicho y el detectado y para determinar si las diferencias encontradas estaban relacionadas con modificaciones post-traduccionales (PTM), se realizó un análisis de las posibles PTM de la proteína empleando los programas ModPred, NetPhos 3.1, GPS-SUMO los cuales arrojaron distintos sitios de modificaciones postraduccionales, además se empleó el programa cNLS para determinar el sitio de localización nuclear en esta proteína. Las PTM predichas se resumen en la Tabla 12. En donde se observa que la proteína EhTRF-like I es capaz de fosforilarse en sus diferentes residuos de S y T; así como SUMOilarse en al menos 7 residuos de K; ubiquitinarse también en 9 residuos de K; ADP-Ribosilarse en 7 residuos de E y R y finalmente se encontraron al menos 65 sitios de rompimiento proteolítico (las cuales no se incluyeron en la tabla). También se corroboraron las posibles señales de localización nuclear (NLS).

Tabla 12. PTMs predichas en la proteína EhTRF-like I.

MODIFICACIÓN	AMINOÁCIDO	SCORE	ENZIMAS INVOLUCRADAS	SECUENCIA	HERRAMIENTA BIOINFORMÁTICA
Fosforilación	S14	0.957	unsp	QRIVSQEPL	NetPhos 3.1
	T43	0.851	PKC	TDLETLCRK	
	Y75	0.846	unsp	IQNEYINPD	
	T90	0.836	PKC	KKKRTLKYA	
	S152	0.903	PKC	YQYVSKKVQ	
	T179	0.883	PKC	PYLKTSRSC	
	S180	0.973	unsp	YLKTSRSCS	
	S182	0.966	unsp	KTSRSCSEE	
	S184	0.997	unsp	SRSCSEEA	
	S192	0.922	unsp	IDILSETEI	
	S272	0.743	unsp	IDDLSLTNK	
	T274	0.874	PKC	DLSLTNKVN	
	T308	0.993	unsp	KRRFTEEET	
	S340	0.982	unsp	FDDRSCVDL	
	S363	0.982	unsp	NKQKSNEPT	
S382	0.882	unsp	NTLPSVGNA		
Sumoilación	K29	0.76	ND	ND	ModPred
	K127	0.65	ND	ND	
	K132	0.56	ND	ND	
	K258	0.72	ND	ND	
	K302	0.52	ND	ND	
	K303	0.75	ND	ND	
	K304	0.58	ND	ND	
Ubiquitinación	K29	0.5	ND	ND	ModPred
	K127	0.52	ND	ND	
	K132	0.63	ND	ND	
	K235	0.54	ND	ND	
	K258	0.52	ND	ND	
	K267	0.63	ND	ND	
	K347	0.5	ND	ND	
	K377	0.61	ND	ND	
	K398	0.65	ND	ND	
ADP-ribosylación	E27	0.64	ND	ND	ModPred
	R89	0.60	ND	ND	
	R305	0.80	ND	ND	

	R339	0.53	ND	ND	
	R349	0.50	ND	ND	
	R355	0.68	ND	ND	
	E376	0.60	ND	ND	
NLS	K300	0.7	ND	IKKKKRRFTEE	cNLS
	K301	0.8	ND	KKKKRRFTEE	

Determinados mediante NetPhos 3.1 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/>), GPS-SUMO (<http://sumosp.biocuckoo.org>), cNLS Mapper (http://nls-mapper.iab.keio.ac.jp/cgi-bin/NLS_Mapper_form.cgi), ModPred: predictor of post-translational modification sites in proteins (<http://montana.informatics.indiana.edu/ModPred/index.html>) con valores de score Bajo: 0.5-0.69; Medio: 0.7-0.85 y Alto: 0.88-0.99 ND: no determinado.

Una vez que se obtuvieron los residuos susceptibles de modificación se realizó un alineamiento entre la proteína TRF1 y EhTRF-like I de *E. histolytica* para analizar la presencia de los residuos susceptibles de modificación por PTM conservados entre las proteínas (Figura 22). En los que se identificaron 4 sitios de fosforilación en S o T los cuales son fosforilados por las cinasas ATM (S219), Cdk1 (T344) y Plk1 (S435) proteína y que están conservados en la proteína de amiba. De manera muy interesante los sitios de SUMOilación en los residuos de K302 y K304 son de los más conservados y corresponden a la señal de localización nuclear. En esa misma región existe conservada la R342 y 343 las cuales son susceptibles de ribosilarse. Finalmente, se identificaron diversos sitios de cortes proteolíticos en la proteína EHTRF-like I sin embargo el que se encuentra conservado entre ambas proteínas es el E352. Con base en los sitios encontrados en las predicciones se realizó un esquema de la proteína mostrando los sitios más conservados y que por tanto pueden ser más probables de ser modificados (Figura 23).

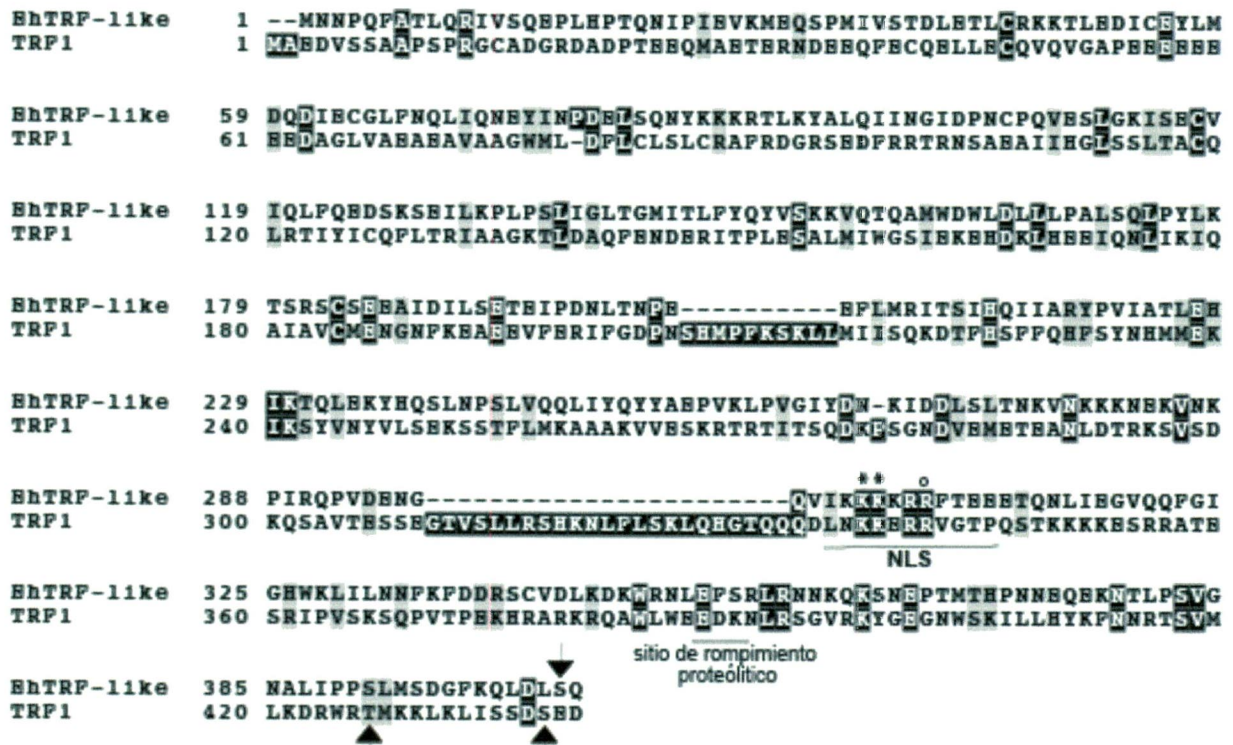


Figura 22. PTM conservadas en la proteína EhTRF-like I. Alineamiento de las secuencias de aminoácidos de las proteínas TRF1 (P54274) y EhTRF-like I donde se muestran los residuos susceptibles de modificación predichos y conservados. * SUMOilación, ° ADP-Ribosilación, ↑Fosforilaciones.

Posteriormente, para conocer si el genoma de *E. histolytica* posee los genes que codifican para las enzimas que involucradas en estas modificaciones postraduccionales reportadas ya para TRF1 y que posiblemente se encuentren llevando a cabo la misma función en este parásito, se realizó una búsqueda mediante blastp en la base de datos de Amoeba DB empleando como sondas la secuencia de aminoácidos de las proteínas de *H. sapiens*. Este análisis mostró que *E. histolytica* los genes que codifican para enzimas homólogas las cuales tienen una identidad mayor al 24% con respecto a las de humano (Tabla 13).

Tabla 13. PTMs predichas en EhTRF-like I y genes que codifican para enzimas modificadoras presentes en el genoma de *E. histolytica*

Modificación	aa TRF1	aa EhTRF-like I	Enzima modificadora <i>H. sapiens</i>	Función	Enzima modificadora <i>E. histolytica</i>	Identidad %	Valor E
Fosforilación	T122	No encont.	CK2	La inhibición de CK2 afecta la unión de TRF1 a DNA telomérico y su estabilidad.	CK2 EHI_006800	58	5E ⁻¹³⁸
	T149	T141, T145	CDK	Es requerida para la interacción de TRF1 con PIN1	CDK EHI_065280	5	7E ⁻¹⁰¹
	S219	S222	ATM	Implicado en la respuesta de daño al DNA	Cinasa EHI_017670		6E ⁻⁸⁶
	T273	T274	AKT	Sobreexpresión de AKT incrementa niveles de TRF1 y promueve acortamiento del telómero	ND	39	5E ⁻¹¹¹
	S367	S363	ATM	Su fosforilación inhibe la unión de TRF1 a DNA telomérico y marca TRF1 a centros del proteosoma nuclear	Cinasa EHI_017670	30	6E ⁻⁸⁶
SUMOilación	K337, K338, K349-K352	K337, K351-K354	MMS21	Su depleción promueve acortamiento telomérico, resultando en inducción de senescencia celular en células ALT	EHI_068180	28	1E ⁻¹¹
Parsilación	ND	ND	Tankirasa 1 y 2	Poly ADP ribosilación de TRF1 por tankirasa 1 remueve TRF1 de telómeros llevando a incrementar el acceso de la telomerasa a los extremos de los telómeros.	EHI_004990	24	2E ⁻²²

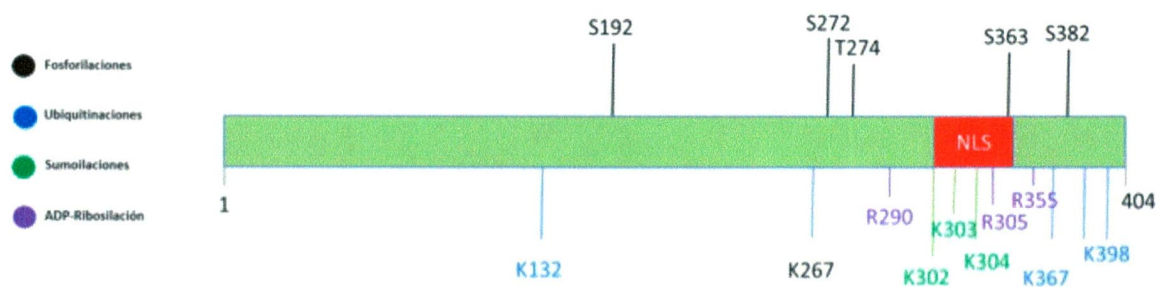


Figura 23. Esquema de las posibles PTM de la proteína EhTRF-like I. En negro se muestran los posibles sitios de fosforilaciones conservados en los residuos de serina (S) y treonina (T); en azul las ubiquitinaciones, en verde las SUMOilaciones en los residuos de lisina (K), en morado las ADP-Ribosilaciones en residuos de arginina (R) y en rojo la señal de localización nuclear. Se emplearon los programas NetPhos 3.1, ModPred y cNLS para predecir las PTM.

10.2. Localización de la proteína EhTRF-like I por inmunofluorescencia

Ya que las proteínas TRF tienen funciones localizadas en el núcleo y se ha reportado su presencia cercana a la membrana nuclear en los sitios RAB, y con la idea de investigar la localización subcelular de la proteína EhTRF-like I en trofozoítos de la clona A se realizaron ensayos de Inmunofluorescencia utilizando el anticuerpo α -EhTRF-like I. En este ensayo también se incluyó el suero preinmune como control negativo, y se empleó un anticuerpo secundario acoplado a fluoresceína (FITC). Como puede observarse en la Figura 24 la proteína EhTRF-like I se localiza en la periferia nuclear de los trofozoítos, esto se observó en varios campos analizados, así mismo también se detectó en vesículas que se encuentran dispersas en el citoplasma. En el caso del suero preinmune no se observó ninguna señal de fluorescencia en las condiciones empleadas lo cual corrobora la especificidad del anticuerpo generado (Figura 24).

En resumen las microscopías de inmunofluorescencia mostraron que EhTRF-like I se localiza en el núcleo específicamente en la periferia nuclear sin embargo presenta una abundante tinción citoplásmica en algunas vesículas en condiciones basales de cultivo. Estos resultados correlacionan con los ensayos de western blot donde se detectó a la proteína en extractos totales, en la fracción nuclear y en la fracción citoplásmica.

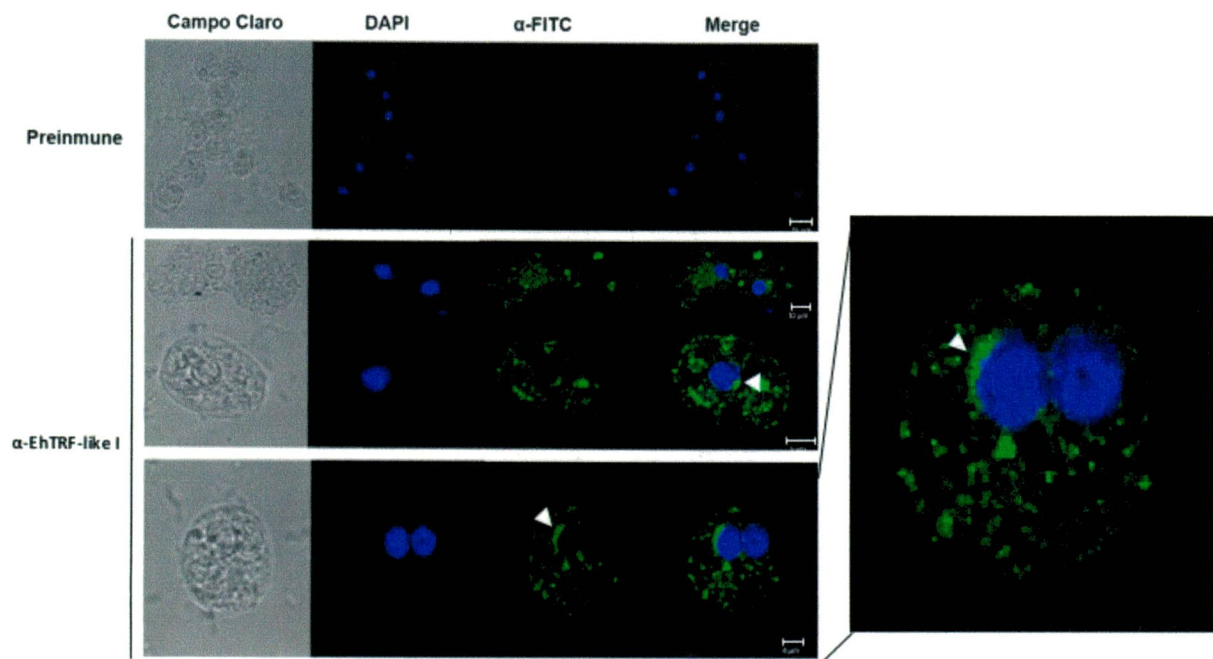


Figura 24. Localización de la proteína EhTRF-like I. Trofozoítos de *E. histolytica* se incubaron con anticuerpos α -EhTRF-like I y como anticuerpo secundario un anti conejo acoplado a FITC. Los núcleos se tiñeron con DAPI y las preparaciones se analizaron por microscopía confocal. Las flechas indican la localización perinuclear de la proteína.

10.3. Localización de las proteínas Laminina B1, H4K20me3 y EhTRF-like III en trofozoítos de *E. histolytica*

Una vez detectada la proteína EhTRF-like I se prosiguió a realizar la estandarización de las condiciones para co-localizar a EhTRF-like I con el marcador de periferia nuclear Laminina B1, con el marcador de heterocromatina condensada en regiones teloméricas H4K20me3 y con EhTRF-like III, proteína de la misma familia la cual se ha propuesto como parte de la maquinaria telomérica. Para ello se realizaron ensayos de inmunofluorescencia en trofozoítos de la clona A utilizando los anticuerpos comerciales α -Laminina B1, α -H4K20me3 y el anticuerpo anteriormente generado y utilizado en nuestro grupo de trabajo α -EhTRF-like III. Todos los anticuerpos probados mostraron la señal de fluorescencia en el núcleo y enriquecidas en la periferia nuclear como se muestra en la Figura 25 y como anteriormente ya se había reportado para Laminina B1, H4K20me3 (Borbolla, 2016) y EhTRF-like III (Tesis Vanessa Díaz, 2018). Las condiciones de detección por inmunofluorescencia así estandarizadas se emplearon

para la realización de los ensayos de colocalización de las proteínas EhTRF-like I y las proteínas EhTRF-like III, Laminina B1 y H4K20me3.

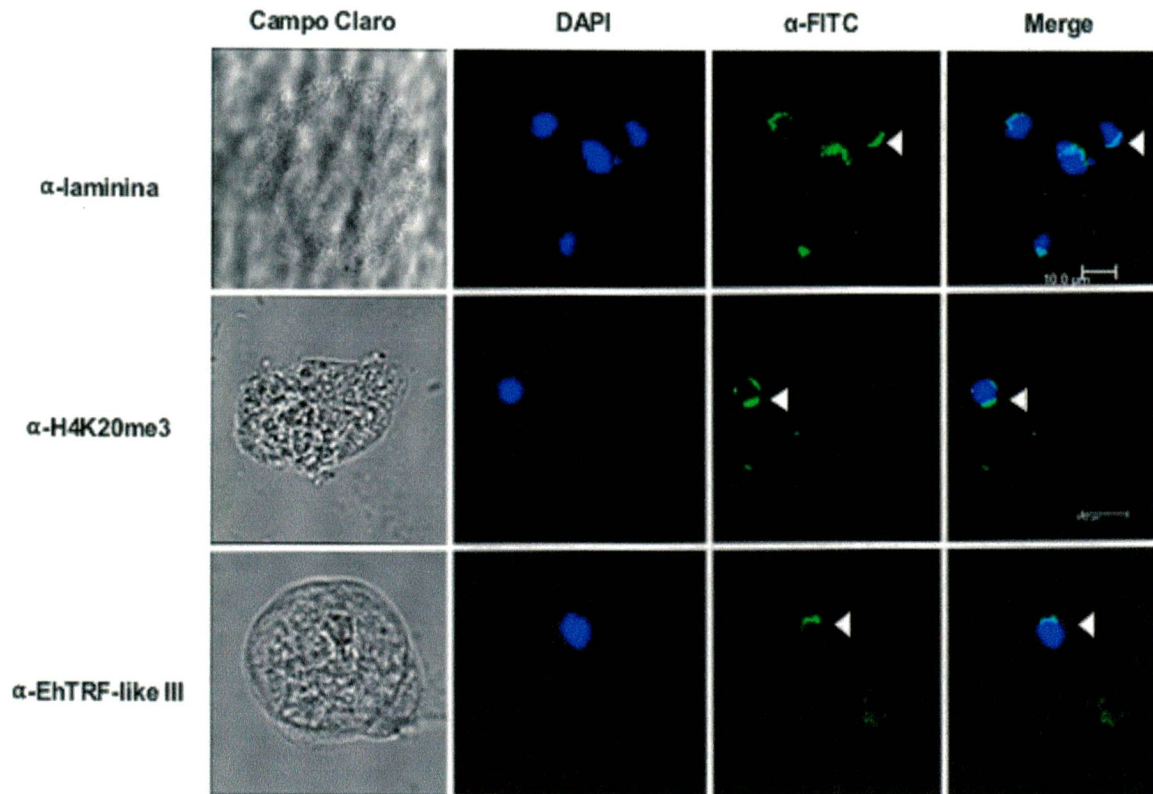


Figura 25. Localización de las proteínas Laminina B1, H4K20me3 y EhTRF-like III en trofozoítos de *E. histolytica*. Los Trofozoítos se incubaron con anticuerpos α -Laminina B1, α -H4K20me3 y α -EhTRF-like III. Como anticuerpo secundario se usó un anticuerpo conjugado a FITC. Los núcleos se tiñeron con DAPI y se analizaron mediante microscopías de inmunofluorescencia. Las flechas indican la localización de las proteínas en el núcleo.

Objetivo 2. Determinar la co-localización de EhTRF-like I con Laminina B1 y proteínas relacionadas con la función telomérica

Nuestros resultados mostraron que la proteína EhTRF-like I se expresa abundantemente en los trofozoítos de *E. histolytica* en condiciones basales de cultivo, sin embargo las microscopías de inmunofluorescencia muestra una tinción periférica tenue, por lo que decidimos emplear una estrategia de sobreexpresión de la proteína para enriquecer a la proteína. La sobreexpresión de proteínas en este parásito ha sido una estrategia ampliamente utilizada para caracterizar funcionalmente a proteínas nucleares como factores de transcripción. En este caso empleamos el plásmido pKT-3M ya que es un plásmido que se ha utilizado anteriormente para sobreexpresar proteínas nucleares fusionadas a una etiqueta de *myc* lo cual es de gran utilidad para detectar a las proteínas heterólogas en este parásito y fue de utilidad en este estudio para enriquecer a la proteína EhTRF-like I en *E. histolytica*.

10.4. Clonación del gen *ehtrf-like I* en el plásmido pKT-3M

En el laboratorio ya se contaba con las construcciones pBackbone-EhTRF-like I y p2.1 TOPO-EhTRF-like I las cuales tenían el gen de interés clonado, por lo que a partir de este material se realizó una restricción con las enzimas *SmaI* y *XhoI* para liberar el inserto. Los productos de restricción se corrieron en un gel de agarosa en donde se observó la liberación del fragmento de 1212 pb que corresponde al tamaño esperado del gen *ehtrf-like I* (Figura 26A). A partir de este análisis, se seleccionó el vector pBackbone EhTRF-like I para realizar la subclonación del gen, por lo que se purificaron los plásmidos pBackbone EhTRF-like I (del cual se obtuvo el inserto) y el pKT-3M (en el cual se sobreexpresará al gen *ehtrf-like I*) para tener una concentración adecuada e iniciar el proceso de subclonación. Una vez purificados se verificó la integridad de los plásmidos obtenidos en un gel de agarosa (Figura 26B).

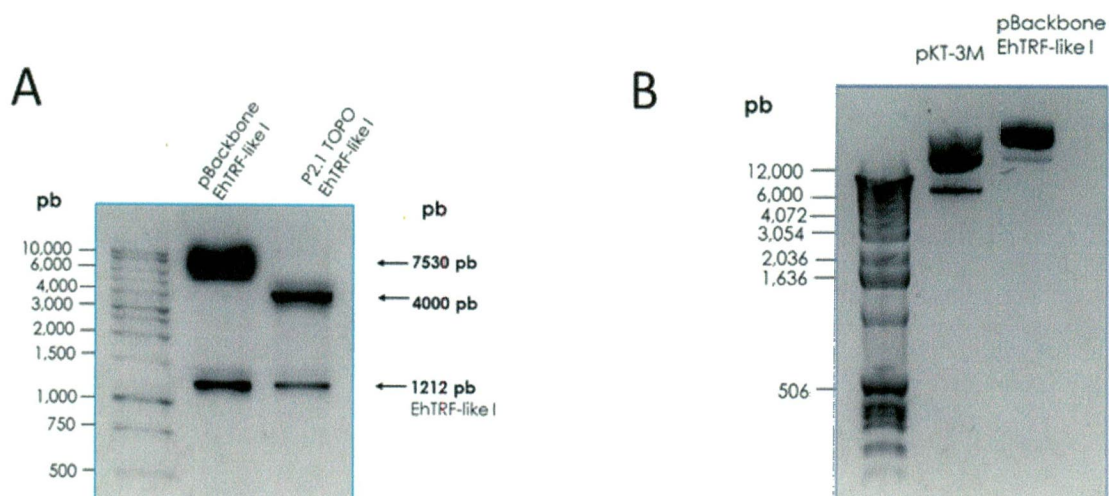


Fig. 26. Selección y purificación de los plásmidos para subclonar el gen *ehtrf-like I*. A) Restricción y liberación del gen *ehtrf-like I* en los plásmidos pBackbone-EhTRF-like I y p2.1TOPO-EhTRF-like I. B) Integridad de plásmidos pKT-3M y pBackbone EhTRF-like I.

Para proceder con el proceso de ligación del gen *ehtrf-like I* en el plásmido pKT-3M; los plásmidos pKT-3M y pBackbone EhTRF-like I se restringieron utilizando las enzimas *SmaI* y *XhoI* y los productos de estas restricciones se visualizaron en un gel de agarosa en los cuales se obtuvieron los fragmentos linearizados en el tamaño esperado (Figura 27 A y B). El volumen restante de cada reacción de restricción se corrió en un gel preparativo de agarosa para su purificación después de la doble restricción. Los productos purificados se analizaron en un gel de agarosa en donde se observaron en el tamaño esperado (Figura 27C).

Posteriormente, con el inserto y vector ya digeridos y purificados se realizó una reacción de ligación en una relación inserto vector 3:1 y se llevó a cabo la transformación en células de *E. coli* DH5 α . Se purificó el DNA plasmídico de las clonas candidatas obtenidas y los plásmidos purificados se sometieron a una restricción utilizando las enzimas *SmaI* y *XhoI* para determinar que clonas integraron el inserto, lográndose obtener dos clonas positivas como se muestra Figura 27 D, las cuales corresponden a la construcción plasmídica la cual se denominó pEhTRF-like I ox.

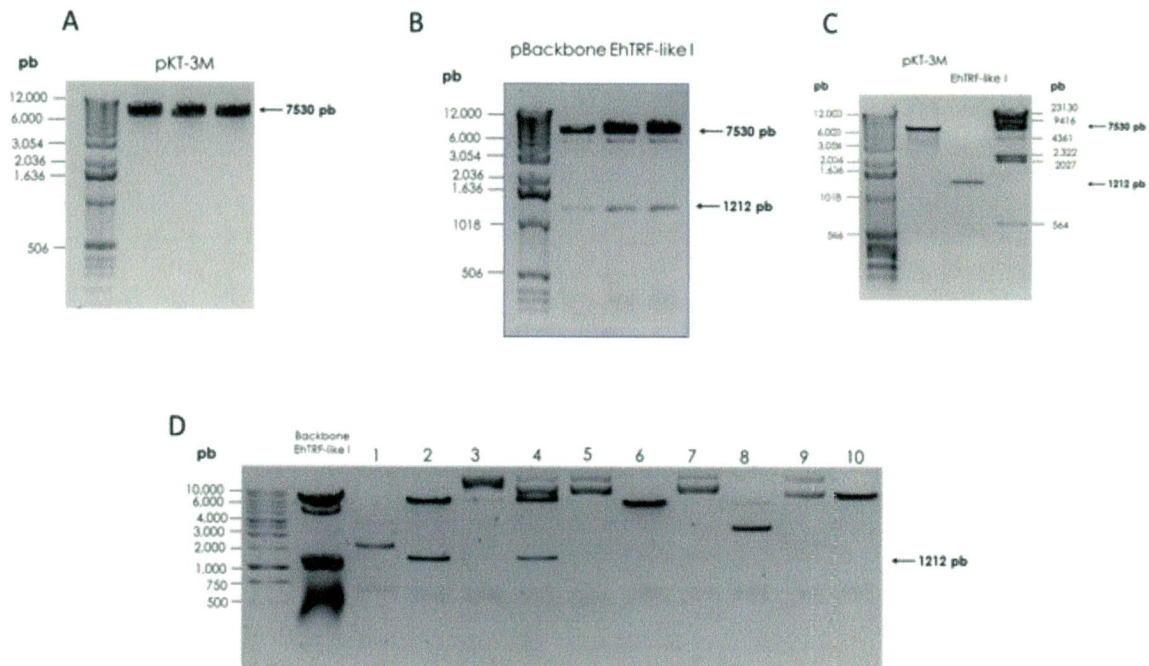


Figura 27. Subclonación del gen *ehtrf-like I* en el plásmido pKT-3M. A) y B) Restricción de los plásmidos pKT-3M y pBackbone EhTRF-like I con las enzimas *SmaI* y *XhoI* para su posterior extracción y purificación del plásmido. C) Plásmido pKT-3M linearizado y el fragmento que corresponde al gen *ehtrf-like I* purificados y digeridos para ligarse. D) Digestión con las enzimas *SmaI* y *XhoI* de las clonas obtenidas durante el proceso de ligación de las cuales dos liberaron al gen *ehtrf-like I*.

10.5. Secuenciación de la construcción pEhTRF-like lox

Para corroborar que el gen clonado no contuviera mutaciones en su secuencia, las clonas positivas se secuenciaron y con la secuencia obtenida se realizó un análisis mediante la herramienta BLASTn (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) la cual mostró una identidad con la secuencia del gen *ehtrf-like I* mayor al 90%. También se realizó un alineamiento de la secuencia nucleótidos obtenida y la secuencia de la base de datos Amoebadb empleando el programa MUSCLE y el alineamiento fue sombreado utilizando

la herramienta BOXSHADE el cual nos permite identificar cambios en la secuencia (Figura 28).

```

EHI_001090seq 1 -----CCCTTTCAACGTAATTGTTAGTCAGAGCCATTACATCCA
EHI_001090BD 1 ATGAATAACCCTCAGTTGCAACCCTTCACGAATTGTTAGTCAGAGCCATTACATCCA

EHI_001090seq 40 ACACAAAATATACCAATTGAAGTAAAAATGGAACAAAGTCCTATGATTGTATCAACTGAT
EHI_001090BD 61 ACACAAAATATACCAATTGAAGTAAAAATGGAACAAAGTCCTATGATTGTATCAACTGAT

EHI_001090seq 100 TTAGAAACGTTGTGTAGAAAAAAACATTAGAAGATATATGTCAATATTTAATGGATCAA
EHI_001090BD 121 TTAGAAACGTTGTGTAGAAAAAAACATTAGAAGATATATGTCAATATTTAATGGATCAA

EHI_001090seq 160 GACATAGAGTGTGGATTATTTAATCAATTAATTCAAAATGAATATATTAATCCAGATGAA
EHI_001090BD 181 GACATAGAGTGTGGATTATTTAATCAATTAATTCAAAATGAATATATTAATCCAGATGAA

EHI_001090seq 220 TTATCACAAAATTATAAAAAGAAAAGAACATTAAAAATGCATTACAATAATAAATGGA
EHI_001090BD 241 TTATCACAAAATTATAAAAAGAAAAGAACATTAAAAATGCATTACAATAATAAATGGA

EHI_001090seq 280 ATTGACCCAAATTGTCCACAAGTAGAATCATTAGGAAAAATAICAGAATGTGTTATTCAA
EHI_001090BD 301 ATTGACCCAAATTGTCCACAAGTAGAATCATTAGGAAAAATAICAGAATGTGTTATTCAA

EHI_001090seq 340 CTTTTTCAAGAAGACTCAAAAAGTGAATATTTAAAACCATTCCTTCATTAATTGGACTC
EHI_001090BD 361 CTTTTTCAAGAAGACTCAAAAAGTGAATATTTAAAACCATTCCTTCATTAATTGGACTC

EHI_001090seq 400 ACTGGAATGATTACTTTGTTTTATCAATACGTTTCTAAAAAAGTTCAAAACCAAGCAATG
EHI_001090BD 421 ACTGGAATGATTACTTTGTTTTATCAATACGTTTCTAAAAAAGTTCAAAACCAAGCAATG

EHI_001090seq 460 TGGGATTGGCTTGATTTATTACTTCCTGCATTATCACAACCTCCTTATTTAAAAACAAGT
EHI_001090BD 481 TGGGATTGGCTTGATTTATTACTTCCTGCATTATCACAACCTCCTTATTTAAAAACAAGT

EHI_001090seq 520 CGTTCCTGTAGTGAAGAAGCAATTGACATTTTATCAGAAACTGAAATACCAGATAATTTA
EHI_001090BD 541 CGTTCCTGTAGTGAAGAAGCAATTGACATTTTATCAGAAACTGAAATACCAGATAATTTA

EHI_001090seq 580 ACTAATCCTGAAGAATTTCTTATGAGAATTACTTCTATTCATCAAATTTATTGCAAGATAT
EHI_001090BD 601 ACTAATCCTGAAGAATTTCTTATGAGAATTACTTCTATTCATCAAATTTATTGCAAGATAT

EHI_001090seq 640 CCAGTGATTGCAACACTGGAACATATTTAAAACCAATTAGAAAAGTATCATCAATCATT
EHI_001090BD 661 CCAGTGATTGCAACACTGGAACATATTTAAAACCAATTAGAAAAGTATCATCAATCATT

EHI_001090seq 700 AATCCAAGTTTAGTTCAACAATTAATTTATCAGTATTATGCAGAACCTGTTAAATTACCT
EHI_001090BD 721 AATCCAAGTTTAGTTCAACAATTAATTTATCAGTATTATGCAGAACCTGTTAAATTACCT

EHI_001090seq 760 GTTGAATATATGATAATAAAATAGATGATTTGTCTTAACTAATAAAAGTTAATAAAAAG
EHI_001090BD 781 GTTGAATATATGATAATAAAATAGATGATTTGTCTTAACTAATAAAAGTTAATAAAAAG

EHI_001090seq 820 AAAAATGAAAAGTTAATAAACCAATACGTCAACCTGTGATGAAAATGGTCAAGTTATT

```

BIBLIOTECA UACM

```

EHI_001090BD 841 AAAAAATGAAAAAGTTAATAAACCAATACGTCAACCTGTTGATGAAAAATGGTCAAGTTATT
EHI_001090seq 880 AAAAAAAGAAAAGAGGATTCACTGAAGAAGAACTCAAAA'TTAATAGAGGTGTTCAA
EHI_001090BD 901 AAAAAAAGAAAAGAGGATTCACTGAAGAAGAACTCAAAA'TTAATAGAGGTGTTCAA
EHI_001090seq 940 CAATTTGGTATTGGTCATTGGAAATTAATTTTAAATAATTTTAAATTCGATGATAGAAGT
EHI_001090BD 961 CAATTTGGTATTGGTCATTGGAAATTAATTTTAAATAATTTTAAATTCGATGATAGAAGT
EHI_001090seq 1000 TGTGTTGATTTAAAAGATAAATGGAGAAATCTTGAATTCTCTAGACTTAGAAATAATAAA
EHI_001090BD 1021 TGTGTTGATTTAAAAGATAAATGGAGAAATCTTGAATTCTCTAGACTTAGAAATAATAAA
EHI_001090seq 1060 CAAAAATCAAATGAACCATCTATGACTCATCCTAATAATGAACAAGAAAAAATACTCTC
EHI_001090BD 1081 CAAAAATCAAATGAACCAACTATGACTCATCCTAATAATGAACAAGAAAAAATACTCTC
EHI_001090seq 1120 CCATCTGTTGGAAACGCTTTGATCCTCCAAGTTTAAATTTTGGAG-----
EHI_001090BD 1141 CCATCTGTTGGAAACGCTTTGATCCTCCAAGTTTAAATGTCTGATGGATTAAACAATTG
EHI_001090seq -----
XM_644786.1 1201 GATCTTTCTCAATAA

```

Figura 28. Alineamiento de la secuencia del gen *ehtrf-like 1* de la clona obtenida de la construcción pEhTRF-like I ox y la secuencia de la base de datos AmoebaDB (número de acceso EHI_001090) empleando el programa MUSCLE (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/muscle/>).

En la secuencia del gen *ehtrf-like 1* se identificaron 2 mutaciones, las cuales al realizar la traducción *in silico* introducen un cambio en la R306G y T367S. La primera mutación es una sustitución de arginina con carga positiva por una glicina que es polar sin carga y la segunda es una treonina por serina las cuales se consideraron conservadas ya que presentan la misma propiedad polar sin carga. Ya que estas mutaciones no se encontraron en el dominio de unión a DNA o en algún residuo importante para la función de la proteína se consideró continuar el trabajo con esta construcción (Figura 29).

```

EHI_001090BD      1  LQRIVSQSEPLHPTQNIPIEVKMEQSPMIVSTDLETLCRKKTLLEDICEY LMDQDIECGLFN
EHI_001090seq    1  FORNC*SEPLHPTQNIPIEVKMEQSPMIVSTDLETLCRKKTLLEDICEY LMDQDIECGLFN

EHI_001090BD     61  QLIQNEYINPDELSQNYKKKRTLKYALQIINGIDPNCQVESLGKISECVIQLFQEDSKS
EHI_001090seq    60  QLIQNEYINPDELSQNYKKKRTLKYALQIINGIDPNCQVESLGKISECVIQLFQEDSKS

EHI_001090BD     121 EILKPLPSLIIGLTGMITLFYQYVSKKVQTQAMWDWLDLLLPALSQLPYLKTSRSCSEEA
EHI_001090seq    120 EILKPLPSLIIGLTGMITLFYQYVSKKVQTQAMWDWLDLLLPALSQLPYLKTSRSCSEEA

EHI_001090BD     181 DILSETEIPDNLTNPEEFLMRITSIHQIIARYPVIAATLEHIKTQLEKYHQSLNPSLVQQL
EHI_001090seq    180 DILSETEIPDNLTNPEEFLMRITSIHQIIARYPVIAATLEHIKTQLEKYHQSLNPSLVQQL

EHI_001090BD     241 IYQYYAEPVKLPVGIYDNKIDDLSLTNKVNKKKNEKVNKPIRQPVDENGQVIKKKKRFT
EHI_001090seq    240 IYQYYAEPVKLPVGIYDNKIDDLSLTNKVNKKKNEKVNKPIRQPVDENGQVIKKKKRFT

                                MYB DBD
EHI_001090BD     301 EEETQNLIEGVQQFGIGHWKLILLNNEKFDDRSVDLKDKWRNLEFSRLRNNKQKSNEPTM
EHI_001090seq    300 EEETQNLIEGVQQFGIGHWKLILLNNEKFDDRSVDLKDKWRNLEFSRLRNNKQKSNEPSM

                                Telobox

EHI_001090BD     361 THPNNEQEKNTLPSVGNALI
EHI_001090seq    360 THPNNEQEKNTLPSVGNALI

```

Figura 29. Alineamiento de las secuencias de aminoácidos de la proteína codificada por el gen *ehtrf-like I* clonado y la secuencia de aminoácidos obtenida de la base de datos AmoebaDB de la proteína EhTRF-like I empleando el programa MUSCLE (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/muscle/>).

Una vez corroborada la presencia del inserto y la secuencia, se realizó una purificación de los plásmidos pKT-3M y pEhTRF-like I ox con la calidad necesaria para la transfección. Los plásmidos purificados se corrieron en un gel de agarosa en el cual se visualizó su integridad y se corroboró su cuantificación al observar cantidades similares de ambos plásmidos (Figura 30 A). Finalmente, se hizo una restricción para verificar que el plásmido que se empleó en la transfección tuviera incorporado el gen observándose la liberación del inserto de acuerdo al amaño esperado del gen *ehtrf-like I* de 1212 pb (Figura 30 B).

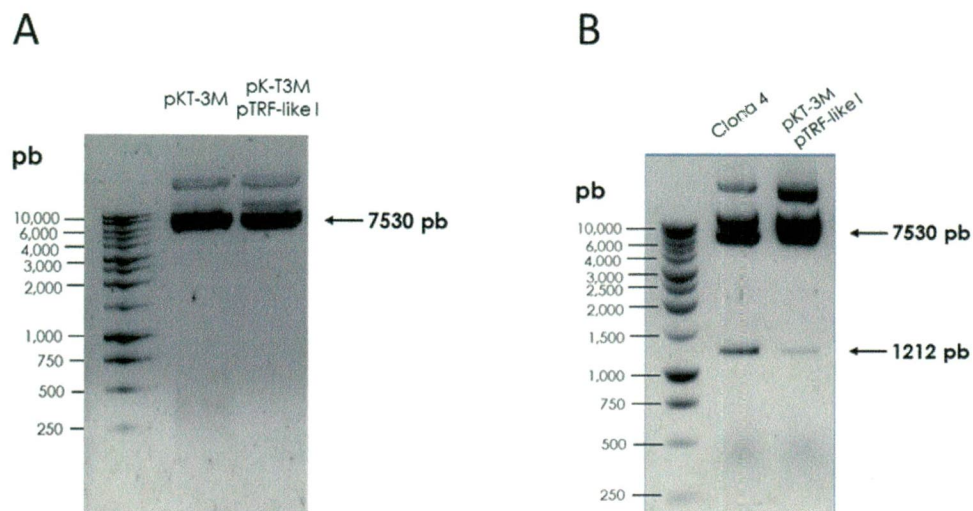


Figura 30. Plásmidos pKT-3M y pEhTRF-like I ox purificados para transfección. A) Integridad de plásmidos pKT-3M y pEhTRF-like I ox. B) Restricción del plásmido pEhTRF-like I ox con las enzimas *SmaI* y *XhoI*, también se incluyó el plásmido de la clona 4 como control positivo.

Estos plásmidos fueron utilizados para ser transfectados en trofozoítos de *E. histolytica*, los cuales se seleccionaron mediante concentraciones crecientes del antibiótico G418, el cual es un análogo de la neomicina y se obtuvieron clonas transfectadas resistentes en las concentraciones de 5 μ g, 10 μ g y 20 μ g de antibiótico para ambos plásmidos. Estas clonas se mantuvieron en el laboratorio y se crecieron para posteriormente obtener RNA, proteínas totales y fraccionamiento citoplasma/núcleo y para los ensayos de inmunofluorescencia.

10.6. Análisis de la sobreexpresión del gen *ehtrf-like I*

Una vez que se tenían a los trofozoítos de *E. histolytica* en crecimiento resistentes en las tres condiciones de antibiótico 5 10 y 20 μ g se prosiguió a determinar la sobreexpresión del gen *ehtrf-like I* a nivel de RNA mensajero mediante la técnica qRT-PCR en cada una de estas tres condiciones. Para ello primeramente se revisó la integridad del RNA obtenido en un gel de agarosa en donde se visualizaron las bandas que corresponden a los transcritos de los genes RNA ribosomales 18s y 28s, lo cual corroboró su integridad (Figura 31A). El RNA se usó como molde para realizar las reacciones de retrotranscripción y así obtener el cDNA para posteriormente realizar las reacciones de qPCR utilizando oligonucleótidos que amplifican un fragmento interno de 95 pb del gen

ehtrf-like 1. Para determinar la sobreexpresión se utilizó SYBR® Green Real-Time PCR Master Mixes y se realizó una cuantificación relativa en la cual se empleó al *rib40s* como gen de referencia. El método empleado para determinar cambios en la expresión fue mediante 2 delta-delta Ct de acuerdo al manual de Applied Biosystems™ Relative Quantitation Analysis Module. Los resultados obtenidos mostraron que el gen *ehtrf-like 1* se sobreexpresó 1.5, 2.14 y 10.2 veces en las células transfectadas con el plásmido pEhTRF-like I ox en las condiciones de 5µg, 10 µg y 20 µg de antibiótico G-418 respectivamente con respecto al control del plásmido vacío pKT-3M (Figura 31B).

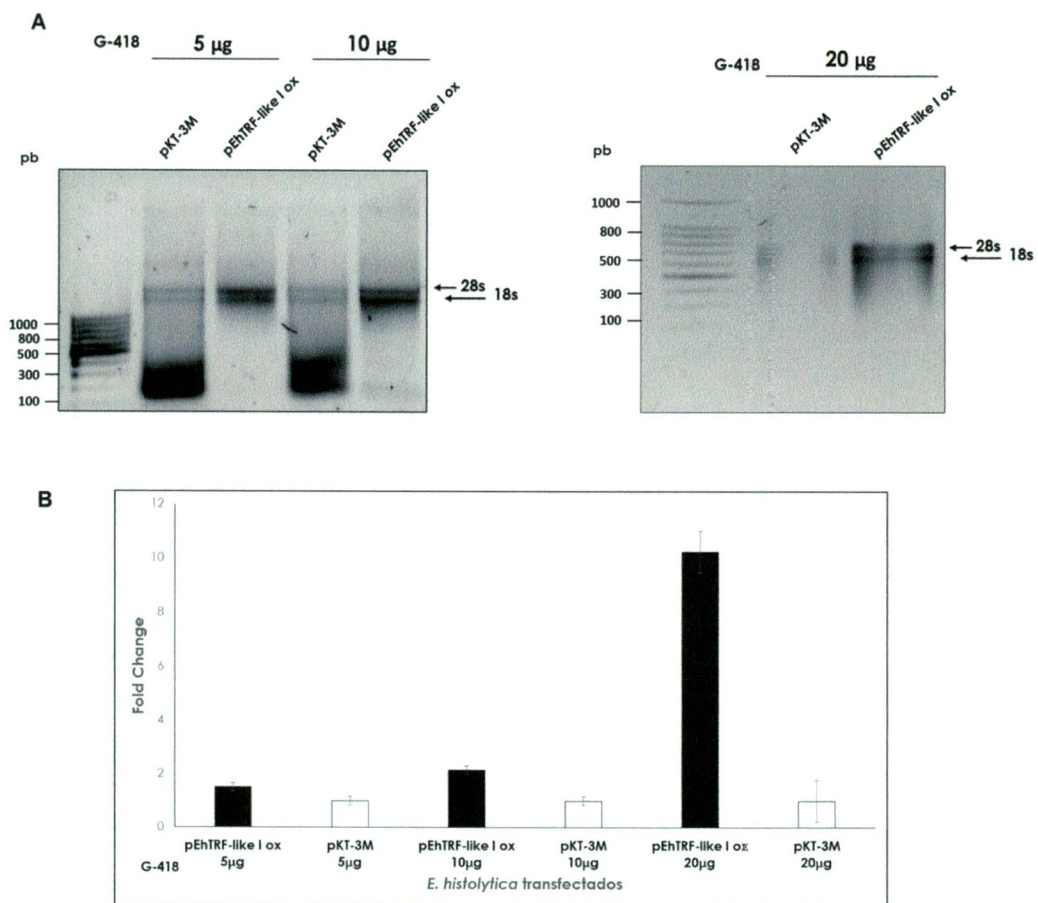


Figura 31. Sobreexpresión del gen *ehtrf-like 1* en los trofozoítos transfectados . A) Integridad de RNA obtenido de trofozoítos transfectados a 5, 10 y 20 µg de antibiótico G-418. B) Fold change de la expresión del gen *ehtrf-like 1* en trofozoítos de *E. histolytica* transfectados obtenidos por qPCR a 5, 10 y 20 µg de antibiótico G418 con respecto a la expresión del gen *Rib40s* como normalizador.

10.7. Análisis de la sobreexpresión de la proteína EhTRF-like I

Aunque nuestros experimentos de qRT-PCR mostraron la sobreexpresión del gen *ehtrf-like 1* a nivel de RNA mensajero es importante corroborar la presencia de la proteína sobreexpresada y que este enriquecida en el núcleo del parásito por lo que iniciamos con el análisis de la expresión de la proteína EhTRF-like I. Para ello, se obtuvieron proteínas totales de los trofozoítos resistentes al antibiótico en las concentraciones de 5 μ g, 10 μ g y 20 μ g de G418.

La proteína EhTRF-like I se inmunodetectó en todas las condiciones con un peso molecular de 55 kDa encontrándose que a partir de 5 μ g se empieza a ver la sobreexpresión de la proteína la cual es significativa con respecto al vector vacío. Sin embargo la mayor concentración de la proteína se obtuvo en los trofozoítos transfectados con el plásmido pEhTRF-like I ox en las condiciones de 20 μ g con respecto a los trofozoítos transfectados con el vector vacío pKT-3M (Figura 32B y C). Aunque existieron variaciones importantes cuando se utilizó actina como control de carga la membrana de nitrocelulosa a la cual fueron transferidas las proteínas muestra una concentración similar en cada una de las condiciones analizadas (Figura 32A).

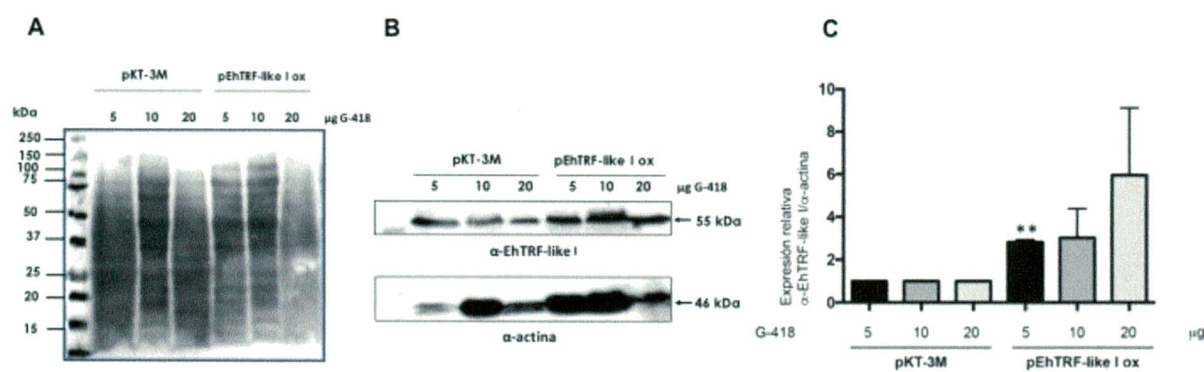


Figura 32. Sobreexpresión de la proteína EhTRF-like I. A) Extractos totales obtenidos de trofozoítos transfectados con los plásmidos pKT-3M (vacío) y el pEhTRF-like I ox crecidos en diferentes concentraciones del antibiótico G-418 (5, 10 y 20 μ g) se separaron en un gel de SDS-PAGE al 15% y se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa la cual fue teñida con rojo de Ponceau. B) Inmunodetección de la proteína EhTRF-like I en extractos totales de proteínas de *Entamoeba histolytica* transfectantes en las condiciones antes descritas. Se utilizó el anticuerpo α -actina como control de carga. C) Expresión relativa de EhTRF-like I la cual se obtuvo al realizar el análisis densitométrico de las bandas detectadas en (B) con respecto a la proteína actina.

10.8. Localización subcelular de la proteína EhTRF-like I heteróloga.

Con la finalidad de observar su localización subcelular y ver si realmente hubo un enriquecimiento de la proteína EhTRF-like I en el núcleo después de que se realizó la transfección con la construcción pEhTRF-like I y el plásmido vacío pKT-3M en las condiciones de 5, 10 y 20 μg de G-418 se llevó a cabo una extracción de proteína total y un fraccionamiento celular con los trofozoítos bajo estas condiciones. Posterior a la obtención de los fraccionamientos proteicos se inmunodetectó a la proteína EhTRF-like I en las proteínas totales y en las fracciones citoplásmicas, nucleares, y nucleares insolubles de las clonas transfectadas con los plásmidos pEhTRF-like I ox y pKT-3M crecidas en 5 μg , 10 μg y 20 μg de G418.

Como resultado, en las transfectantes crecidas en 5 μg de antibiótico se pudo detectar a la proteína con un peso de 55 kDa en los extractos totales y en la fracción citoplásmica, sin embargo en las fracciones nucleares y nucleares insolubles la detección es menor y en esta concentración no se observaron diferencias en la cantidad de proteína EhTRF-like I entre las clonas del vector pKT-3M y EhTRF-like I ox (Figura 33B). En la concentración de 10 μg de antibiótico empleando las mismas fracciones se observaron diferencias entre los trofozoitos transfectados, en dónde se observa que hay un enriquecimiento de esta proteína en la fracción nuclear soluble. Sin embargo, donde se observó una mayor cantidad de la proteína EhTRF-like I fue en la condición de 20 μg de antibiótico observándose mayor cantidad de proteína en la fracción nuclear soluble de los trofozoitos transfectados con el plásmido pEhTRF-like I ox que en los trofozoítos transfectados con el plásmido vacío pKT-3M (Figura 33B). En esta condición también se incrementa ligeramente en la fracción nuclear insoluble. Se muestran las membranas de proteínas obtenidas de los fraccionamientos y extractos totales teñidas con rojo de ponceau de las 3 condiciones mostrando cantidades similares de proteína (Figura 33A).

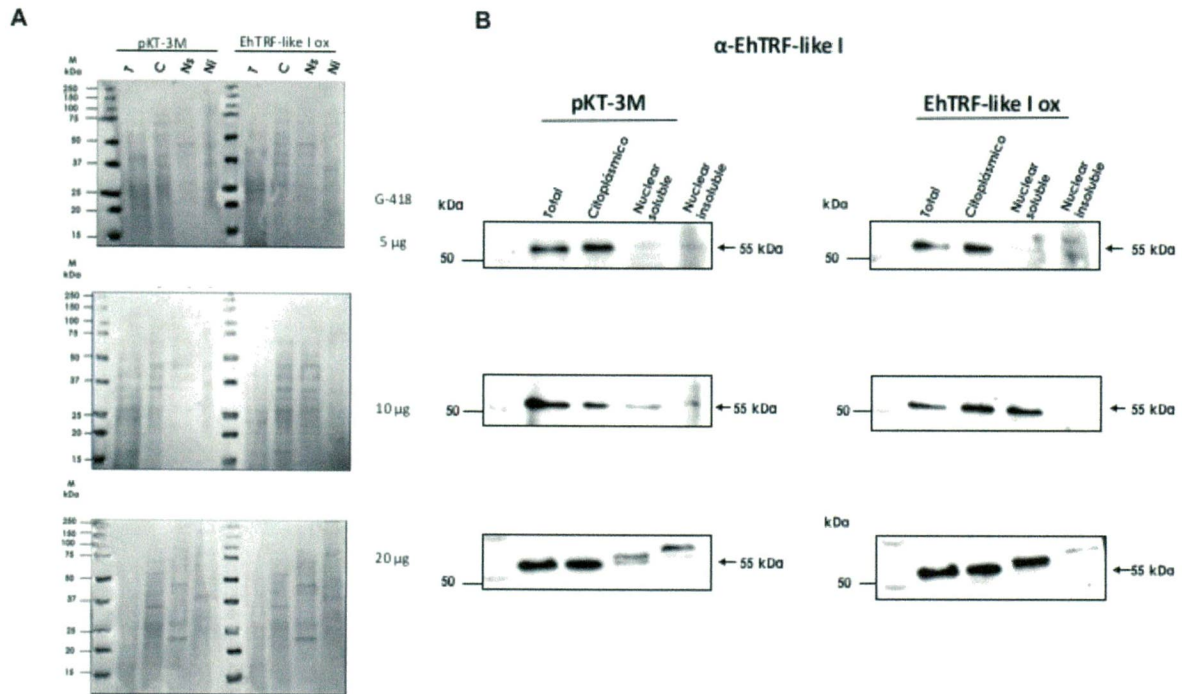


Figura 33. Inmunodetección de la proteína EhTRF-like I en trofozoitos transfectantes sometidos a 5, 10 y 20µg de antibiótico G418. A) Membranas teñidas con rojo de Ponceau, B) Detección de EhTRF-like I en trofozoitos transfectantes con el plásmido vacío pKT-3M y detección de EhTRF-like I en trofozoitos transfectantes con el plásmido pEhTRF-like I ox empleando el anticuerpo α -EhTRF-like I. T: extractos totales, C: extractos citoplásmicos, Ns: extractos nucleares solubles, Ni: extractos nucleares insolubles.

También se corroboró la sobreexpresión de la proteína EhTRF-like I heteróloga por medio de Inmunofluorescencia en los trofozoitos de *E. histolytica* transfectados utilizando un anticuerpo comercial α -Myc ya que esta proteína se sobreexpresa fusionada a esta etiqueta. La proteína también se observó localizada en la periferia nuclear en la condición de 5, 10 y 20 µg y en citoplasma en los tratamientos con 5 y 10µg de antibiótico como se muestra en la Figura 34, sin embargo se obtiene un mejor patrón de localización nuclear en la concentración de 20µg de antibiótico en donde fue posible visualizar una localización y un enriquecimiento de la proteína EhTRF-like I en la periferia nuclear.

Con todos estos análisis se corrobora que la sobreexpresión de 10.2 veces del transcrito del gen *ehtrf-like I*, la sobre-expresión de la proteína EhTRF-like I y su enriquecimiento en la fracción nuclear y su localización perinuclear, en los trofozoitos transfectados con

el pEhTRF-like lox al usar 20 μ g de antibiótico G-418 es la condición ideal para los posteriores ensayos de Inmunofluorescencia e inmunoprecipitación.

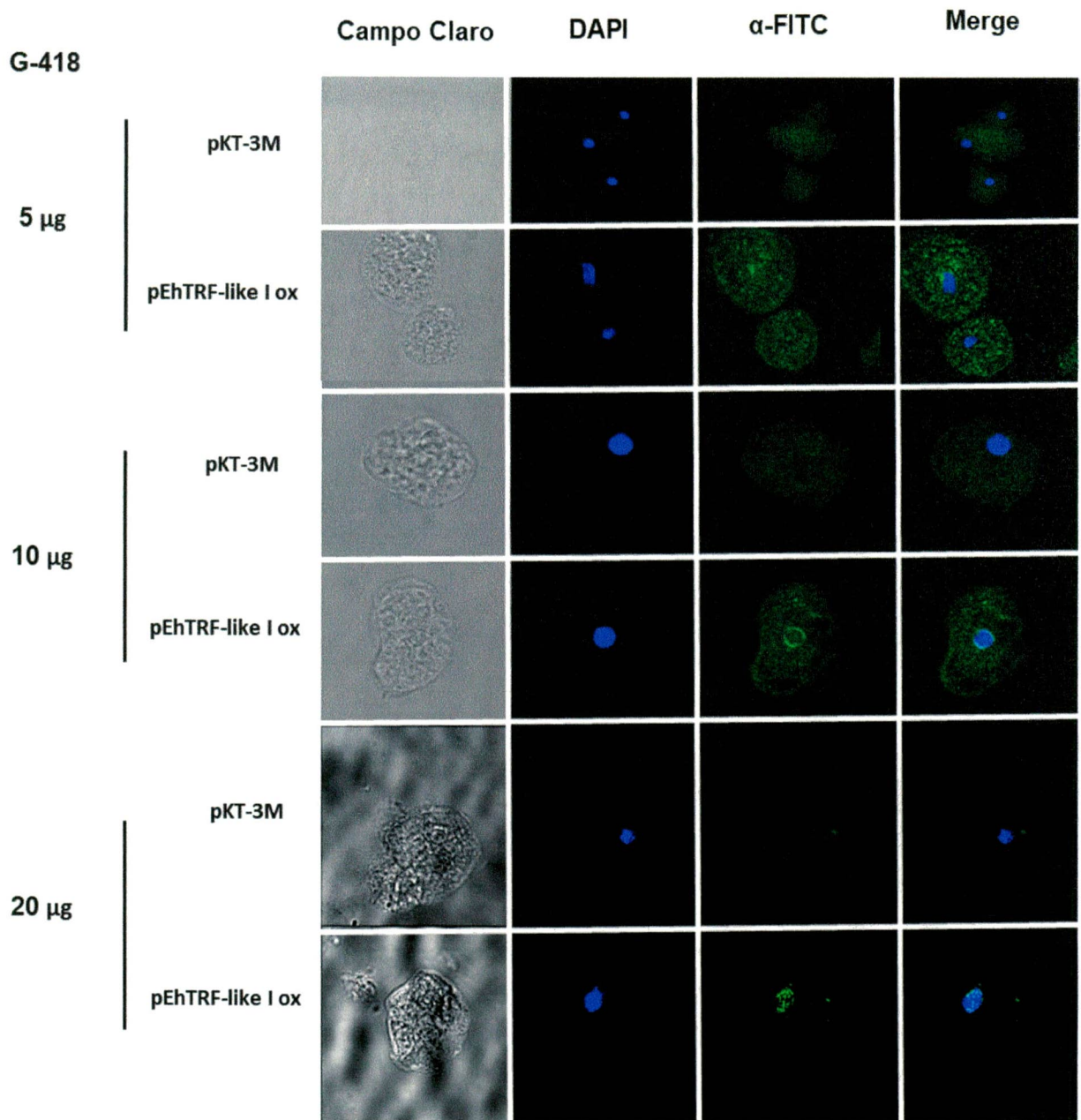
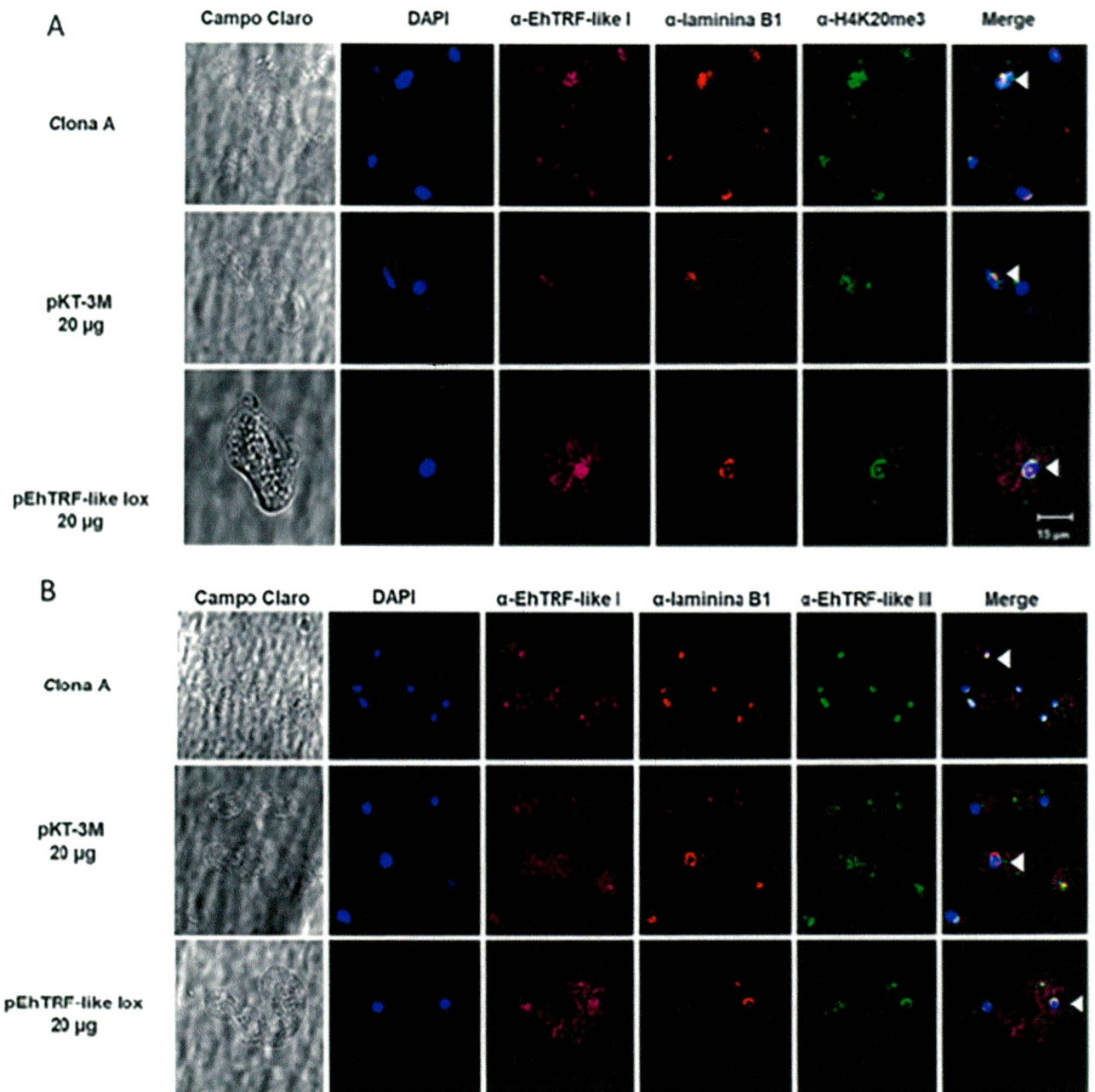


Figura 34. Localización subcelular de proteína EhTRF-like I heteróloga en los trofozoitos transfectados. Trofozoitos transfectados con los plásmidos pKT-3M (vacío) y pEhTRF-like I ox sometidos a 5, 10 y 20 μ g de antibiótico incubados con el anticuerpo α -Myc y como anticuerpo secundario se utilizó un α -conejo acoplado a FITC. Los núcleos se tiñeron con DAPI y las preparaciones se visualizaron empleando microscopía confocal. Las imágenes se procesaron en el programa Image J. Las flechas indican la localización de EhTRF-like I en el núcleo

10.9. Colocalización de EhTRF-like I, EhTRF-like III, H4K20me3 y Laminina B1

Una de las preguntas centrales de este trabajo es la colocalización de la proteína EhTRF-like I con EhTRF-like III para corroborar que ocupan una posición similar en el núcleo lo cual podría correlacionar con su posible papel en la maquinaria de protección de los telómeros. Así mismo es importante colocalizar a estas proteínas con un marcador de cromatina telomérica por lo que nos propusimos realizar la colocalización a EhTRF-like I con H4K20me3. Y finalmente es importante realizar la colocalización con un marcador de periferia nuclear por lo que también se incluyó a Laminina B1. Es por ello que ya que se tenían estandarizadas las condiciones en las cuales son detectadas a estas proteínas por microscopías de inmunofluorescencia y con el objetivo de observar si la proteína en estudio EhTRF-like I se asocia a las proteínas H4K20me3, Laminina B1 y EhTRF-like III se realizaron los ensayos de colocalización por inmunofluorescencia donde los anticuerpos contra estas proteínas se marcaron con 3 distintos fluoróforos para poder colocalizar a estas proteínas. Se marcaron los anticuerpos de la siguiente manera: α -EhTRF-like I con Alexa647, α -Laminina B1 con Alexa555 y con Alexa488 a α -EhTRF-like III y α -H4K20me3. Se hicieron 2 ensayos en el primero se colocalizó a EhTRF-like I, Laminina B1 y H4K20me3 y en el segundo se colocalizó a EhTRF-like I, EhTRF-like III y Laminina B1.

En los resultados se pudo determinar que las proteínas EhTRF-like I y la marca telomérica H4K20me3 colocalizaron en la periferia nuclear junto con Laminina B1, lo cual se observa tanto en las condiciones de trofozoitos sin transfectar, el vector vacío y se hace más evidente al enriquecer a la proteína EhTRF-like I en las clonas que la sobreexpresan. De manera interesante también se observaron algunos *foci* donde colocalizan EhTRF-like I y la marca telomérica de H4K20me3 (Figura 35 A y C). De manera interesante las proteínas EhTRF-like I y EhTRF-like III colocalizaron en la periferia nuclear con la proteína Laminina B1, estos resultados se muestran en la Figura 35 B y D. Estos hallazgos son relevantes porque aportan información sobre el posible papel de la proteínas EhTRF-like en la protección de los extremos terminales de los cromosomas en *E. histolytica*.



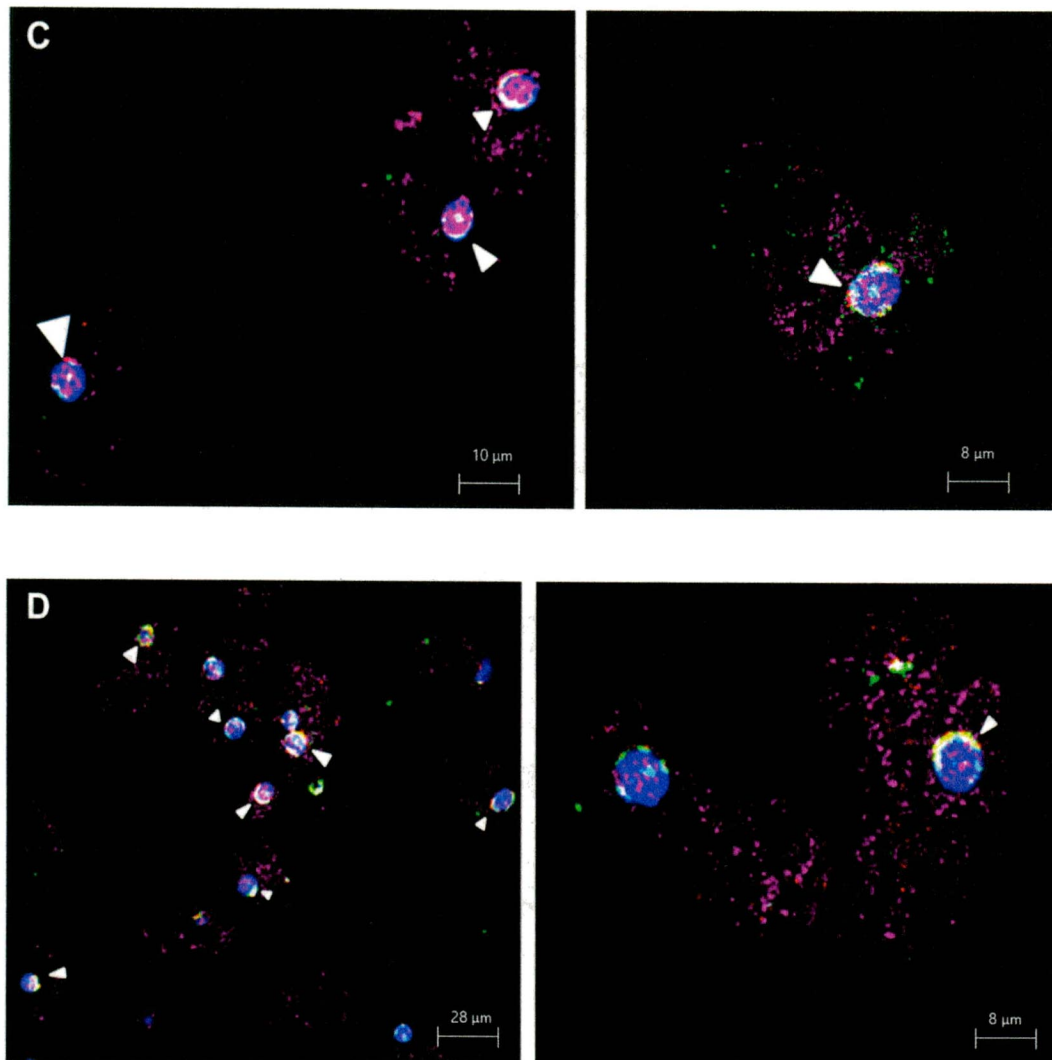


Figura 35. Colocalización de EhTRF-like I y EhTRF-like III, Laminina B1 y H4K20me3. Trofozoitos de clona A o las clonas transfectadas con los plásmidos pKT-3M y pEhTRF-like lox se incubaron con los anticuerpos α -EhTRF-like I (Alexa-647, magenta), α -Laminina B1 (Alexa-555, rojo), α -H4K20me3 (Alexa-488, verde) y α -EhTRF-like III (Alexa-488, verde), los núcleos se contrateñieron con DAPI y se analizaron mediante microscopía confocal. En A) colocalización de EhTRF-like I, Laminina B1 y H4K20me3; en B) colocalización de EhTRF-like I, EhTRF-like III y Laminina B1. En C) se muestran ampliaciones de colocalización de EhTRF-like I, Laminina B1 y H4K20me3 y en D) ampliaciones de colocalización de EhTRF-like I, EhTRF-like III y Laminina B1. Las cabezas de flecha color blanco señalan su colocalización en la periferia nuclear.

Objetivo 3. Determinar la interacción de EhTRF-like I con proteínas relacionadas con la función telomérica en *E. histolytica*.

10.10. Búsqueda de genes que codifican para proteínas de la maquinaria de Shelterin en el genoma de *E. histolytica*.

Como se ha mencionado anteriormente, en el parásito *E. histolytica* a la fecha no se ha descrito una maquinaria telomérica que explique la protección de sus extremos terminales de los cromosomas o proteínas que mantengan la integridad de las regiones teloméricas en este organismo. Es por ello que dentro de la búsqueda de una maquinaria telomérica en este organismo y con el objetivo de identificar a los componentes ortólogos de la maquinaria del Shelterin, codificados en el genoma de *E. histolytica* realizamos búsquedas empleando las herramientas psiBlastp y Delta-Blast alojadas en el sitio National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), utilizando como sondas las secuencias de aminoácidos de las proteínas Rap1, TIN2, TPP1, POT1 de *H. sapiens* obtenidas de la base de datos UniProt (<http://www.uniprot.org/>).

Se realizaron tantas interacciones como fueran necesarias hasta no obtener más hits significativos y se planteó la selección de las proteínas que tuvieran un porcentaje de identidad mayor o igual al 25% para dar soporte a su potencial función como componentes de esta maquinaria telomérica. Adicionalmente, se analizó la presencia de dominios conservados que se relacionaran con la función de estas proteínas, en la base de datos Pfam (<http://pfam.xfam.org/>). Por medio de estos análisis identificamos a dos proteínas que contienen homología con proteínas de la maquinaria de Shelterin de *H. sapiens* en el parásito *E. histolytica*. La primera, es una proteína similar a RAP1, la cual denominamos EhRap-like cuyo número de acceso en la base de datos de AmoebaDB es EHI_064550. La proteína EhRap-like se conforma de 156 aa y tiene un 26% de identidad con la proteína RAP1, mientras que RAP1 se constituye de 399 aa (Tabla 14). Al analizar los dominios estructurales de EhRap-like, se observó que sólo conserva el dominio de interacción con la proteína TRF2. La proteína RAP1 de *H. sapiens*, en el complejo del Shelterin, se une al DNA por medio de un dominio tipo MYB, que no está presente en la

proteína EhRap-like. La proteína Rap además tiene funciones de activador o represor de la transcripción, modificador de la cromatina y protege los telómeros al interactuar con la proteína TRF2. Es interesante que la proteína EhRap-like de *E. histolytica* conserva solamente el dominio de interacción a TRF2, por lo que podríamos sugerir que su función es únicamente en la protección de los telómeros. Por otro lado, la segunda proteína que identificamos presentó homología a POT1 de *Homo sapiens*. La proteína identificada se denominó EhPOT-like y es codificada por el gen con número de acceso EHI_062980. En la base de datos se encuentra reportada como Factor de Replicación A1 (del inglés, replication factor A protein) sin embargo presenta un 17% de identidad con la proteína POT1 y al analizar los dominios estructurales, identificamos un dominio OB Fold que es importante para el reconocimiento del DNA de cadena sencilla y que también se encuentra en POT1, por lo que podríamos proponer una función similar para EhPOT-like (Tabla 14). En conclusión, los análisis realizados nos sugieren que *E. histolytica* tiene una maquinaria para proteger sus telómeros más simple que la de *H. sapiens*. Es interesante acotar que en el caso de los parásitos unicelulares como *Trypanosoma* y *Leishmania* solamente se ha identificado al ortólogo de la proteína TRF2.

Tabla 14. Proteínas candidatas para formar parte del complejo de Shelterin de *E. histolytica*

Número de Acceso Amoeba DB	Anotación AmoebaDB	Longitud (aa)	Identidad (%)	Score	Valor E
EhRAP1-like					
EHI_064550	Proteína hipotética	156	26	86.7	2E ⁻¹⁹
EhPOT1-like					
EHI_062980	replication factor A protein	310	17	22	9E ⁻⁵⁰
	1				

10.11. Interactoma de la proteína EhTRF-like I

Para tener una aproximación de las interacciones proteína-proteína que pudiera tener la proteína EhTRF-like I se realizó un interactoma en el programa STRING (<https://string-db.org>). El programa arrojó una predicción de interacciones con proteínas las cuales son:

proteínas de mantenimiento estructural de cromosomas, la proteína MRE 11 involucrada en la reparación de DNA de doble cadena, una proteína de la familia metalo beta lactamasa involucrada en el mantenimiento telomérico, proteínas cinasas las cuales se han reportado estabilizan a TRF1, además de una proteína de clivaje y poliadenilación involucrada en la maduración del RNA mensajero (Figura 36). También se realizó un interactoma con la proteína TRF1 en el cual el programa predijo interacciones con proteínas de la maquinaria Shelterin en *H. sapiens* como TRF2, POT1, TIN2, la telomerasa TERT y proteínas de reparación como XRCC5, RAD50 y MRE11. Además se buscaron los pesos moleculares de las proteínas encontradas en el interactoma con EhTRF-like I y se buscó sus funciones biológicas enlistadas en la siguiente tabla (Tabla 15).

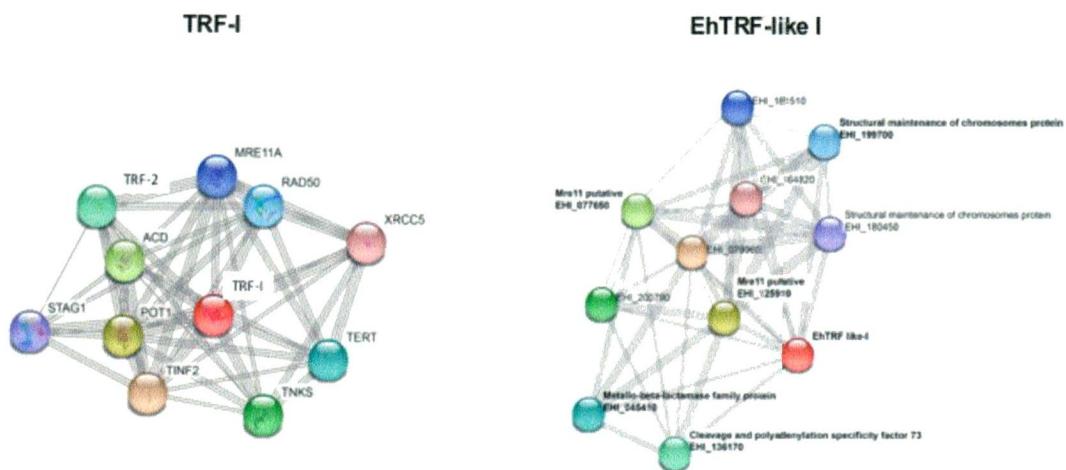


Figura 36. Interactomas de las proteínas TRF1 y EhTRF-like I. Interactoma realizado empleando la herramienta STRING utilizando como referencia a las proteínas TRF1 y EhTRF-like I con número de acceso de UniProtKB de P54274 y C4M119, respectivamente.

Tabla 15. Proteínas que interactúan con EhTRF-like I

Numero de acceso*	Anotación*	Peso Molecular kDa	Proceso Biológico
EHI_125910	Mre11 putative	68.8	Recombinación homóloga
EHI_077650	Mre11 putative	25.2	Recombinación homóloga
EHI_127290	Proteína con dominio proteín cinasa	73	Actividad proteín cinasa dependiente de ATP
EHI_045410	Metallo-beta-lactamase family protein	50.8	Nucleasa, mantenimiento telomérico
EHI_199700	Structural maintenance of chromosomes protein	143.9	Organización de cromosomas
EHI_180450	Structural maintenance of chromosomes protein	119	Reparación de doble cadena por recombinación homóloga
EHI_136170	Cleavage and polyadenylation specificity factor	73	Procesamiento de mRNA

* de acuerdo a AmoebaDB

De manera interesante se encontró a la proteína MRE 11 en el interactoma realizado tanto como con la proteína TRF1 como con la proteína EhTRF-like I. Esta proteína está involucrada en la vía ALT, la cual es un mecanismo alternativo para alargamiento telomérico independiente de telomerasa, por lo que se procedió a buscar los genes codificantes para las proteínas principales de este mecanismo en la base de datos de AmoebaDB. El resultado de este análisis es que el genoma de *E. histolytica* contiene todos los genes que codifican para proteínas de la vía ALT, las proteínas identificadas se muestran en la Tabla 16. La identificación de las proteínas involucradas en el mecanismo alternativo de mantenimiento de telómeros (vía ALT) podría explicar cómo se lleva a cabo el mantenimiento telomérico en *E. histolytica*.

Tabla 16. Proteínas de la vía ALT identificadas en *E. histolytica*

Proteína	Función	Número de acceso	Anotación	Identidad %	Valor E	Peso Molecular kDa
Rad51	RecA-like DNA transfiere proteínas involucradas en la reparación de DSB y sencilla por HR. Se asocia con RPA, BLM y PML formando focis en sitios de lesiones de DNA	EHI_031220	Proteína de reparación del DNA Rad51 putativa	70	3E ⁻¹⁶⁵	40.3
Rad52	Se une a extremos de DNA de cadena doble y asiste la actividad de RAD51. Colocaliza con RAD51 y RAD50/MRE11 focis durante la reparación de daño al DNA de cadena doble.	EHI_188230	Proteína de reparación y recombinación RAD52 putativa	48	3E ⁻⁴²	26.9
RPA	Proteína de unión a DNA de cadena sencilla facilita el desenrollamiento y modula la actividad de otras enzimas. Juega un rol esencial en la replicación del DNA, recombinación y reparación.	EHI_062980	Proteína conteniendo un dominio de unión a DNA OB-fold	24	7E ⁻³⁴	16.7
Mre11	MRE11 in vitro es una exonucleasa 3'-5' y una endonucleasa de DNA de cadena sencilla forma parte del complejo MRN involucrado en la reparación por daño al DNA vía HR.	EHI_125910	Proteína de reparación de doble hebra MRE11 putativa	33	2E ⁻⁵⁶	68.8
Rad50	Parte del complejo MNR su actividad se combina con Mre11 y su acción helicasa de DNA provee una actividad exonucleasa in vivo 5'-3'	EHI_079960	Proteína de reparación por daño a DNA de cadena doble Rad50 ATPasa , putativa	48	1E ⁻⁴⁸	146.4
NBS1	Componente del complejo MRN es requerida para la fosforilación y activación del complejo y generalmente presente durante la fase S.	EHI_098770	Proteína hipotética	24	6E ⁻⁰⁴	51.5
WRN	Helicasa tipo RecQ involucrada en la replicación del DNA. Facilita la recombinación homóloga.	EHI_023090	Helicasa recQ de DNA dependiente de ATP putativa	37	7E ⁻⁷²	58.5
BLM	BLM puede interactuar con RPA. P53 facilita la acumulación de BLM en cuerpos PML nuclear	EHI_028890	Helicasa putativa	39	2E ⁻¹²⁰	137.58

10.12. Inmunoprecipitación de la proteína EhTRF-like I

Con la idea de identificar proteínas que interaccionan con la proteína EhTRF-like I y teniendo los datos de las predicciones realizadas en los análisis *in silico* nos propusimos averiguar que proteínas interaccionan con EhTRF-like I y una manera de identificar interacciones proteína-proteína es mediante el ensayo de inmunoprecipitación. Para identificar proteínas que interaccionen con la proteína EhTRF-like I se realizó el ensayo de inmunoprecipitación con proteínas totales obtenidas a partir de trofozoítos transfectados con el plásmido vacío pK-T3M y con el plásmido pEhTRF-like I ox resistentes a la condición de 20 µg de antibiótico G-418 ya que como se mostró en los resultados anteriores bajo esta condición obtiene un mayor enriquecimiento de la proteína EhTRF-like I. Para llevar a cabo el ensayo se utilizó una sepharosa la cual tiene acoplado un anticuerpo α-myc, mediante el cual se captura a la proteína EhTRF-like I sobreexpresada la cual tiene la etiqueta de myc. Una vez realizado este ensayo las proteínas inmunoprecipitadas se resolvieron en un gel de SDS/PAGE teñido con plata para evidenciar el mayor número de bandas. En este gel se pudieron visualizar bandas diferenciales que corresponden a proteínas con un peso molecular entre los 20 y 120 kDa (Figura 37 A). Este resultado es un antecedente importante en la búsqueda de las proteínas que interaccionan con EhTRF-like I por lo que hicimos una correlación entre las proteínas que identificamos en los análisis *in silico* y los pesos moleculares de las bandas obtenidas. Esto nos proporcionó un indicio de proteínas podrían estar interaccionando con la proteína EhTRF-like I. Por ejemplo, las proteínas que se encontraron en pesos mayores a 100 kDa podrían corresponder a proteínas estructurales del cromosoma (proteínas SMC) con pesos moleculares de 119 kDa y 143.9 kDa, o bien proteínas de reparación como EhATM de 287 kDa, EhRad50 de 146.4 kDa, y EhBLM de 137.5 kDa. De igual modo se encontraron proteínas que corresponden con pesos moleculares de 50 kDa hasta 75 kDa las cuales podrían corresponder a una proteína cinasa de 73 kDa, EhMre11 de 68.8 kDa, EhPOT1-like de 66.69 kDa, EhWRN de 58.5 kDa, o bien EhNBS1 que tiene un peso de 51.5 kDa. Asimismo se pudieron observar bandas de proteínas en bajo peso molecular que se encuentran en un rango de los 16 kDa hasta los 50 kDa y las cuales podrían corresponder a proteínas como una EhRad51

de 40.3 kDa, EhCK de 38.9 kDa, EhRad52 de 26.9 kDa, EhMre11 de 25.2 kDa, EhRPA de 16.7 kDa ó EhRap-like de 17.85 kDa que corresponde al homólogo de la proteína Rap de humano (Figura 37A).

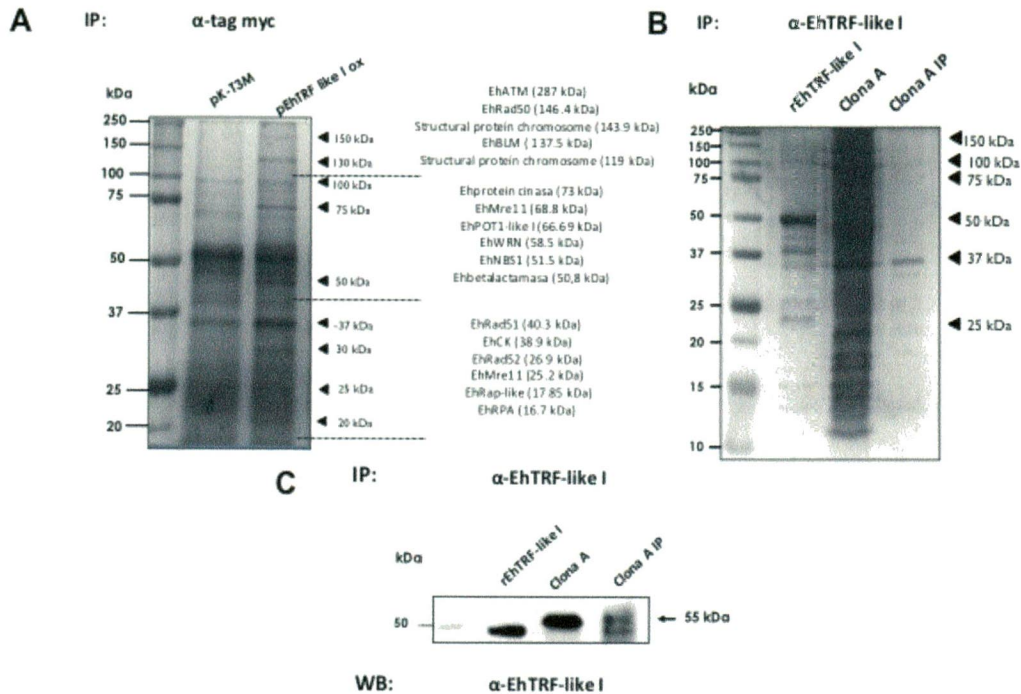


Figura 37. Proteínas inmunoprecipitadas con los anticuerpos α -myc y α -EhTRF-like I. **A)** Gel de proteínas obtenidas del ensayo de inmunoprecipitación teñido con plata empleando el anticuerpo α -myc en extractos totales de los trofozoítos transfectados con el plásmido vacío pKT-3M y con el plásmido pEhTRF-like I ox crecidos con 20 μ g de G418 teñido con plata. **B)** Gel de proteínas teñido con plata obtenidas del ensayo de inmunoprecipitación empleando el anticuerpo α -EhTRF-like I utilizando extractos totales de trofozoítos de la clona A (Clona A IP). **C)** Inmunodetección de la proteína EhTRF-like I inmunoprecipitada utilizando el anticuerpo α -EhTRF-like I. Como control positivo se utilizó a la proteína recombinante rEhTRF-like I y proteínas totales no inmunoprecipitadas (Clona A). Las cabezas de flecha en B señalan los pesos moleculares de las bandas de proteínas encontradas que son similares al ensayo de inmunoprecipitación realizado en A.

Se comparó también la proteínas que son inmunoprecipitadas con el anticuerpo α -EhTRF-like I empleando perlas magnéticas acopladas a proteína A. Inicialmente se realizó utilizando proteínas totales obtenidas de trofozoítos de *E. histolytica* de la clona A, las cuales también fueron analizadas en un gel SDS-PAGE teñido con plata. El patrón de bandas de proteínas obtenido resulto más limpio con respecto al anterior sin embargo fue posible observar 6 bandas definidas que corresponden a los pesos moleculares de

150 kDa, 100 kDa, 75 kDa, 50 kDa, 37 kDa, y 25 kDa las cuales son similares a las encontradas en el ensayo de inmunoprecipitación (Figura 37 B) lo cual muestra la reproducibilidad de las proteínas que se están inmunoprecipitando. Para corroborar que en los ensayos de inmunoprecipitación se está inmunoprecipitando a la proteína EhTRF-like I se realizó una inmunodetección empleando el anticuerpo α -EhTRF-like I. En este experimento se corrió también un carril de proteínas sin inmunoprecipitar, así como la proteína recombinante rEhTRF-like I como control positivo. Se corroboró el proceso de inmunoprecipitación ya que inmunodetectamos a la proteína EhTRF-like I utilizando el anticuerpo α -EhTRF-like I, en el cual se pudo detectar a la proteína EhTRF-like I en las proteínas sometidas al ensayo de inmunoprecipitación y en los extractos de proteínas sin inmunoprecipitar en su peso molecular de 55 kDa, así como a la proteína recombinante rEhTRF-like I en su peso molecular de 48 kDa (Figura 37 C).

Una vez corroborada la reproducibilidad del ensayo y la inmunoprecipitación de EhTRF-like I finalmente se hizo un ensayo de inmunoprecipitación empleando las perlas magnéticas acopladas al anticuerpo α -EhTRF-like I con extractos de proteínas totales de trofozoítos transfectados con el plásmido vacío pKT-3M y trofozoítos transfectados con la construcción pEhTRF-like I ox. Las proteínas inmunoprecipitadas eluidas obtenidas se corrieron en un gel de poliacrilamida SDS-PAGE y para revelar más bandas se realizó una tinción con plata. En donde se pudieron observar con mejor definición, además se realizó una inmunodetección utilizando el anticuerpo α -Laminina B1 para corroborar la asociación previamente observada en los ensayos de inmunofluorescencia. Los resultados muestran las bandas que se inmunoprecipitan las cuales están entre los pesos moleculares de \sim 25 kDa y de \sim 100 kDa las cuales son similares a los pesos de 25 kDa, 37 kDa, 50kDa, 75 kDa y 100 kDa aproximadamente previamente obtenidos tanto en este ensayo como en todos los ensayos de inmunoprecipitación realizados anteriormente. De este las proteínas enriquecidas una banda de una proteína con un peso de 50 kDa la cual se mandó a su identificación por espectrometría de masas en el Instituto Nacional de Medicina Genómica (INMEGEN) de la cual se espera su resultado (Figura 38A). Finalmente, se realizó la inmunodetección de la proteína Laminina B1 en las muestras que se inmunoprecipitaron utilizando el anticuerpo comercial α -Laminina B1 y en el cual como se esperaba se pudo detectar a la proteína Laminina B1 en las

proteínas obtenidas del ensayo de inmunoprecipitación de la condición de transfección con la construcción pEhTRF-like I ox con respecto a la condición de transfección con el plásmido vacío pKT-3M en la cual no se observa una mayor detección de la proteína Laminina B1 (Figura 38 B). En resumen, estos resultados corroboran la interacción entre la proteína EhTRF-like I y Laminina B1 que también fue observada por ensayos de microscopía de inmunofluorescencia en donde se observó una localización en periferia nuclear colocalizada con EhTRF-like III y la marca de heterocromatina telomérica H4K20me3. Lo cual podría ser indicativo de que existe una interacción entre la proteína EhTRF-like I y Laminina B1 en regiones de heterocromatina telomérica en el parásito *E. histolytica* ya sea que esta interacción se encuentre mediada por otra proteína desconocida y que este llevando a cabo sus funciones de protección en los telómeros de este organismo.

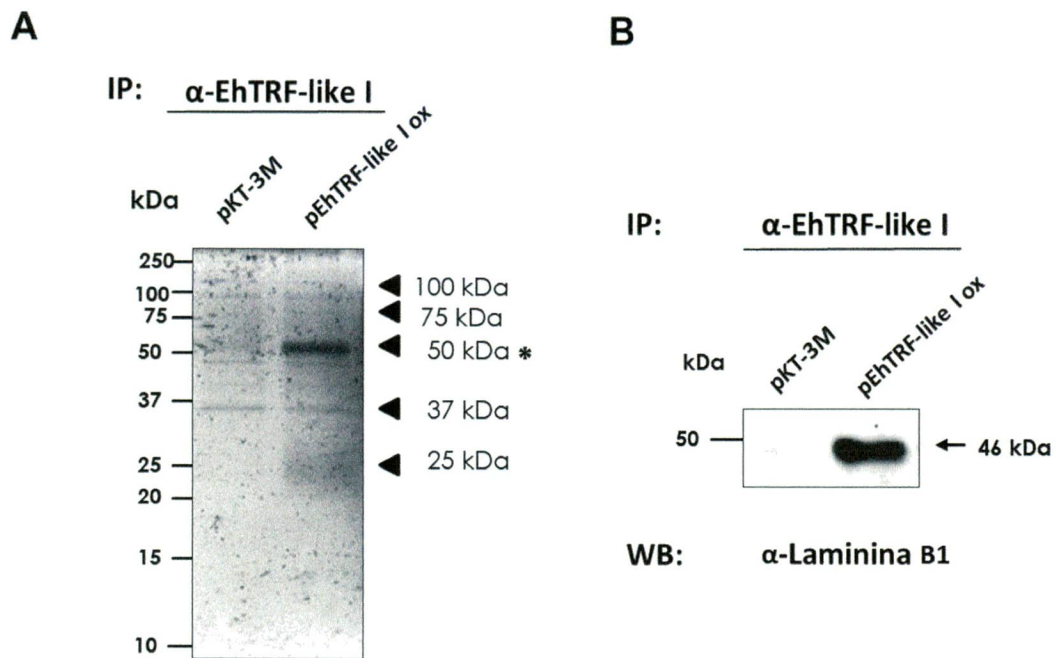


Figura 38. La proteína EhTRF-like I coprecipita con Laminina B1. A) Gel de proteínas obtenidas del ensayo de inmunoprecipitación empleando el anticuerpo α -EhTRF-like I y extractos totales de los trofozoítos transfectados con el plásmido vacío pKT-3M o con el plásmido pEhTRF-like I ox crecidos con 20 μ g de G418 teñido con plata B) Inmunodetección de la proteína Laminina B1 utilizando el anticuerpo comercial α -Laminina B1 en las proteínas inmunoprecipitadas.

11 DISCUSIÓN

En este trabajo se estudió la proteína EhTRF-like I de *E. histolytica*, debido a que se ha encontrado que posee homología y similitud con la proteína TRF1 de *H. sapiens*. TRF1 es una proteína que se expresa abundantemente ya que se requieren de miles de dímeros de la misma para cubrir el extremo telomérico de los 23 pares de cromosomas humanos. TRF1 forma parte del complejo de Shelterin que protege a los extremos terminales de los cromosomas así como también bloquea proteínas involucradas en vías de reparación que censan el daño a DNA de doble cadena y de hebra sencilla en los telómeros. TRF1 mantiene la integridad del extremo cromosomal regulando la longitud del extremo telomérico por el efecto de la inhibición de la enzima telomerasa (Palm, 2008; Li, 2005; De Lange, 2005). Esta proteína se expresa ubicuamente y aparentemente es regulada durante el ciclo celular (Palm y de Lange, 2008). En el caso de este parásito y aún cuando ya se habían identificado dos genes que codificaban para proteínas similares a proteínas TRF (Horvath, 2000) su papel funcional en el mantenimiento telomérico todavía no se ha esclarecido. *E. histolytica* tiene 3 genes que codifican para las proteínas similares a TRF las cuales se denominaron EhTRF-like I, II y III. Los tres genes se expresan en condiciones basales de cultivo sin embargo, se conoce poco de su expresión a nivel de proteína. Es por ello que se planteó determinar la expresión y localización subcelular de la proteína EhTRF-like I en trofozoítos de *E. histolytica* en condiciones basales de cultivo. Para ello se realizó un fraccionamiento subcelular y se obtuvieron fracciones citoplásmicas, nucleares solubles y nucleares insolubles. Dado que las proteínas TRF se han reportado asociadas a la membrana nuclear específicamente a Laminina B1 la obtención de una fracción nuclear insoluble resultaba importante porque podría ser que la proteína EhTRF-like I estuviera enriquecida en esa fracción. La proteína EhTRF-like I de *E. histolytica* está compuesta por 404 aa y tiene un peso teórico de 46.8 kDa. Sin embargo, nosotros la detectamos en extractos totales, la fracción soluble y en la citoplásmica con un peso molecular de 55 kDa, 8.2 kDa más que el peso predicho para la proteína mientras que en la fracción insoluble se encontró con un peso molecular de 36 kDa. En muchos casos estas diferencias están relacionadas con las modificaciones químicas de las proteínas las cuales ocurren a nivel post-

traduccional [modificaciones postraduccionales (PTMs)]. En especial las glicosilaciones, ubiquitinaciones y SUMOilaciones causan cambios drásticos en la movilidad de las proteínas y en menor manera las fosforilaciones. (Audagnotto y Peraro, 2017). Esto es relevante ya que la función de la proteína TRF1 está altamente regulada por las PTM que son dependientes de los eventos celulares y modifican su capacidad de unirse al DNA telomérico, su dimerización su localización, su degradación e interacción con otras proteínas (Walker y Zhu, 2012). Por tanto realizamos un análisis *in silico* para predecir las posibles PTMs que podría sufrir EhTRF-like I y con ellos explicar las variaciones detectadas en su peso molecular.

Los resultados arrojaron que EhTRF-like I puede ser modificada por fosforilaciones, ubiquitinaciones, ADP-ribosilaciones y SUMOilaciones en diferentes residuos algunos de ellos conservados con respecto a TRF1. Por ejemplo, el residuo S384 de EhTRF-like I esta conservado con el S435 de TRF1 el cual es fosforilado por la cinasa Plk1. El gen que codifica para esta cinasa también está presente en el genoma del parásito. Esta fosforilación es importante porque estimula la unión de TRF1 al DNA telomérico, sin embargo nosotros descartamos que esta PTM sea la responsable de la modificación del peso molecular ya que las mismas no incrementan significativamente la masa molecular (Wu, *et al.*, 2008). Se encontró que principalmente los sitios de SUMOilación K302 y K303 de EhTRF-like I se encuentran conservados con respecto a TRF1 (K338 y K339), lo cual podría explicar la diferencia que se detectó, ya que se ha reportado que las proteínas SUMOiladas aumentan su peso molecular de 8 a 17 kDa por cada unidad del péptido SUMO añadido pudiendo existir distintos estados de SUMOilación en las proteínas (Hilgarth y *et al.*, 2005). La SUMOilación tiene un papel crítico en la regulación de proteínas con función nuclear ya que está relacionada al transporte nuclear, transcripción, ubicación en compartimientos subnucleares, organización de la cromatina, reparación del daño al DNA y está ligada a la regulación del ciclo celular, crecimiento y la apoptosis (Flotho y Melchior, 2013). En el caso de TRF1 la SUMOilación es relevante en la vía ALT de mantenimiento telomérico, la cual sucede en ausencia de telomerasa. Cuando TRF1 es SUMOilada esta es reclutada en los cuerpos PML, en los cuales se concentran otras proteínas que se requieren para esta vía como son proteínas involucradas en la recombinación. En estos cuerpos PML también se han identificado a

las regiones teloméricas las cuales se usan de molde para replicar el DNA telomérico (Yu et al., 2007; Royle et al., 2008).

En resumen en este trabajo sugerimos que el aumento en el peso molecular de la proteína EhTRF-like I podría explicarse por medio de SUMOilaciones lo cual podría sugerir que podría tener un papel funcional similar a TRF1. De manera interesante la enzima MMS21 está codificada en el genoma de *E. histolytica*, así mismo se han identificado a todas las enzimas involucradas en la SUMOilación (Bosch et al., 2013). Estos resultados nos permiten proponer que EhTRF-like I podría modificarse de manera similar a TRF1 y modular su actividad en la protección del DNA telomérico. Adicionalmente, sería necesario en trabajos posteriores corroborar experimentalmente la presencia de SUMOilaciones de EhTRF-like I.

Como resultado también se obtuvo la detección de la proteína EhTRF-like I en la fracción nuclear insoluble con un peso molecular de 36 kDa. Este peso es más bajo que el predicho y es aún más difícil de explicar. Sin embargo, en el análisis *in silico* para buscar sitios susceptibles a rompimiento proteolítico se identificó al residuo E352 el cual es un sitio de corte proteolítico que si fuera funcional generaría un péptido con un peso similar al encontrado en la fracción insoluble. De manera interesante este residuo también está conservado en TRF1. Finalmente, es importante tener en cuenta que tanto TRF1 como EhTRF-like I tienen pI ácidos 5.99 y 5.88 respectivamente, lo cual podría alterar su corrimiento electroforético y con ello explicar las variaciones de peso molecular encontradas, tal y como ha sido reportado por Guan y colaboradores (2015). Dichos autores reportaron variaciones en el peso esperado de las proteínas acídicas y explican las diferencias en el patrón observado y esperado de corrimiento en geles SDS-PAGE de proteínas acídicas, y por tanto en su peso molecular visualizado por SDS-PAGE debido a su naturaleza (Guan, 2015).

Finalmente, con respecto a este objetivo es importante destacar que nosotros esperábamos encontrar solamente a la proteína EhTRF-like I en las fracciones nucleares como ocurrió con las histonas H4K20me3 y H3K27me3, las cuales fueron detectadas solamente en las fracciones nucleares solubles tal y como fue reportado por Borbolla (2016) y Foda (2015) respectivamente para el caso de *E. histolytica*. No obstante otras

proteínas con actividad nuclear también se han encontrado muy enriquecidas en el citoplasma de este parásito. Tal es el caso de la proteína EhHKMT4 la cual es una metiltransferasa que metila el residuo K20 de la H4 y que se ha identificado en el núcleo y citoplasma de trofozoítos de este parásito (Borbolla, 2016). Los resultados de la inmunodetección se correlacionaron con los resultados obtenidos en los ensayos de microscopía de inmunofluorescencia en donde se observó a la proteína en el núcleo, en el citoplasma y en algunas vesículas. La proteína visualizada en núcleo se observó en periferia nuclear, sin embargo ésta detección fue escasa en esta región del núcleo. Para corroborar que la ubicación de la proteína EhTRF-like I era en la periferia nuclear se incluyó el anticuerpo anti Laminina B1 en los ensayos. Nuestros resultados al usar este anticuerpo inmunodetectaron a Laminina B1 en la fracción nuclear insoluble y por microscopías de inmunofluorescencia se observó en periferia nuclear como ya ha sido reportado también por microscopías de inmunofluorescencia (Borbolla, 2016; Lozano, 2016).

En la siguiente parte del estudio que fue determinar la colocalización de EhTRF-like I con Laminina B1 y proteínas relacionadas con la función telomérica se procedió como primera tarea obtener una clona de *E. histolytica* que sobreexpresará a la proteína EhTRF-like I y de esta manera enriquecer su presencia en el núcleo específicamente en la periferia nuclear. Para ello, utilizamos el plásmido pKT-3M el cual ha sido ampliamente empleado para la caracterización de proteínas nucleares como factores de transcripción en este parásito (Saito, 2004; Abhyankar et al., 2008; Ehrenkauffer et al., 2009). En el laboratorio se generó una clona transfectante la cual sobreexpresa a la proteína EhTRF-like I en la periferia nuclear y el nucleoplasma cuando se someten a 20 µg del antibiótico G418. Al emplear esta transfectante, nuestros resultados mostraron la colocalización de EhTRF-like I y Laminina B1 lo cual es evidencia de que podría estar anclada a la membrana nuclear en una organización tipo Rab1 como se ha descrito para levaduras, plantas y animales superiores. La organización Rab1 en el ser humano se ha estudiado en células de fibroblastos y células HeLa donde también se ha determinado que los telómeros tienen un anclaje a la envoltura nuclear durante las etapas iniciales de la fase

G1 del ciclo celular (Crabbe, 2012; Giraud, 2013). Este anclaje a la membrana al parecer ser importante debido a que protege de la recombinación deletérea durante la fase S del ciclo celular. Así mismo, también esta localización está relacionada con el silenciamiento génico ya que ahí también se concentra el complejo SIR (del inglés Silent Information Regulator, por ejemplo Sir2 el cual es una histona desacetilasa) el cual es importante para generar heterocromatina constitutiva (Crabbe et al., 2012; Giraud-Panis et al. 2013). No solo las proteínas TRF1 y 2 colocalizan en la membrana nuclear sino también se ha identificado a otros miembros de la maquinaria telomérica como por ejemplo en levaduras se localizó a la proteína Rap cercana a la membrana nuclear así como regiones teloméricas silenciadas (Andrulis, 2002). La proteína Rap1 también es capaz de reclutar al complejo SIR, que como se explicó anteriormente es esencial para la formación de heterocromatina, lo cual causa represión de los genes ubicados en estas regiones. La asociación con la membrana nuclear es a través de la proteína RAP1 y una proteína mediadora denominada Sun (Giraud, 2013). Sin embargo, se realizó una búsqueda del gen que codifica para esta proteína en el genoma de *E. histolytica* y no se encontró por lo que hasta ahora no sabemos si hay alguna proteína mediadora en este parásito.

Otro aspecto importante era la colocalización de la proteína EhTRF-like I y H4K20me3 ya que es un marcador de DNA telomérico. Numerosas PTM de las histonas se han asociado con regiones teloméricas por lo cual estas regiones son consideradas heterocromatina al tener una mayor grado de compactación lo cual coadyuva para proteger a las regiones teloméricas. Los telómeros de *Drosophila* están enriquecidos en la marca H3K9me3 la cual es reconocida por la proteína HP1 (Proteínas de heterocromatina, del inglés heterocromatin protein 1) (Galati et al., 2013). Sin embargo, en mamíferos también se han localizado otras marcas epigenéticas las cuales son H3K9me3 y H4K20me3. Para este trabajo se seleccionó la marca H4K20me3 debido a que previamente fue identificada y descrita en este parásito por Borbolla y cols. (2016). Estos hallazgos sugieren que al colocalizar EhTRF-like I con la marca telomérica de H4K20me3 podría estar participando en la organización y regulación del DNA telomérico en periferia nuclear en *Entamoeba histolytica*.

Finalmente, colocalizamos a la proteína EhTRF-like I con la proteína EhTRF-like III la cual es una proteína telomérica homóloga a TRF-2 de humano que ya se está estudiando en nuestro grupo de trabajo. Los datos derivados del estudio de la proteína EhTRF-like III mostraron que esta proteína es capaz de reconocer secuencias teloméricas de DNA de *H. sapiens* y por medio de MET se localizó en regiones de heterocromatina condensada (Diaz-Vanesa, tesis de Maestría, 2018, manuscrito en preparación Rendón-Gandarilla). La colocalización EhTRF-like I y EhTRF-like III es una evidencia adicional de que estas proteínas podrían estar llevar a cabo funciones similares a TRF1 y TRF2 y que el papel de la proteína EhTRF-like I en *E. histolytica* podría ser similar a otros organismos participando en la protección de los extremos de los cromosomas.

Una parte importante de este trabajo fue determinar las posibles interacciones de la proteína EhTRF1 con proteínas relacionadas con la maquinaria telomérica. Una interrogante importante para el grupo de investigación es saber si este parásito tiene todos los genes que codifican para esta maquinaria en su genoma. Es de importancia señalar que por ejemplo en los parásitos unicelulares como *Trypanosoma* y *Leishmania* solamente se ha identificado el ortólogo de la proteína TRF2 (Conte, 2005; Li, 2005; Da Silva et al., 2010). Nuestra búsqueda arrojó la presencia de dos proteínas homólogas, una proteína similar a RAP1, que se denominó EhRap-like y la segunda proteína presentó homología a Pot1 y fue denominada EhPot-like. Los análisis realizados sugieren que *E. histolytica* tiene una maquinaria para proteger sus telómeros más simple que la de *H. sapiens*. La presencia EhRap-like podría ayudar a la estabilización de la proteína EhTRF-like III de la misma forma que Rap estabiliza la interacción de TRF2 en *H. sapiens* (Palm, 2008). La presencia de una proteína similar a Pot es relevante debido a su función en el reconocimiento del DNA de cadena sencilla que está en el extremo 3' del DNA telomérico (Palm, 2008). Esta evidencia correlaciona con lo que ya ha sido reportado en otros organismos que poseen maquinarias teloméricas mas simplificadas como es el caso del ciliado *Oxytricha nova* que posee dos proteínas que se unen al DNA telomérico, las proteínas TEBP α y TEBP β ó *Tetrahymena thermophila* en la cual solo está presente la proteína POT1a de unión a DNA de cadena sencilla (Giraud, 2013).

Las interacciones proteína-proteína en donde participa TRF1 son muy complejas, ya que esta reportado que esta proteína interactúa con proteínas involucradas en diferentes procesos biológicos en los telómeros y fuera de éstos. Entre las proteínas que se han identificado están: las de respuesta al daño al DNA, ubiquitinación, cohesión de cromosomas, remodelación y modificación de la cromatina, replicación del DNA, regulación de la transcripción y del ciclo celular, metabolismo de nucleótidos, procesamiento de RNA y transporte a núcleo (Giannone et al., 2010). Para iniciar la tarea propuesta inicialmente se obtuvo el interactoma con en el programa STRING con la proteína EhTRF-like I, en el cual no se encontraron proteínas de la maquinaria de *Shelterin* como se encontró para TRF1. Sin embargo, el programa arrojó proteínas de interacción que corresponden a proteínas de reparación involucradas en el mecanismo de alargamiento telomérico vía ALT (del inglés, Alternative Lengthening of Telomeres). Estas son proteínas que participan en el mantenimiento estructural de cromosomas (SMC), al igual que la proteína MRE11. Este hallazgo nos pareció relevante ya que este mecanismo ALT funciona en ausencia de la enzima telomerasa y en el genoma del parásito *E. histolytica* no se ha identificado ningún gen para telomerasa, lo cual sería una explicación para el mantenimiento de sus telómeros. Es por ello que se realizó una búsqueda de los genes que codifican para las proteínas involucradas en este mecanismo en el genoma de *E. histolytica*, identificando a Rad51, Rad52, RPA, MRE11, Rad50, NBS1, WRN y BLM (Henson, 2002). Estos análisis *in silico* nos ayudaron a definir que posibles proteínas podíamos identificar experimentalmente mediante los ensayos de inmunoprecipitación. En estos ensayos de inmunoprecipitación se obtuvieron bandas de proteínas que inmunoprecipitan al utilizar ya sea el anticuerpo α -tag Myc o el anticuerpo α -EhTRF-like I, las cuales corresponden a los pesos de 25 kDa, 37 kDa, 50kDa, 75 kDa y 100 kDa aproximadamente y que son reproducibles al utilizar los dos anticuerpos. Una banda con un peso aproximado de 50 kDa se seleccionó para su identificación por espectrometría de masas, resultado que aún no se ha obtenido. Sin embargo, en los ensayos de inmunodetección por western blot se pudo detectar a la proteína Laminina B1 cuando se inmunoprecipita a EhTRF-like I lo que corrobora una interacción entre las dos proteínas en este parásito. Esto correlaciona con lo reportado en *H. sapiens* en un estudio realizado por Crabbe, 2012., en donde también realizan ensayos de

inmunoprecipitación con un anticuerpo α -TRF1 en el cual inmunodetectan a la proteína Laminina B1.

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

Con base en estos hallazgos se realizó un modelo que sugiere la localización y una posible organización nuclear de la proteína EhTRF-like I, donde se muestra que esta proteína se encuentra interaccionando en la periferia nuclear con la proteína Laminina B1. Esta interacción posiblemente está mediada por una proteína desconocida en este organismo la cual podría realizar una función similar a la proteína de anclaje Sun como en *H. sapiens* (Giraud, 2013). También EhTRF-like I interacciona con EhTRF-like III, homóloga de TRF2, en regiones de heterocromatina condensada colocalizando con la marca de heterocromatina H4K20me3 (Figura 39).

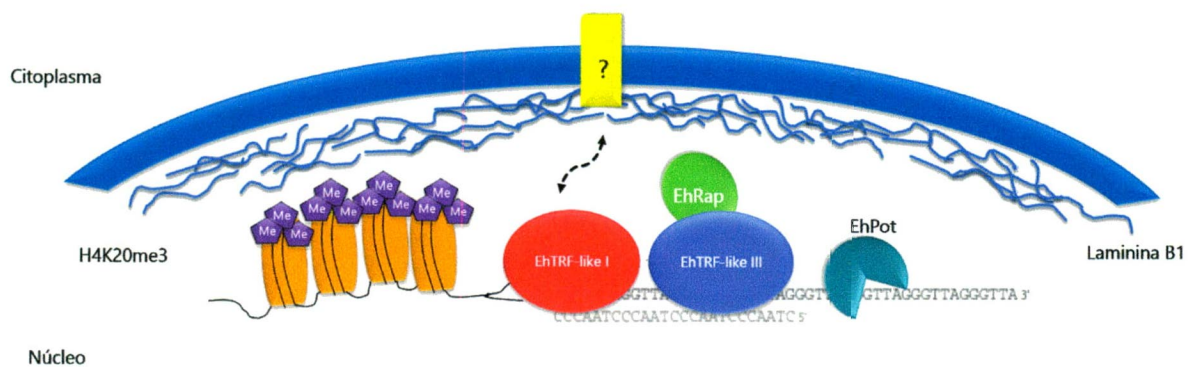


Figura 39. Modelo de la localización de la proteína EhTRF-like I. Esquema sugerido de la localización de la proteína EhTRF-like I (en rojo) unido al DNA de doble cadena donde se muestra su posible interacción con la proteína EhTRF-like III (en azul) interaccionando con la lámina nuclear en la periferia nuclear. Se muestra a Rap (en verde) y posiblemente anclados a través de otra proteína desconocida (en amarillo). También se muestra a la proteína Pot de unión a DNA de cadena sencilla y la localización de la marca de heterocromatina telomérica H4K20me3 en periferia nuclear.

12. CONCLUSIONES

- EhTRF-like I se inmunodetectó en las fracciones citoplásmicas y nucleares con un peso molecular de 55KDa y se localizó en la periferia nuclear, colocalizando con laminina B1 y con la marca de heterocromatina telomérica H4K20me3.
- EhTRF-like I coprecipita con laminina B1, lo cual demuestra su interacción con esta proteína en la periferia nuclear, sin embargo no sabemos si esta interacción es mediada por alguna proteína como ocurre en *H. sapiens* que es a través de Sun1.
- El análisis *in silico* predice la interacción de EhTRF-like I con proteínas involucradas con el mecanismo alternativo de mantenimiento de telómeros (vía ALT) lo cual podría explicar cómo se lleva a cabo el mantenimiento telomérico en *E. histolytica*.
- Estos hallazgos sugieren que EhTRF-like I podría estar participando en la organización y regulación del DNA telomérico en *E. histolytica*.

13. PERSPECTIVAS

- Determinar si la proteína EhTRF-like I está SUMOilada y analizar el efecto de esta PTM sobre la función de EhTRF-like I en *E. histolytica*.
- Determinar si el mecanismo alternativo de mantenimiento de telómeros (ALT) funciona en *E. histolytica*.

- Determinar la interacción de EhTRF-like I con proteínas involucradas en la vía ALT empleando coimmunoprecipitaciones y microscopias de fluorescencia.
- Realizar un ensayo de CHIP empleando el anticuerpo α -EhTRF-like I para inmunoprecipitar secuencias teloméricas y secuenciarlas para determinar la secuencia de las regiones teloméricas de *E. histolytica*.
- Colocalizar a las proteína EhTRF-like con las secuencias de DNA telomérico inmunoprecipitadas y secuenciadas.

14. Bibliografía

- Abhyankar, M. M., Hochreiter, A. E., Hershey, J., Evans, C., Zhang, Y., Crasta, O., & Gilchrist, C. A. (2008). Characterization of an *Entamoeba histolytica* high-mobility-group box protein induced during intestinal infection. *Eukaryotic cell*, 7(9), 1565-1572.
- Andrulis, E. D., Zappulla, D. C., Ansari, A., Perrod, S., Laiosa, C. V., Gartenberg, M. R., & Sternglanz, R. (2002). Esc1, a nuclear periphery protein required for Sir4-based plasmid anchoring and partitioning. *Molecular and Cellular Biology*, 22(23), 8292-8301.
- Audagnotto, M., & Dal Peraro, M. (2017). Protein post-translational modifications: In silico prediction tools and molecular modeling. *Computational and structural biotechnology journal*, 15, 307-319.
- Bianchi, A., & Shore, D. (2004). *Telomeres: Maintenance and Replication*, Elsevier: Amsterdam.
- Borbolla-Vázquez, J., Orozco, E., Betanzos, A., & Rodríguez, M. A. (2015). *Entamoeba histolytica*: protein arginine transferase 1a methylates arginine residues and potentially modify the H4 histone. *Parasites & vectors*, 8(1), 219. p. 1.
- Borbolla-Vázquez, J., Orozco, E., Medina-Gómez, C., Martínez-Higuera, A., Javier-Reyna, R., Chávez, B., & Rodríguez, M. A. (2016). Identification and functional characterization of lysine methyltransferases of *Entamoeba histolytica*. *Molecular microbiology*, 101(2), 351-365.
- Bosch, D. E., & Siderovski, D. P. (2013). Structural determinants of ubiquitin conjugation in *Entamoeba histolytica*. *Journal of Biological Chemistry*, 288(4), 2290-2302.
- Broccoli, D., Smogorzewska, A., Chong, L., & de Lange, T. (1997). Human telomeres contain two distinct Myb-related proteins, TRF1 and TRF2. *Nature genetics*, 17(2), 231-235.
- Chávez-Munguía, B., Tsutsumi, V., & Martínez-Palomo, A. (2006). *Entamoeba histolytica*: ultrastructure of the chromosomes and the mitotic spindle. *Experimental parasitology*, 114(3), 235-239.
- Clark, C. G., Ali, I. K. M., Zaki, M., Loftus, B. J., & Hall, N. (2006). Unique organisation of tRNA genes in *Entamoeba histolytica*. *Molecular and biochemical parasitology*, 146(1), 24-29.

Conte, F. F., & Cano, M. I. N. (2005). Genomic organization of telomeric and subtelomeric sequences of *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. *International journal for parasitology*, 35(13), 1435-1443.

Cooper, J. P., Nimmo, E. R., Allshire, R. C., & Cech, T. R. (1997). Regulation of telomere length and function by a Myb-domain protein in fission yeast. *Nature*, 385(6618), 744-747.

Crabbe, L., Cesare, A. J., Kasuboski, J. M., Fitzpatrick, J. A., & Karlseder, J. (2012). Human telomeres are tethered to the nuclear envelope during postmitotic nuclear assembly. *Cell reports*, 2(6), 1521-1529.

da Silva, M. S., Perez, A. M., Rita de Cássia, V., de Moraes, C. E., Siqueira-Neto, J. L., Freitas-Junior, L. H., & Cano, M. I. N. (2010). The *Leishmania amazonensis* TRF (TTAGGG repeat-binding factor) homologue binds and co-localizes with telomeres. *BMC microbiology*, 10(1), 136.

De Lange, T. (2005). Shelterin: the protein complex that shapes and safeguards human telomeres. *Genes & development*, 19(18), 2100-2110.

Díaz M. V. (2018). Análisis funcional de una proteína EhTRF-like III en *E. histolytica*. Tesis de maestría. Universidad Autónoma de la Ciudad de México Ciudad de México.

Diotti, R., & Loayza, D. (2011). Shelterin complex and associated factors at human telomeres. *Nucleus*, 2(2), 119-135.

Ehrenkaufer, G. M., Hackney, J. A., & Singh, U. (2009). A developmentally regulated Myb domain protein regulates expression of a subset of stage-specific genes in *Entamoeba histolytica*. *Cellular microbiology*, 11(6), 898-910.

Flotho, A., & Melchior, F. (2013). Sumoylation: a regulatory protein modification in health and disease. *Annual review of biochemistry*, 82, 357-385.

Foda, B. M., & Singh, U. (2015). Dimethylated H3K27 is a repressive epigenetic histone mark in the protist *Entamoeba histolytica* and is significantly enriched in genes silenced via the RNAi pathway. *Journal of Biological Chemistry*, 290(34), 21114-21130.

Giannone, R. J., McDonald, H. W., Hurst, G. B., Shen, R. F., Wang, Y., & Liu, Y. (2010). The protein network surrounding the human telomere repeat binding factors TRF1, TRF2, and POT1. *PLoS One*, 5(8), e12407.

Giraud-Panis, M. J., Pisano, S., Benarroch-Popivker, D., Pei, B., Le Du, M. H., & Gilson, E. (2013). One identity or more for telomeres?. *Frontiers in oncology*, 3.

- Gomez, C., Esther Ramirez, M., Calixto-Galvez, M., Medel, O., & Rodríguez, M. A. (2010). Regulation of gene expression in protozoa parasites. *BioMed Research International*, 2010.
- Guan, Y., Zhu, Q., Huang, D., Zhao, S., Lo, L. J., & Peng, J. (2015). An equation to estimate the difference between theoretically predicted and SDS PAGE-displayed molecular weights for an acidic peptide. *Scientific reports*, 5.
- Henson, J. D., Neumann, A. A., Yeager, T. R., & Reddel, R. R. (2002). Alternative lengthening of telomeres in mammalian cells. *oncogene*, 21(4), 598-610.
- Hilgarth, R. S., & Sarge, K. D. (2005). Detection of sumoylated proteins. *Ubiquitin-Proteasome Protocols*, 329-337.
- Ichikawa, Y., Nishimura, Y., Kurumizaka, H., & Shimizu, M. (2015). Nucleosome organization and chromatin dynamics in telomeres. *Biomolecular concepts*, 6(1), 67-75.
- Jørgensen, S., Schotta, G., & Sørensen, C. S. (2013). Histone H4 lysine 20 methylation: key player in epigenetic regulation of genomic integrity. *Nucleic acids research*, 41(5), 2797-2806.
- Kourmouli, N., Jeppesen, P., Mahadevhaiah, S., Burgoyne, P., Wu, R., Gilbert, D. M., & Shi, W. (2004). Heterochromatin and tri-methylated lysine 20 of histone H4 in animals. *Journal of cell science*, 117(12), 2491-2501.
- Lewis, K. A., & Wuttke, D. S. (2012). Telomerase and telomere-associated proteins: structural insights into mechanism and evolution. *Structure*, 20(1), 28-39.
- Li, B., Espinal, A., & Cross, G. A. (2005). Trypanosome telomeres are protected by a homologue of mammalian TRF2. *Molecular and cellular biology*, 25(12), 5011-5021.
- Lorenzi, H. A., Puiu, D., Miller, J. R., Brinkac, L. M., Amedeo, P., Hall, N., & Caler, E. V. (2010). New assembly, reannotation and analysis of the *Entamoeba histolytica* genome reveal new genomic features and protein content information. *PLoS neglected tropical diseases*, 4(6), e716.
- Lozano-Amado, D., Herrera-Solorio, A. M., Valdés, J., Alemán-Lazarini, L., de Jesús Almaraz-Barrera, M., Luna-Rivera, E., & Hernández-Rivas, R. (2016). Identification of repressive and active epigenetic marks and nuclear bodies in *Entamoeba histolytica*. *Parasites & vectors*, 9(1), 19.
- Luna-Nácar, M., Navarrete-Perea, J., Moguel, B., Bobes, R. J., Laclette, J. P., & Carrero, J. C. (2016). Proteomic study of *Entamoeba histolytica* trophozoites, cysts, and cyst-like structures. *PloS one*, 11(5), e0156018.

- McKerlie, M., & Zhu, X. D. (2011). Cyclin B-dependent kinase 1 regulates human TRF1 to modulate the resolution of sister telomeres. *Nature communications*, 2, 371.
- Meneses, E., Cárdenas, H., Zárata, S., Brieba, L. G., Orozco, E., López-Camarillo, C., & Azuara-Liceaga, E. (2010). The R2R3 Myb protein family in *Entamoeba histolytica*. *Gene*, 455(1), 32-42.
- Musgrove, C., Jansson, L. I., & Stone, M. D. (2017). New perspectives on telomerase RNA structure and function. *Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA*
- Nakada-Tsukui, K., & Nozaki, T. (2016). Immune response of amebiasis and immune evasion by *Entamoeba histolytica*. *Frontiers in immunology*, 7.
- Palm, W., & de Lange, T. (2008). How shelterin protects mammalian telomeres. *Annual review of genetics*, 42, 301-334.
- Petri Jr, W. A., Smith, R. D., Schlesinger, P. H., Murphy, C. F., & Ravdin, J. I. (1987). Isolation of the galactose-binding lectin that mediates the in vitro adherence of *Entamoeba histolytica*. *Journal of Clinical Investigation*, 80(5), 1238.
- Pineda, E., & Perdomo, D. (2017). *Entamoeba histolytica* under Oxidative Stress: What Countermeasure Mechanisms Are in Place?. *Cells*, 6(4), 44.
- Rhodes, D., Fairall, L., Simonsson, T., & Chapman, L. (2002). Telomere architecture. *EMBO reports*, 3(12), 1139-1145.
- Royle, N. J., Foxon, J., Jeyapalan, J. N., Mendez-Bermudez, A., Novo, C. L., Williams, J., & Cotton, V. E. (2008). Telomere length maintenance—an ALTERNative mechanism. *Cytogenetic and genome research*, 122(3-4), 281-291.
- Riveron, A. M., Lopez-Canovas, L., Baez-Camargo, M., Flores, E., Perez-Perez, G., Luna-Arias, J. P., & Orozco, E. (2000). Circular and linear DNA molecules in the *Entamoeba histolytica* complex molecular karyotype. *European Biophysics Journal*, 29(1), 48-56.
- Sandin, S., & Rhodes, D. (2014). Telomerase structure. *Current opinion in structural biology*, 25, 104-110.
- Saito-Nakano, Y., Yasuda, T., Nakada-Tsukui, K., Leippe, M., & Nozaki, T. (2004). Rab5-associated vacuoles play a unique role in phagocytosis of the enteric protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. *Journal of Biological Chemistry*, 279(47), 49497-49507.
- Scherf, A., Figueiredo, L. M., & Freitas-Junior, L. H. (2001). Plasmodium telomeres: a pathogen's perspective. *Current opinion in microbiology*, 4(4), 409-414.

- Sfeir, A., Kosiyatrakul, S. T., Hockemeyer, D., MacRae, S. L., Karlseder, J., Schildkraut, C. L., & de Lange, T. (2009). Mammalian telomeres resemble fragile sites and require TRF1 for efficient replication. *cell*, 138(1), 90-103.
- Valdés, J., de la Cruz Hernández, F., Ocadiz, R., & Orozco, E. (1990). Molecular karyotype of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba invadens*. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 84(4), 537-541.
- Walker, J. R., & Zhu, X. D. (2012). Post-translational modifications of TRF1 and TRF2 and their roles in telomere maintenance. *Mechanisms of ageing and development*, 133(6), 421-434.
- Willhoeft, U., & Tannich, E. (1999). The electrophoretic karyotype of *Entamoeba histolytica*. *Molecular and biochemical parasitology*, 99(1), 41-53.
- Willhoeft, U., & Tannich, E. (2000). Fluorescence microscopy and fluorescence in situ hybridization of *Entamoeba histolytica* nuclei to analyse mitosis and the localization of repetitive DNA. *Molecular and biochemical parasitology*, 105(2), 291-296.
- Wu, Z. Q., Yang, X., Weber, G., & Liu, X. (2008). Plk1 phosphorylation of TRF1 is essential for its binding to telomeres. *Journal of Biological Chemistry*, 283(37), 25503-25513.
- Xin, H., Liu, D., & Songyang, Z. (2008). The telosome/shelterin complex and its functions. *Genome biology*, 9(9), 232.
- Yu, J., Lan, J., Zhu, Y., Lai, X., & Huang, H. (2007). Sumoylation of TRF1 Is Essential for Its Recruitment to ALT-Associated PML Bodies.

ANEXO

15. Resumen del congreso

Localization of the EhTRF-like I protein in *Entamoeba histolytica*

Víctor Álvarez Hernández^{1*}, Rosa Elena Cárdenas Guerra¹, Abigail Betanzos Fernandez^{2,3}, Jesús Valdés Flores⁴, Francisco J. Rendón Gandarilla⁵ and Elisa Azuara Liceaga¹

¹Posgrado en Ciencias Genómicas, Universidad Autónoma de la Ciudad de México, Mexico City. ²Departamento de Infectómica y Patogénesis Molecular, Cinvestav-IPN, Mexico City. ³Conacyt, Mexico City. ⁴Departamento de Bioquímica, Cinvestav-IPN, Mexico City. ⁵Centro Regional de Educación Superior, Campus Zona Norte, Universidad Autónoma de Guerrero.

Regulation of telomere synthesis and protection of the chromosome ends are accomplished through the combined action of several proteins. One of the most important protein complexes in the telomeric function is the Shelterin complex, which is conformed by six proteins: TRF1, TRF2, RAP1, Pot1, TPP1 and TIN2. The specificity of the binding to telomeric DNA is due to TRF1 and TRF2 proteins. TRF1 and TRF2 bind to double stranded DNA as homodimers by their MYB DNA binding domain (MDBD), while dimerization is mediated by the TRF-homology (TRFH) domain. Human TRF1 and TRF2 differ from each other at their amino terminus which is acidic in TRF1 and basic in TRF2. Previously, our work group identified 3 genes encoding for TRF-like proteins in *Entamoeba histolytica*. These proteins were dubbed EhTRF-like I, II and III. EhTRF-like I and II shares similarity with TRF1, while EhTRF-like III shares similarity with TRF2. In this study, to analyze the role of EhTRF-like I protein, we overexpressed the complete gene in trophozoites. By confocal imaging as well as subcellular fractionation and western blot assays, using a specific polyclonal antibody that we generated, we observed the EhTRF-like I protein in cytoplasmic and nuclear fractions. EhTRF-like I protein was localized in nuclear periphery, as it has been reported for yeasts, plants and upper eukaryotes. Our data suggest that in *E. histolytica*, the role of this protein is similar as in other organisms, participating in the protection of the chromosome end and distributing in telomeres at nuclear periphery.

CONACYT (CB-2014-222956). VAH fellowship from CONACYT (586852). RECG fellowship from CONACYT (291053).

16. Carta aceptación XIX Congreso Internacional en Amibiasis 2017



XIX INTERNATIONAL SEMINAR ON AMEBIASIS 2017

October 24 to 28, 2017, Puebla, Puebla, Mex.

Organizers

Cecilia Jimenez MD PhD
Mineko Shibayama PhD
Jesus Serrano PhD

Scientific Committee

Adolfo Martinez Palomo MD PhD
Serge Ankri PhD
Luis Gabriel Briebe PhD
Kris Chadee PhD
Nancy Guillen PhD
Isaura Meza PhD
Tomoyoshi Nozaki PhD
William Petri Jr. MD PhD
Sharon Reed MD PhD
Egbert Tannich PhD
Victor Tsutsumi PhD

Puebla Committee

Jose Lino Zumaquero Rios PhD
Jose Luis Gandara Ramirez M Sc
Blanca Teresa Pacheco Soto
Jesus Roberto Melgoza Ponce
Maria Fernanda Cuevas Gongora
Ailyn Amalia Huerta Hernandez
Jesus Manuel Rodriguez Becerra
Javier Alejandro Arriaga Gomez

Dear COLLEAGUE

We are pleased to inform you that your Abstract entitle:

Localization of the EhTRF-like I protein in *Entamoeba histolytica*

Whose authors are: Víctor Álvarez Hernández, Rosa Elena Cárdenas Guerra, Abigail Betanzos Fernandez, Jesús Valdés Flores, Francisco J. Rendón Gandarilla and Elisa Azuara Liceaga was accepted to participate in the XIX International Seminar on Amebiasis, to be held in the city of Puebla, Mexico in October 24 to 28, 2017.

The modality of presentation:

POSTER, Session I Biochemistry, Cell Biology and Bioinformatics
October 25, 2017 / 16:45 pm - 18:45 pm

Thank you very much for your interest in be part of the Seminar, hoping you fulfill your academic and scientific expectation.

Sincerely yours

Organizers Committee

Dr. Cecilia Jiménez

Dr. Mineko Shibayama

Dr. Jesus Serrano

secretariat: seminario.amibiasis@gmail.com

Coordinación de Certificación y Registro

UACM
Universidad Autónoma
de la Ciudad de México
Nada Humano me es ajeno