

# 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

**Estudio de EhMRE11 y su participación en  
la vía ALT en *Entamoeba histolytica***

**T E S I S**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE  
**MAESTRA EN CIENCIAS GENÓMICAS**

P R E S E N T A:

**ANDREA LORENA ACOSTA RODRÍGUEZ**

D I R E C T O R A

**DRA. ELISA IRENE AZUARA LICEAGA**

C O D I R E C T O R A

**DRA. ABIGAIL BETANZOS FERNÁNDEZ**

POSGRADO  
EN CIENCIAS  
GENÓMICAS

Ciudad de México, enero de 2020.

## SISTEMA BIBLIOTECARIO DE INFORMACIÓN Y DOCUMENTACIÓN



## UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE LA CIUDAD DE MÉXICO COORDINACIÓN ACADÉMICA

### RESTRICCIONES DE USO PARA LAS TESIS DIGITALES

### DERECHOS RESERVADOS ©

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

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

## **INTEGRACIÓN DEL JURADO**

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

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

**Vocal:** Dra. Abigail Betanzos Fernández, IPN

**1° Suplente:**

**2° Suplente:**

**PLANTEL DEL VALLE, UACM**

**Directora**

---

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

**Codirectora**

---

Dra. Abigail Betanzos Fernández  
Centro de Investigación y de Estudios avanzados del IPN

**LECTORES DE TESIS**

**Dra. Lilia López Cánovas**

Posgrado en Ciencias Genómicas  
Universidad Autónoma de la Ciudad de México

**Dr. Mario César López Camarillo**

Posgrado en Ciencias Genómicas  
Universidad Autónoma de la Ciudad de México

**Dr. Eduardo Carrillo Tapia**

Academia de Biología  
Universidad Autónoma de la Ciudad de México

Este trabajo fue realizado en el laboratorio 2 del Posgrado en Ciencias Genómicas de la UACM, plantel del Valle bajo la dirección de la Dra. Elisa Irene Azuara Liceaga en colaboración con la Dra. Abigail Betanzos Fernández del Cinvestav-IPN y el Dr. Alfonso Olivos García del Hospital General en el Área de Investigación de la UNAM en el Departamento de Patología y gracias al apoyo financiero proporcionado por la UACM para el proyecto: Estudio de los cuerpos nucleares APBs relacionados con el mantenimiento telomérico de los cromosomas de las amibas y sus repercusiones biológicas (PI-CCyT-2019-02) otorgado a la Dra. Elisa Irene Azuara Liceaga.

## **AGRADECIMIENTOS**

A la Dra. Elisa, por permitirme formar parte de su equipo de laboratorio, por su atención, apoyo y paciencia que siempre me brindo durante el avance de mi proyecto.

A la Dra. Abigail, por su apoyo, disposición y asesoría que tuvo conmigo en todo momento.

Al Dr. César, por sus observaciones constructivas y haber contribuido a mi proyecto con la donación del anticuerpo  $\alpha$ -MRE11.

A la Dra. Jacqueline, por compartir su conocimiento, asesoría y su tiempo para grandes platicas.

Al Dr. Alfonso, por su entusiasmo, colaboración y asesoría en la última etapa de mi proyecto.

.A mi comité tutorial por sus comentarios y observaciones que enriquecieron mi proyecto.

A mis amigos de maestría Allan, Carla, Fabricio, Toño y Vía por todos los momentos que pasamos donde tuvimos un poco de todo, lo que ayudo a fortalecer nuestra amistad. Les deseo mucho éxito.

A mis compañeros de cada laboratorio

## **DEDICATORIA**

En memoria de mi padre Roberto, sé que estarías orgulloso.

## ÍNDICE

1.	RESUMEN.....	19
2.	ABSTRACT .....	20
3.	INTRODUCCIÓN.....	21
3.1	Telómeros.....	21
3.2	Complejo <i>Shelterin</i> .....	22
3.2.1	Proteínas asociadas al complejo <i>Shelterin</i> .....	26
3.3	Mecanismos de mantenimiento telomérico.....	28
3.3.1	Telomerasa.....	28
3.3.2	Alargamiento Alternativo de los Telómeros (Vía ALT) .....	30
3.3.2.1	Características de las células que presentan la vía ALT.....	30
3.3.3.1	Cuerpos de Leucemia Promielocítica asociada a ALT (APB).....	34
3.3.3.2	SUMOilación.....	36
3.4	Complejo MRN (MRE11-Rad50-NBS1).....	37
3.4.1	MRE11 en <i>Homo sapiens</i> .....	40
3.5	Complejo MRN en otras especies.....	42
3.6	Uso del inhibidor VE-821 para estudiar la vía ALT.....	44
3.8	<i>Entamoeba histolytica</i> .....	47
3.8.1	Ciclo de vida de <i>E. histolytica</i> .....	47
3.8.2	Genoma de <i>E. histolytica</i> .....	50
3.8.3	Organización cromosómica de <i>E. histolytica</i> .....	51
3.9	Antecedentes particulares.....	53
3.9.1	Proteínas EhTRF-like de <i>E. histolytica</i> .....	53
3.9.2	MRE11 en <i>E. histolytica</i> .....	58

4.	HIPÓTESIS .....	66
5.	JUSTIFICACIÓN.....	66
6.	OBJETIVOS.....	67
6.1	Objetivo General.....	67
6.2	Objetivos Particulares .....	67
7.	ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.....	68
8.	MATERIALES Y MÉTODOS .....	70
8.1	Análisis bioinformático de la proteína EhMRE11 .....	70
8.2	Búsqueda bioinformática de proteínas homólogas de la vía ALT en <i>E. histolytica</i> .....	70
8.3	Cultivo de trofozoitos de <i>E. histolytica</i> .....	70
8.4	Obtención de extractos totales de los trofozoítos de <i>E. histolytica</i> .....	71
8.5	Obtención de extractos citoplasmáticos y nucleares solubles e insolubles .....	71
8.6	Cuantificación de proteínas .....	72
8.7	SDS-PAGE.....	72
8.8	Transferencia de las proteínas separadas por SDS-PAGE a membranas de nitrocelulosa .....	72
8.9	Ensayos de inmunolocalización de la proteína EhMRE11, con EhTRF-like I y EhTRF-like III.....	73
8.10	Ensayos con el inhibidor VE-821 .....	74
8.10.1	Cultivo de la línea celular Saos-2 y HeLa.....	74
8.10.2	Determinación de la IC <sub>50</sub> del inhibidor VE-821 en líneas tumorales Saos-2 y HeLa 74	
8.10.3	Determinación de la IC <sub>50</sub> del inhibidor VE-821 en los trofozoitos de <i>E. histolytica</i> . 75	
8.10.4	Ensayos de microscopia confocal en trofozoítos de <i>E. histolytica</i> .....	75

8.11 Ensayos de inmunoprecipitación para identificar la interacción entre las proteínas EhMRE11 y EhTRF-like III.....	76
9. RESULTADOS .....	77
9.1 Análisis <i>in silico</i> de la proteína EhMRE11 y EhMRE11-like en <i>E. histolytica</i> .....	77
9.2 Búsqueda <i>in silico</i> de las proteínas homólogas de la vía ALT en <i>E. histolytica</i> . .....	80
9.3 Determinar la expresión y localización de EhMRE11 en trofozoítos de <i>E. histolytica</i> ..	94
9.4 Co-localización de las proteínas EhMRE11, EhTRF-like I y EhTRF-like III en <i>foci</i> nucleares en <i>E. histolytica</i> .....	101
9.5 Efecto del inhibidor VE-821 sobre la viabilidad celular y la co-localización de EhMRE11, EhTRF-like I y EhTRF-like III en <i>E. histolytica</i> . .....	102
10. DISCUSIÓN.....	112
11. CONCLUSIONES.....	119
12. BIBLIOGRAFÍA .....	120

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Proteínas que interaccionan con TRF1 y TRF2 .....	<b>25</b>
<b>Tabla 2.</b> Proteínas de los cuerpos APB involucrados en la vía ALT .....	<b>35</b>
<b>Tabla 3.</b> Líneas celulares y su mantenimiento telomérico.....	<b>45</b>
<b>Tabla 4.</b> Proteínas de la vía ALT identificadas en <i>E. histolytica</i> .....	<b>58</b>
<b>Tabla 5.</b> Genes relacionados con la epistasis RAD52 y recombinación homóloga en <i>E. histolytica</i> , <i>H. sapiens</i> y <i>S. cerevisiae</i> .....	<b>59</b>
<b>Tabla 6.</b> Proteínas y nucleótidos de genes involucrados en HR de <i>E. invadens</i> y <i>E. histolytica</i> . .....	<b>62</b>
<b>Tabla 7.</b> Proteínas involucradas en la recombinación homóloga identificadas en parásitos protozoarios .....	<b>64</b>
<b>Tabla 8.</b> Proteínas involucradas en la vía ALT identificadas en <i>E. histolytica</i> .....	<b>81</b>
<b>Tabla 9.</b> Dominios funcionales presentes en la proteína de la vía ALT identificadas en <i>E. histolytica</i> .....	<b>89</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Representación estructural de los telómeros.....	<b>21</b>
<b>Figura 2.</b> Complejo <i>Shelterin</i> .....	<b>23</b>
<b>Figura 3.</b> Proteínas que interaccionan con el complejo <i>Shelterin</i> .....	<b>27</b>
<b>Figura 4.</b> Mecanismo de acción de la telomerasa durante el mantenimiento telomérico.....	<b>29</b>
<b>Figura 5.</b> Mecanismo de acción de la vía ALT.....	<b>30</b>
<b>Figura 6.</b> Mecanismos de recombinación en las células ALT.....	<b>33</b>
<b>Figura 7.</b> Componentes proteicos de los cuerpos APB.....	<b>36</b>
<b>Figura 8.</b> Estructura del complejo MRN (MRE11-Rad50-NBS1).....	<b>39</b>
<b>Figura 9.</b> Estructura de la proteína MRE11.....	<b>41</b>
<b>Figura 10.</b> Alineamiento del dominio N-terminal de las proteínas MRE11 de diferentes organismos.....	<b>43</b>
<b>Figura 11.</b> Estructura química del inhibidor VE-821.....	<b>44</b>
<b>Figura 12.</b> Mecanismo de acción del inhibidor VE-821.....	<b>46</b>
<b>Figura 13.</b> Ciclo de vida de <i>E. histolytica</i> .....	<b>49</b>
<b>Figura 14.</b> Diferencias intraespecíficas en la organización de los STR en los arreglos del tRNAs de <i>E. histolytica</i> .....	<b>51</b>
<b>Figura 15.</b> Microscopia de fluorescencia de las diversas etapas de <i>E. histolytica</i> .....	<b>52</b>
<b>Figura 16.</b> Estructura de las proteínas TRF de <i>H. sapiens</i> (Hs) y <i>E. histolytica</i> (Eh).....	<b>54</b>
<b>Figura 17.</b> Colocalización de EhTRF-like I y EhTRF-like III con lámina B1.....	<b>55</b>
<b>Figura 18.</b> Localización de la proteína EhTRF-like III en el núcleo de trofozoítos de <i>E. histolytica</i> .....	<b>56</b>
<b>Figura 19.</b> Interactoma de la proteína EhTRF-like I.....	<b>57</b>
<b>Figura 20.</b> Expresión de genes relacionados con el grupo de epistásis de RAD52 en <i>E. histolytica</i> .....	<b>60</b>
<b>Figura 21.</b> Expresión de genes de recombinación homóloga en <i>E. histolytica</i> .....	<b>63</b>
<b>Figura 22.</b> Alineamiento de proteínas MRE11 de <i>E. histolytica</i> y MRE11 y <i>H. sapiens</i> .....	<b>78</b>
<b>Figura 23.</b> Proteínas MRE11 de <i>E. histolytica</i> y <i>H. sapiens</i> .....	<b>79</b>
<b>Figura 24.</b> Inmunodetección de la proteína EhMRE11 y EhMRE11-like en <i>E. histolytica</i> .....	<b>96</b>
<b>Figura 25.</b> Localización de la proteína EhMRE11 en los trofozoítos de <i>E. histolytica</i> .....	<b>98</b>

**Figura 26.** Colocalización de EhMRE11 y EhRAD50 en trofozoítos de *E. histolytica*. ..... **100**

**Figura 27.** Colocalización de las proteínas EhMRE11, EhTRF-like I y EhTRF-like III. .... **101**

**Figura 28.** Efecto del inhibidor VE-821 en la viabilidad celular de las líneas celulares HeLA y Saos-2 y en trofozoítos de *Entamoeba histolytica*. ..... **103**

**Figura 29.** Efecto del inhibidor VE-821 en los trofozoítos de *E. histolytica*. ..... **104**

**Figura 30.** Co-localización de EhMRE11, EhTRF-like I y EhTRF-like III en trofozoítos de *E. histolytica*. ..... **106**

**Figura 31.** Efecto del inhibidor VE-821 a una concentración de 5  $\mu$ M en la co-localización de las proteínas EhMRE11, EhTRF-like I y III en trofozoítos de *E. histolytica*. ..... **107**

**Figura 32.** Efecto del inhibidor VE-821 a una concentración de 9.7  $\mu$ M en la co-localización de las proteínas EhMRE11, EhTRF-like I y III en los trofozoítos de *E. histolytica*. ..... **108**

**Figura 33.** Efecto del inhibidor VE-821 en la co-localización de la proteína EhMRE11, EhTRF-like I y III en los trofozoítos de *E. histolytica*. ..... **109**

**Figura 34.** Cuantificación de la localización nuclear de EhMRE11 en trofozoítos de *E. histolytica*. ..... **110**

**Figura 35.** Interacción de EhMRE11 con EhTRF-like III en *E. histolytica*. ..... **111**

**Figura 36.** Modelo propuesto de los cuerpos APB en *E. histolytica*. ..... **118**

## ABREVIATURAS

<b>AKT</b>	Proteína quinasa B (PKB), del inglés serine/threonine-specific protein kinase
<b>ALT</b>	Vía de Alargamiento alternativo de los telómeros, del inglés Alternative lengthening of telomeres
<b>APBs</b>	Cuerpos asociados a la vía Alternativa de Mantenimiento Telomérico, del inglés ALT- associated bodies.
<b>ATM</b>	Proteína Ataxia Telangiectasia Mutada, del inglés protein kinase ataxia-telangiectasia mutated
<b>ATP</b>	Adenosín trifosfato
<b>ATR</b>	Proteína relacionada Ataxia Telangiectasia Mutada y Rad3, del inglés Ataxia Telangiectasia and Rad3 related
<b>BLM</b>	Proteína del Síndrome de Bloom, del inglés Bloom Syndrome Protein
<b>BSA</b>	Albumina Bovina Serica, del inglés Bovine Serum Albumin
<b>BRCA1</b>	Proteína de susceptibilidad a cancer de mama tipo 1, del inglés Brast cancer type 1 susceptibility protein
<b>BRIP1</b>	Proteína del grupo J de anemia de Fanconi, del inglés Fanconi anemia group J protein
°C	Grados Celsius
<b>CBX1</b>	Homólogo 1 de la proteína Chromobox, del inglés Chromobox protein homolog 1
<b>CBX3</b>	Homólogo 3 de la proteína Chromobox, del inglés Chromobox protein homolog 3
<b>CBX5</b>	Homólogo 5 de la proteína Chromobox, del inglés Chromobox protein homolog 5
<b>CDC37</b>	Hsp90 co-chaperona Cdc37, del inglés Hsp90 co-chaperone Cdc37
<b>CDK2</b>	Cinasa 2 dependiente de ciclina, del inglés Cyclin-dependent kinase 2

<b>CDKN1A</b>	Inhibidor de la cinasa dependiente de ciclina 1, del inglés Cyclin-dependent kinase inhibitor 1
<b>CK2</b>	Caseína quinasa 2, del inglés Casein kinase 2
<b>DAPI</b>	4', 6-diamino-2-fenilindol
<b>D-MEM</b>	Medio de Eagle modificado de Dulbecco, del inglés Dulbecco's Modified Eagle Medium
<b>DMSO</b>	Dimeltisulfóxido
<b>DNA</b>	Ácido desoxirribonucleico, del inglés Deoxyribonucleic acid
<b>DSB</b>	Roturas de DNA de doble cadena, del inglés Double-Strand DNA Breaks
<b>dsDNA</b>	DNA bicatenario, del inglés recombinant double-stranded DNA
<b>ECTR</b>	DNA de repetición de telómero extracromosómico, del inglés Extrachromosomal telomere repeat
<b>EDTA</b>	Ácido etilendiamino tetra acético, del inglés Ethylenediaminetetraacetic acid
<b>EGTA</b>	Ácido etilendiaminoglicol tetra ácido, del inglés ethylene glycol tetraacetic acid
<b>EhTRF</b>	Proteínas similares a TRFs en <i>E. histolytica</i>
<b>ERCC1</b>	Proteína de reparación por escisión de DNA ERCC-1, del inglés DNA excision repair protein ERCC-1
<b>ERCC4</b>	Endonucleasa de reparación de DNA XPF, del inglés DNA repair endonuclease XPF
<b>FANCA</b>	Proteína del grupo A de anemia de Fanconi, del inglés Fanconi Anemia group A protein
<b>FANCD2</b>	Proteína D2 del grupo de anemia de Fanconi, del inglés Fanconi Anemia group D2 protein
<b>FANCL</b>	Proteína del grupo L de complementación para anemia de Fanconi, del inglés Fanconi Anemia Group L Protein
<b>FEN1</b>	Endonucleasa Flap 1, del inglés Flap endonuclease 1
<b>FITC</b>	Isotiocianato de fluoresceína, del inglés Fluorescein isothiocyanate

<b>H2AFX</b>	Histona H2A de la familia X, del inglés H2A histone family member X
<b>HNRNPA2B1</b>	Ribonucleoproteínas heterogéneas nucleares A2/B1, del inglés Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins A2/B1
<b>h</b>	Hora
<b>HR</b>	Recombinación homóloga, del inglés Homologous recombination
<b>hTER</b>	Componente ribonucleotídico, del inglés Human telomerase RNA
<b>hTERT</b>	Telomerasa transcriptasa inversa, del inglés Telomerase reverse transcriptase
<b>HUS1</b>	Proteína de punto de control HUS1, del inglés Checkpoint protein HUS1
<b>IC<sub>50</sub></b>	Concentración inhibitoria del 50%, del inglés half maximal inhibitory concentration
<b>kDa</b>	Kilodaltones
<b>MDC1</b>	Proteína mediadora del punto de control de daños al DNA 1, del inglés Mediator of DNA Damage Checkpoint 1
<b>mg</b>	Miligramos
<b>min</b>	Minutos
<b>mL</b>	Mililitros
<b>MLX</b>	Proteína Max-like X, del inglés Max-like protein X
<b>mM</b>	Milimolar
<b>MORC3</b>	Proteína 3 del dedo de zinc tipo CW de la familia MORC, del inglés MORC family CW-type zinc finger protein 3
<b>MRE11</b>	Proteína de recombinación meiótica MRE11, del inglés Meiotic Recombination 11
<b>MRN</b>	Complejo MRN (MRE11-Rad50-Nbs1)
<b>MUS81</b>	Proteína sensible a luz ultravioleta de metanosulfonato de metilo, del inglés Methyl methanesulfonate ultraviolet sensitive gene clone 81

<b>μg</b>	Microgramos
<b>μM</b>	Micromolar
<b>μL</b>	Microlitros
<b>NBN/NBS1</b>	Proteína Nibrin
<b>NHEJ</b>	Recombinación no homóloga, del inglés Non Homologous End Joining
<b>NR2F1</b>	Factor de transcripción COUP 1, del inglés COUP Transcription Factor 1
<b>NR2F2</b>	Factor de transcripción COUP 2, del inglés COUP Transcription Factor 2
<b>NRIP1</b>	Proteína que interactúa con el receptor nuclear 1, del inglés Nuclear receptor-interacting protein 1
<b>PARP2</b>	Poli (ADP-ribosa) polimerasa 2, del inglés Poly (ADP-ribose) polymerase 2
<b>PBS</b>	Solución salina amortiguadora de fosfatos, del inglés phosphate buffered saline
<b>PCNA</b>	Antígeno nuclear de células proliferativas, del inglés Proliferating cell nuclear antigen
<b>pH</b>	Potencial de Hidrógeno
<b>PML</b>	Proteína de leucemia promielocítica, del inglés Promyelocytic leukemia protein
<b>POT1</b>	Proteína de protección a telómeros, del inglés Protection of Telomeres Protein-1
<b>PTM</b>	Modificaciones postraduccionales
<b>PSA</b>	Persulfato de amonio
<b>Rad50</b>	Proteína de reparación de DNA Rad50, del inglés DNA repair protein RAD50
<b>RAD51</b>	Proteína de reparación de DNA Rad51, del inglés DNA repair protein RAD51
<b>RAP1</b>	Proteína represora/activadora, del inglés Represor/activador proteín 1

<b>RIF1</b>	Factor 1 que interactúa con Rap1, del inglés Rap1-interacting factor 1
<b>RNA</b>	Ácido ribonucleico, del inglés Ribonucleic acid
<b>RPA</b>	Proteína de replicación A, del inglés Replication protein A
<b>rpm</b>	Revoluciones por minuto
<b>rRNA</b>	Ácido ribonucleico ribosomal
<b>S</b>	Segundos
<b>SDS-PAGE</b>	Geles desnaturalizantes de poliacrilamida, del inglés sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
<b>SMC5</b>	Proteína 5 de mantenimiento estructural de cromosomas, del inglés Structural maintenance of chromosomes protein 5
<b>SMC6</b>	Proteína 6 de mantenimiento estructural de cromosomas, del inglés Structural maintenance of chromosomes protein 6
<b>SP100</b>	Antígeno nuclear Sp100, del inglés Sp100 nuclear antigen
<b>ssDNA</b>	DNA monocatenario, del inglés Single Stranded DNA
<b>STN1</b>	Subunidad del complejo CST, del inglés CST complex subunit STN1
<b>STR</b>	Repeticiones cortas en tándem, del inglés Short Tandem Repeat
<b>SUMO</b>	SUMOilación
<b>TEM</b>	Microscopia electrónica de transmisión, del inglés Transmission Electron Microscopy
<b>TEMED</b>	1,2-Di(dimethylamino)ethane
<b>TEP1</b>	Componente 1 de la proteína telomerasa, del inglés Telomerase protein component 1
<b>TRF1 /TERF1</b>	Factor 1 de unión a repetidos teloméricos, del inglés Telomeric repeat-binding factor 1
<b>TRF2/ TERF2</b>	Factor 2 de unión de repetidos teloméricos, del inglés Telomeric repeat-binding factor 2

<b>TERF2IP/Rap1</b>	Proteína 1 que interactúa con el factor 2 de unión de repetidos teloméricos, del inglés Telomeric repeat-binding factor 2-interacting protein 1
<b>TIN2</b>	Factor nuclear 2 que interacciona con el factor 1 de unión a repetidos teloméricos, del inglés Nuclear factor 2 that interacts with Telomeric repeat-binding factor 1
<b>TMM</b>	Mecanismos de mantenimiento de los telómeros
<b>TOP2A</b>	DNA Topoisomerasa II alfa, del inglés DNA topoisomerase II.alpha
<b>TOP3A</b>	DNA Topoisomerasa III alfa, del inglés DNA Topoisomerasa III alpha
<b>TP53</b>	Antígeno tumoral celular p53, del inglés Cellular tumor antigen p53
<b>TRITC</b>	Tetrametilrodamina, del inglés Tetramethylrhodamine
<b>tRNA</b>	Ácido ribonucleico de transferencia
<b>WRN</b>	Helicasa dependiente de ATP del síndrome de Werner, del inglés Werner syndrome ATP-dependent helicase
<b>XRCC3</b>	Proteína de reparación del DNA XRCC3, del inglés DNA repair protein XRCC3

## 1. RESUMEN

Los telómeros son complejos de nucleoproteínas especializadas que protegen los extremos de los cromosomas lineales de eucariotas de la degradación y de su reconocimiento como daño al DNA. Los telómeros pueden cambiar entre estados cerrados (protegidos) o abiertos (en replicación) durante el ciclo celular. Cada estado se rige por una serie de interacciones con factores específicos que pueden conducir a la célula a división celular, senescencia o apoptosis en condiciones normales o en trastornos como el cáncer. Dentro de estos factores se encuentra el complejo MRN (MRE11-RAD50-NBS1) el cual se localiza en los telómeros durante las fases S y G2 del ciclo celular. Este complejo interactúa directamente con proteínas de unión a los repetidos teloméricos (TRF's) contribuyendo a la formación de la hebra líder rica en G. Así mismo, se ha encontrado que el complejo MRN es necesario para el alargamiento de los telómeros mediado por la vía Alternativa de Mantenimiento Telomérico (vía ALT). La vía ALT se encuentra presente en células deficientes de telomerasa y dependiente de la recombinación homóloga. En células donde la vía ALT se encuentra activa, se ha detectado al complejo MRN en los cuerpos APB, los cuales son agregados nucleares de proteínas, DNA telomérico y cromatina. Diversos estudios en *Entamoeba histolytica* han demostrado la expresión de genes involucrados en la HR como *mre11*. Además, este parásito se caracteriza por la ausencia de la enzima telomerasa dentro de su genoma; sin embargo, se han encontrado genes que codifican para tres proteínas similares a las TRF's de *Homo sapiens*, como EhTRF-like I, EhTRF-like II y EhTRF-like III. Por lo tanto, en este trabajo se estudió la presencia de la vía ALT en el protozooario *E. histolytica*, mediante el estudio de la expresión y localización de la proteína MRE11 involucrada en la HR. Mediante un análisis *in silico* se identificaron 51 de los 59 genes descritos para la vía ALT en este parásito. Así mismo, por medio de microscopia confocal se evidenció la co-localización de la proteína EhMRE11 con las proteínas EhTRF-like I y EhTRF-like III, confirmando su presencia en regiones nucleares que podrían corresponder a posibles cuerpos APB. La sensibilidad al inhibidor VE-821 se ha empleado para estudiar la vía ALT, es por ello que en este trabajo se determinó la IC<sub>50</sub> para *E. histolytica*, la cual fue 9.7 µM en contraste con 0.5 µM de la línea celular Saos-2 (vía ALT positiva) y 6.5 µM en células HeLa (vía ALT negativa). Finalmente, se analizó el efecto del inhibidor específico de ATR, VE-821 en trofozoítos de *E. histolytica* y en la co-localización de las EhMRE11 con EhTRF-like I y EhTRF-like III. Nuestros resultados sugieren que el mantenimiento telomérico de este parásito podría llevarse a cabo mediante la vía ALT.

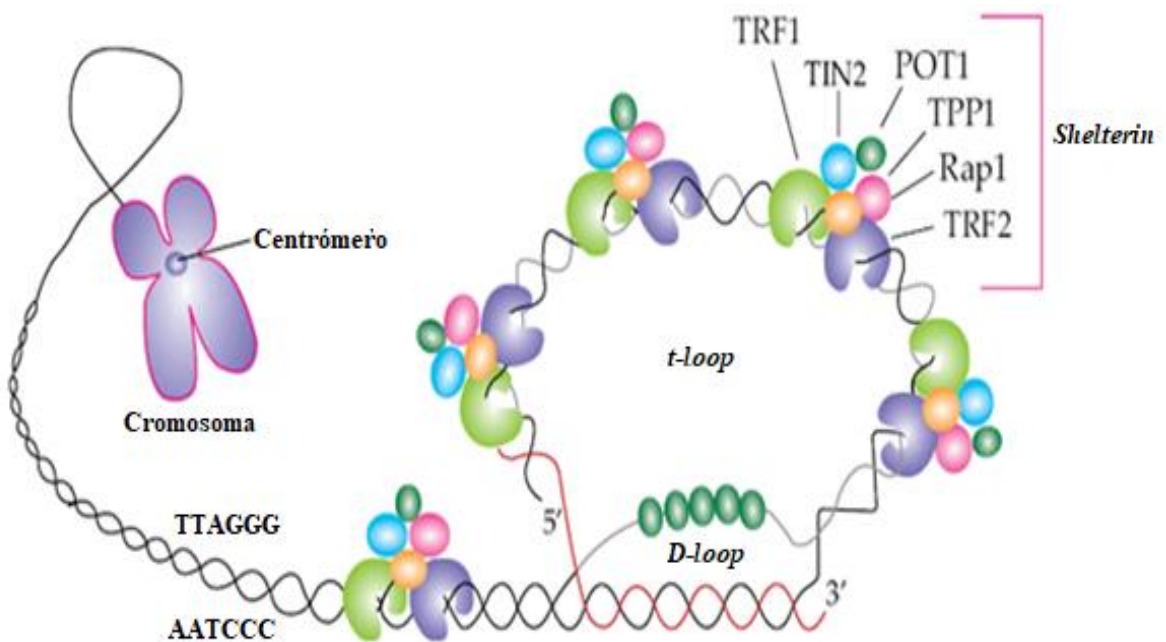
## 2. ABSTRACT

Telomeres are specialized nucleoprotein complexes that protect the ends of linear eukaryotic chromosomes from degradation and their recognition as DNA damage. Telomeres can change between closed (protected) or open (in replication) states during the cell cycle. Each state is governed by a series of interactions with specific factors and can lead the cell to cell division or senescence, apoptosis under normal conditions or disorders such as cancer. One of these factors is the MRN complex (MRE11-RAD50-NBS1) which is located in the telomeres during the S and G2 phase of the cell cycle through direct interaction with Telomere repeat binding factor (TRFs proteins), contributing to the formation of the leader strand rich in G. The ALT pathway is present in telomerase deficient cells in which maintenance of telomeres is dependent on homologous recombination. In cells with ALT pathway, the MRN complex has been detected in the APB bodies, which are nuclear aggregates of proteins, telomeric DNA and chromatin. Several studies in *Entamoeba histolytica* have demonstrated the expression of genes involved in HR (MRE11, among others). In addition this parasite is characterized by the absence of the enzyme telomerase within its genome, however interestingly genes encoding for three proteins similar to *Homo sapiens* TRF's have been found, dubbed as EhTRF-like I, II and III. Therefore, in this work we studied the presence of the ALT pathway through the MRE11 protein. Initially we performed an *in silico* survey to search for the genes involved in the ALT pathway, in this parasite we identified 51 of the 59 that have been described for *H. sapiens*. The subcellular colocalization of the EhMRE11 protein with EhTRF-like I and EhTRF-like III was evidenced by confocal microscopy, confirming its presence in nuclear regions that could correspond to possible APB bodies. The sensitivity to the VE-821 inhibitor has been used to study the ALT pathway, in this work the IC50 for *E. histolytica* was determined obtaining 9.7  $\mu\text{M}$  in contrast to 0.5  $\mu\text{M}$  of the Saos-2 cell line ( positive ALT pathway) and 6.5  $\mu\text{M}$  in HeLa cells (negative ALT pathway). Finally, we analyzed the effect of the specific inhibitor of ATR, VE-821 in the trophozoites of *E. histolytica* and in the colocalization of the EhMRE11, EhTRF-like I and EhTRF-like III proteins. Our results suggest that telomeric maintenance of this parasite could be carried out through the ALT pathway.

### 3. INTRODUCCIÓN

#### 3.1 Telómeros

Los telómeros son estructuras conformadas por nucleoproteínas, localizadas en los extremos de los cromosomas lineales de las células eucariotas (Lee, M., *et al.*, 2018). El DNA de los telómeros es repetitivo y contiene una cadena rica en guanina denominada “G” (en humanos 5´-TTAGGG-3´) y una hebra complementaria llamada cadena “C”, rica en citosinas. El extremo 3´ de la hebra G se extiende para formar una estructura monocatenaria llamada extremo G, la cual invade e hibrida con la hebra C proximal, para formar una estructura especial llamada *t-loop* (Fig. 1). Es por ello que los cromosomas terminan en DNA satélite monocatenario, el cual sirve como sitio de unión al complejo proteico denominado *Shelterin* formado por las proteínas TRF1, TRF2, TIN2, TPP1, POT1 y RAP1, que actúan en conjunto para garantizar la protección del extremo cromosómico (Oganesian, L., *et al.*, 2009).



**Figura 1. Representación estructural de los telómeros.** Los telómeros están compuestos por una región bicatenaria de repeticiones TTAGGG y por una región monocatenaria rica en G. Las proteínas TRF1 y TRF2 del complejo *Shelterin* interactúan directamente con la región bicatenaria. La proyección rica en G puede plegarse sobre sí misma e invade la región bicatenaria formando la estructura de *t-loop* y *D-loop* (Tomado de Lange, T., *et al.*, 2005)

Los telómeros representan estructuras esenciales para las células ya que evitan la fusión cromosómica, mantienen la estabilidad cromosómica y participan tanto en la meiosis como en la mitosis. Sin embargo, su función más notoria es la de servir como un reloj mitótico que mide y regula el número de las divisiones celulares (Hernández, R., 1999).

Los telómeros se acortan en cada división celular antes de alcanzar un estado de senescencia replicativa, llamado límite de *Hayflick*, en el que la célula ya no puede dividirse (Coluzzi, E., *et al.*, 2018). La estructura de *t-loop* probablemente se abre con la bifurcación durante la replicación. Se ha sugerido que los telómeros de mamíferos se replican tardíamente en la fase S, pero la resolución del *t-loop* no parece desencadenar una respuesta de daño al DNA. En la fase S, la respuesta al daño del DNA acoplado a p53 se atenúa, sugiriendo que la reparación depende de la señalización ATR. Esto ofrece una explicación de por qué las células no se detienen, debido a la exposición de los telómeros después de la resolución del *t-loop*. Los telómeros son muy dinámicos durante el ciclo celular, ya que la unión de las proteínas teloméricas cambia a medida que avanza el ciclo; por ejemplo, durante la fase G2 se observa una pérdida de la proteína POT1, sugiriendo un cambio en la estructura de los telómeros (Verdun, R., *et al.*, 2005).

La función de los telómeros no solo se mantiene mediante una longitud mínima de telómeros, sino también mediante una modificación de histonas, que definen la estructura telomérica heterocromática. Comúnmente, los telómeros se asocian con marcas de modificación de histonas represivas características, como H3K9me3 y H4K30me, y con proteínas específicas, incluida la proteína HP1, la cual recluta a la cromatina por su afinidad a H3K9me3. Esto lo indica que los telómeros se ensamblan en dominios de heterocromatina que son regiones de cromatina condensadas donde se tiene un bajo contenido de genes (Coluzzi, E., *et al.*, 2018).

### **3.2 Complejo *Shelterin***

Las proteínas teloméricas se organizan en un complejo de orden superior conocido como complejo *Shelterin*. Este complejo tiene una gran especificidad para asociarse a los repetidos teloméricos TTAGGG, así como un papel crucial en la formación de la estructura telomérica y en el bloqueo de proteínas que pueden dañar a los telómeros. Sin embargo, cualquier alteración en la estructura y función las proteínas que conforman el complejo *Shelterin* puede conducir a



TRF1 (**Factor 1 de unión a repetidos teloméricos, del inglés Telomeric repeat-binding factor 1**). Es una proteína de aproximadamente 50 kDa, tiene un extremo N-terminal que contiene una región ácida, un dominio de homodimerización denominado TRFH y un dominio de unión a DNA (DBD) MYB en su extremo C-terminal, que se une a la secuencia telomérica 5'-TTAGGG-3' (De Lange, T., *et al.*, 2005). La proteína TRF1 es uno de los componentes más importantes del complejo *Shelterin*, se expresa de manera constitutiva en los telómeros a lo largo del ciclo celular y está relacionada con el proto-oncogen *myb* (Walker, J., *et al.*, 2012). Esta proteína regula negativamente la extensión de los telómeros dependiente de la telomerasa, debido a que restringe el acceso de la enzima al extremo telomérico. Además, previene la activación de las cinasas ATM y ATR. TRF1 puede presentar modificaciones postraduccionales, como, PARsilaciones mediadas por las tanquirasas 1 y 2, ubiquitinaciones, SUMOilaciones por la proteína MMS21 y fosforilaciones mediadas por AKT, ATM, CK2 (De Lange, T., *et al.*, 2005; Walker, J., *et al.*, 2012).

Por otra parte, la proteína TRF2 (**Factor 2 de unión de repetidos teloméricos, del inglés Telomeric repeat-binding factor 2**) tiene un peso molecular de 59kDa, contiene un dominio de homodimerización (TRFH), una región N-terminal rica en aminoácidos básicos y un dominio de unión a DNA (MYB) en su extremo C-terminal (Xin, H., *et al.*, 2008). TRF2 es mejor conocida por su papel en la regulación de la formación y estabilización de la estructura de *t-loop* (Xin, H., *et al.*, 2008). La eliminación de esta proteína da como resultado la pérdida de los salientes de los telómeros (De Lange, T., *et al.*, 2005) y se ha visto que su sobreexpresión promueve la recombinación del DNA en los telómeros, lo que resulta en la inducción de la eliminación rápida de los telómeros y la formación de círculos de telómeros (Walker, J., *et al.*, 2012). Así mismo se ha encontrado que TRF2 inhibe la unión de la proteína ATM y reprime la respuesta de daño del DNA. Al igual que TRF1, TRF2 presenta modificaciones postraduccionales como fosforilaciones y SUMOilaciones, mediadas por Chk2 y MMS21 respectivamente (De Lange, T., *et al.*, 2005; Walker, J., *et al.*, 2012).

Tanto TRF1 y TRF2 pueden ser SUMOilados por la proteína MMS21, un componente del complejo SMC5/6, que participa en la reparación y recombinación del DNA. Se ha reportado que en células que carecen de telomerasa, esta modificación postraduccionales es importante para el mantenimiento de los telómeros mediante un mecanismo alternativo denominado vía ALT,

ya que ayuda a promover el reclutamiento de los telómeros a cuerpos APB y promueve el alargamiento de los telómeros mediante recombinación homóloga (Xin, H., *et al.*, 2008; Walker, J., *et al.*, 2012)

**Tabla 1. Proteínas que interaccionan con TRF1 y TRF2 (Tomado de Ábhyankar, M., *et al.*, 2008)**

<b>Proteínas</b>	<b>Actividad</b>	<b>Proteínas</b>	<b>Actividad</b>
<b>Unión a TRF1</b>		<b>Unión a TRF2</b>	
Tankirasa 1, 2	PARsilación: Protección y resolución de reacciones de cohesión.	Apollo	Procesamiento de los extremos cohesivos.
PINX1	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 de la longitud del telómero.	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.
	<b>Otros</b>	<b>Actividad Recombinante</b>	
ATR	Desplazamiento de Pot1 y TTP1	XRC/RAD51/RTEL1	Mantenimiento de telómeros, puede inducir la delección rápida (TRD).

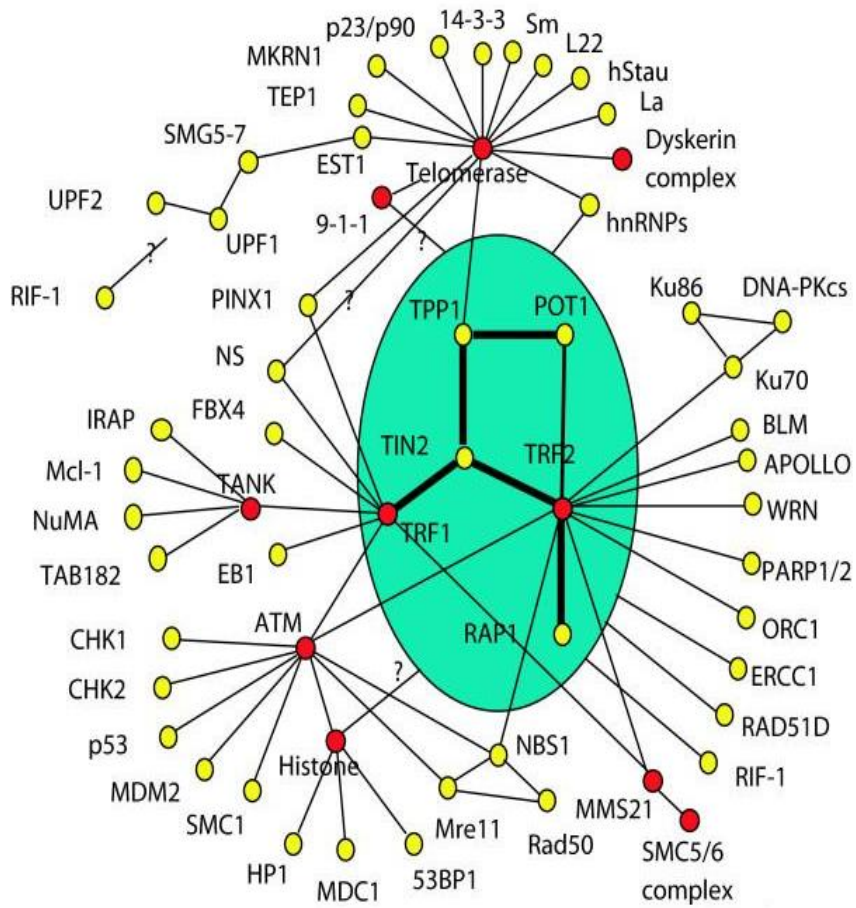
Así mismo TRF1 y TRF2 parecen ser parte del mecanismo que evita que se genere una respuesta de daño al DNA. TRF1 puede ser fosforilada por ATM (Ataxia Telangiectasia Mutada), lo cual conduce a la alteración de la capacidad de TRF1 para interactuar con el DNA. Así mismo, el complejo MRN, que funciona junto con ATM, también es importante para la regulación de la actividad de TRF1. La proteína TRF2 además recluta una gran variedad de proteínas involucradas en la respuesta al daño del DNA, como las nucleasas ERCC1/XPF, el complejo MRN y las helicasas BLM (*Bloom syndrome RecQ helicase-like*) y WRN (*Wern syndrome RecQ helicase-like*) (Tabla 1). El reclutamiento de estas proteínas evita que los extremos de los telómeros sean reconocidos como roturas del DNA por lo tanto las fusiones cromosómicas (Xin, H., *et al.*, 2008).

### 3.2.1 Proteínas asociadas al complejo *Shelterin*

Además de todas las proteínas descritas anteriormente, este complejo necesita de la interacción transitoria con una serie de factores para ejercer su papel sobre la función telomérica (Fig. 3) (de Lange, T., 2005). Las poli (ADP)- ribosa polimerasas, tankirasas 1 y 2, se unen a TRF1, a través de su dominio N-terminal, provocando una disminución de la afinidad de TRF1 por el DNA telomérico y su posterior degradación, induciendo así la elongación del telómero (Cook. B., *et al.*, 2002).

Otras proteínas se encuentran asociadas a la proteína TRF2 y, generalmente, están relacionados con los sistemas de reparación del DNA, o bien con el proceso de replicación. El complejo MRN, formado por MRE11, Rad50 y NBS1, tiene un papel esencial en la activación de la ruta ATM en respuesta a cierto tipo de daño en el DNA, y también contribuye a la formación del extremo 3' de los telómeros (Deng, Y., *et al.*, 2009). Se ha descrito que mutaciones en alguno de los componentes de este complejo generan una disfunción telomérica debido a la eliminación de TRF2.

Las proteínas WRN, BLM, y la endonucleasa FEN1, también interaccionan con TRF2. Estas proteínas se encuentran implicadas en el procesamiento de los telómeros durante la fase S del ciclo celular, y una disminución de su actividad provoca la replicación incompleta de los telómeros (Opresko, P., *et al.*, 2002; Saharia, A., *et al.*, 2010).



**Figura 3. Proteínas que interactúan con el complejo *Shelterin*.** Este diagrama representa la mayoría de las interacciones proteína-proteína conocidas con el complejo *Shelterin*. Dentro del círculo verde se encuentran las proteínas que forman el complejo. Las líneas indican interacciones proteína-proteína, los puntos rojos indican centros proteicos y los puntos amarillos indican nodos (Tomado de Xin, H., *et al.*, 2008).

### 3.3 Mecanismos de mantenimiento telomérico

Algunas células (células germinales, células madre y células cancerosas) pueden evitar los mecanismos de activación progresiva del acortamiento telomérico, siendo capaces de mantener la longitud de sus telómeros. Estos procesos son conocidos como "mecanismos de mantenimiento de los telómeros" (TMM) (Vitis, M., *et al.*, 2018).

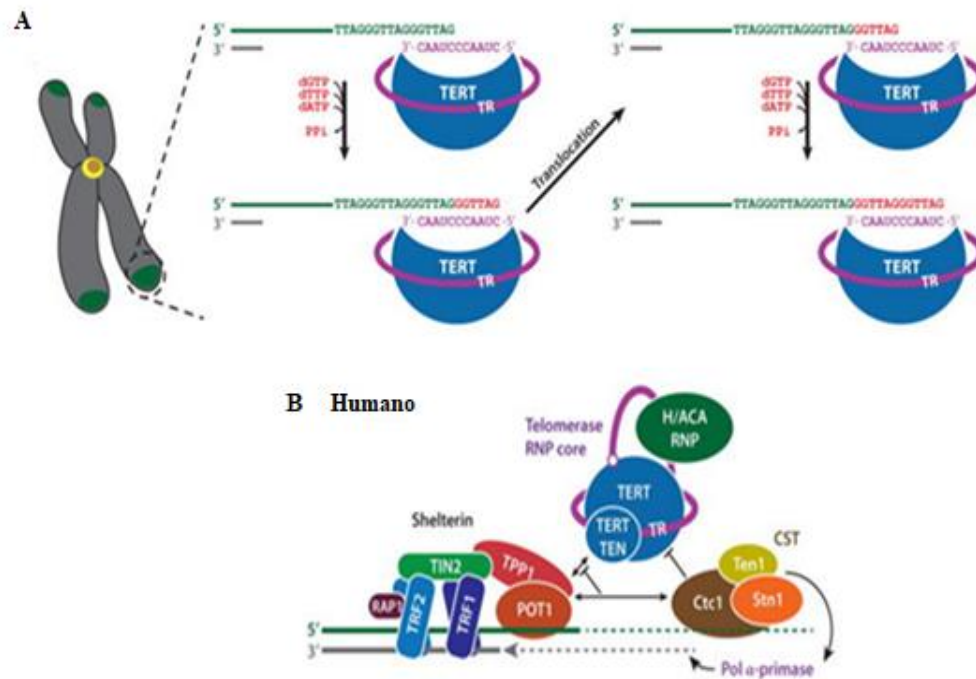
#### 3.3.1 Telomerasa

La telomerasa es una enzima formada por un complejo proteína-ácido ribonucleico, con actividad transcriptasa reversa, que se encarga del mantenimiento de la longitud de los telómeros por adición de repeticiones de la secuencia telomérica TTAGGG en los extremos de los cromosomas (Lee, M., *et al.*, 2018). Se expresa principalmente y es activa en células germinales, pero no en células somáticas. La expresión de la telomerasa en células somáticas puede conducir a inmortalidad celular y eventualmente a cáncer (Dey, A., y Chakrabarti, K., 2018).

La telomerasa está formada por una subunidad catalítica denominada hTERT (*telomerasa reverse transcriptase*), un componente RNA conocido como hTER (*human telomerase RNA*) y una serie de proteínas específicas accesorias requeridas para su correcto funcionamiento (Zhang, Q., *et al.*, 2011). hTER actúa como molde para la adición de la secuencia TTAGGG, en el extremo 3' del DNA telomérico. Su transcripción por la RNA polimerasa II, y su posterior procesamiento, genera un transcrito de 451 nucleótidos, en los que se encuentra una secuencia 5'-CUAACCCUAAC-3' que codifica para las repeticiones teloméricas (Zhang, Q., *et al.*, 2011) (Fig. 4). Esta ribonucleoproteína también se regula de forma dependiente del ciclo celular, con la ayuda de dos helicasas dependientes de ATP, pontina y reptina. Ambas se asocian con hTERT, reduciendo así la actividad catalítica de la enzima (Venteicher, A., *et al.*, 2008).

Las proteínas TRF1 y TRF2 pueden restringir la función de la telomerasa, actuando directamente sobre el alargamiento de los telómeros. Además, POT1 posee un dominio de unión telomérico en su extremo N-terminal, el cual puede ocasionar una inhibición en cis de la telomerasa (Diotti, F., *et al.*, 2011). El complejo *Shelterin* también reprime las respuestas al daño del DNA; el agotamiento o la pérdida de la función de sus componentes, conduce a la

activación de las respuestas, ATM o ATR, la detención del ciclo celular y la inestabilidad cromosómica (Diotti, F., *et al.*, 2011).

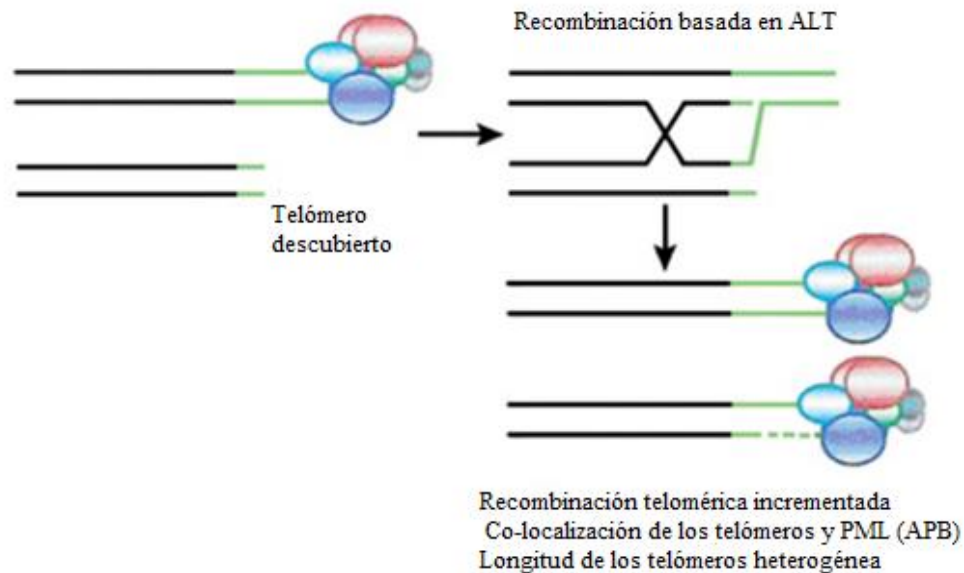


**Figura 4. Mecanismo de acción de la telomerasa durante el mantenimiento telomérico.** (a) La telomerasa utiliza su molde de RNA para la transcripción inversa de repeticiones teloméricas en los extremos 3' de los cromosomas. El extremo 3' del DNA se alinea con el extremo 3' del molde, para permitir la síntesis de la repetición de los telómeros. Después de la síntesis de una repetición (GGTTAG en humanos), para que se inicie una nueva adición de nucleótidos, se da una translocación de la telomerasa. (b) El núcleo RNP de la telomerasa humana (formada por las proteínas TERT, TR, H/ACA scaRNP), es reclutado a los telómeros por el complejo *Shelterin*. La interacción CST con TPP1-POT1 inhibe la actividad de la telomerasa. (Tomado de Chan, H., *et al.*, 2018).

Aproximadamente el 90% de los cánceres humanos consiguen contrarrestar el desgaste gradual de los telómeros, mediante la activación de la enzima telomerasa, el 10% restante utiliza mecanismos de mantenimiento de la longitud telomérica basados en la recombinación homóloga, conocidos como mecanismos ALT (del inglés *Alternative Lengthening of Telomeres*) (Bryan, B., *et al.*, 1997).

### 3.3.2 Alargamiento Alternativo de los Telómeros (Vía ALT)

La vía alternativa de alargamiento de telómeros (ALT) implica la replicación dirigida por recombinación homóloga del DNA telomérico (Fig. 5) (Oganesian, L., *et al.*, 2009). Además, se ha comprobado que esta vía es utilizada por aproximadamente el 10% de los tumores humanos y en mayor proporción por algunos tipos de sarcomas (Royle, N., *et al.*, 2008).



**Figura 5. Mecanismo de acción de la vía ALT.** Se ilustra el complejo *Shelterin* en el telómero (líneas de color verde), el cual cuando queda al descubierto permite la recombinación mediante la vía ALT. En las células que presentan este mecanismo, los telómeros se alargan usando como molde, para la nueva síntesis de DNA, secuencias teloméricas de cromosomas adyacentes. Las células ALT positivas se caracterizan por tener telómeros heterogéneos (Tomado y Modificado de Blasco, M. A. 2007).

#### 3.3.2.1 Características de las células que presentan la vía ALT

La recombinación telomérica como consecuencia de la actividad ALT puede ocurrir en repeticiones variadas dentro de la región telomérica. Las características de las células ALT humanas incluyen **mantenimiento telomérico independiente de telomerasa** y gran **heterogeneidad del tamaño de los telómeros** desde indetectables hasta anormalmente largos,

ya que el TTAGGG dúplex se repite con colas G monocatenarias (Henson, J., *et al.*, 2002). Además de estas características, las células ALT presentan secuencias teloméricas extra cromosómicas detectadas en muchas formas; principalmente como **círculos bicatenarios (ECTR)**, mientras que los **círculos monocatenarios (círculos C o G)** también son abundantes. Por otro lado, el modelo de mantenimiento telomérico que se lleva a cabo por **recombinación homóloga (HR)**, es un mecanismo importante para generar diversidad genética. El elemento central de la HR es el emparejamiento homólogo y el intercambio de cadenas de DNA (Bhattacharya, A., *et al.*, 2013; Oganessian, L., *et al.*, 2009) (Fig. 6).

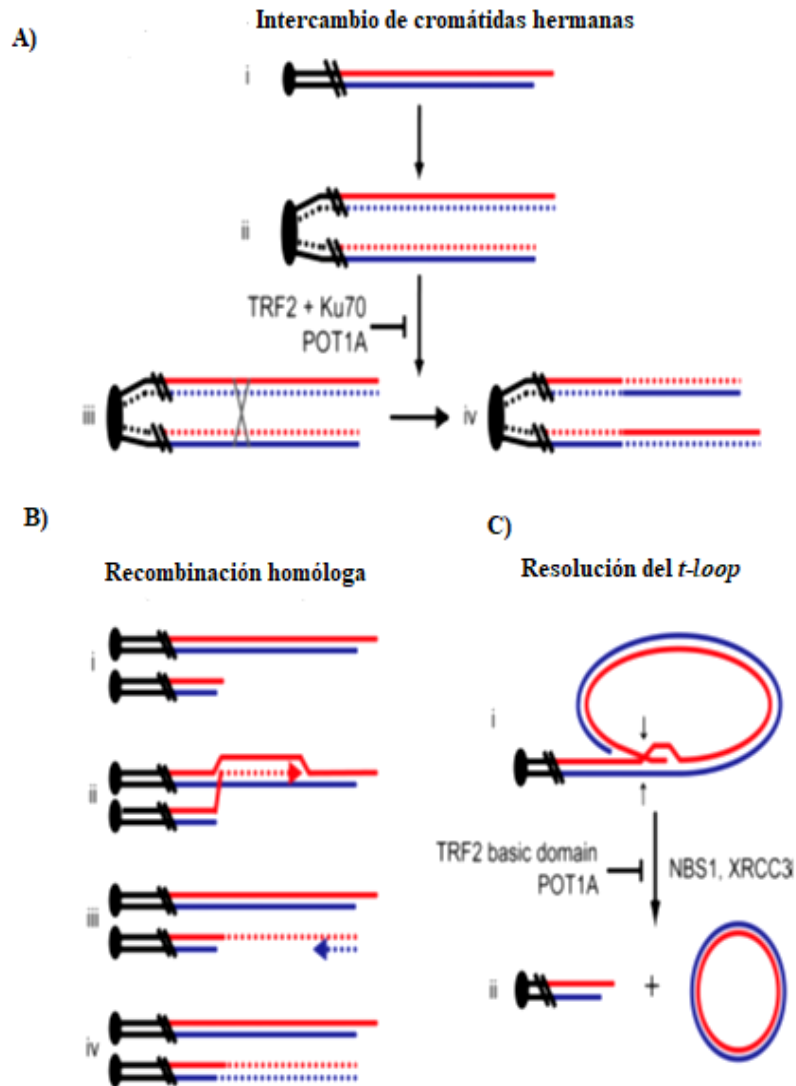
Los círculos ECTR podrían ser el subproducto de la resolución de las uniones del bucle del telómero (*t-loop*), realizada por enzimas de recombinación. Este proceso podría dar como resultado círculos ECTR y telómeros truncados (Arnoult, N., *et al.*, 2009). Aunque en las células ALT, los círculos ECTR se detectan en cantidades significativamente más altas, que en las células normales. En las células humanas, esta reacción depende de los factores de recombinación del síndrome de rotura de Nijmegen 1 (NBS1) y XRCC3, mientras que se suprime por el dominio básico de TRF2 (Nittis, T., *et al.*, 2007). Por otro lado, los círculos monocatenarios (círculos teloméricos que consisten en una cadena rica en C esencialmente completa y cadena rica en G incompleta) parecen estar involucrados de una manera más directa en el mecanismo de la vía ALT. Se ha observado una correlación entre la actividad de ALT y el número de círculos monocatenarios, con una estimación aproximada de 1,000 círculos por célula ALT positiva. Los círculos monocatenarios son posiblemente generados por la degradación nucleolítica de la cadena rica en G de los *t-loop*, una hipótesis que requiere mayor investigación (Boutou, E., *et al.*, 2013).

Otra característica bastante común es la formación de cuerpos nucleares de leucemia promielocítica (PML) asociados a ALT, denominados **cuerpos APB**. Los cuerpos APB son estructuras macromoleculares que se consideran como indicadores de la actividad de la vía ALT, ya que contienen DNA telomérico, telómeros y proteínas de reparación y recombinación de DNA, como el complejo MRN, Mus81 y la vía de sumoilación SMC5 / 6 (Nabetani, A., *et al.*, 2011). Además, otras proteínas que se requieren para la vía ALT, incluyen isoformas de la proteína HP1 de heterocromatina las cuales también forman parte de los cuerpos APB y proteínas del complejo *Shelterin* como TRF1 (telosoma), TRF2 (TERF2), POT1, TIN2 (TINF2)

y RAP1 (Naderlinger, E., *et al.*, 2017). En las células que expresan la vía ALT, TRF1 funciona como mediador positivo de la recombinación homóloga y su pérdida afecta la formación de los cuerpos APB (Florence, R., *et al.*, 2016). Las células somáticas normales tienen niveles sustancialmente más bajos de DNA telomérico extra cromosómico que las células ALT. Por lo tanto, la vía ALT resulta de la pérdida de una función telomérica normal. La identidad de los factores que normalmente reprimen esta vía es desconocida, pero hay algunos indicios que sugieren que las proteínas del complejo *Shelterin* TRF2 y POT1 pueden regular la actividad de otras proteínas que se localizan en los extremos del cromosoma (Palm, W., *et al.*, 2008).

En las células ALT positivas, las proteínas del complejo *Shelterin* se unen no solo al DNA telomérico en los extremos del cromosoma sino también al DNA telomérico extra cromosómico. La cantidad total de DNA telomérico en las células ALT aumenta significativamente, mientras que los niveles totales de TRF2 parecen ser ligeramente más bajos o sin cambios (Cesare, A. J., *et al.*, 2009). Las proteínas MRN, WRN, MUS81, FEN1 y TOP3A interaccionan con TRF2, lo que sugiere que la reducción de la saturación relativa de TRF2 puede limitar el control sobre estas proteínas en los telómeros cromosómicos. Por lo tanto, la reducción y la saturación de la proteína TRF2 en los telómeros podría ser la causa y/o consecuencia de la vía ALT. También se ha sugerido que el estado epigenético de la región sub-telomérica puede controlar la recombinación telomérica (Blasco, M., 2007; Naderlinger, E., *et al.*, 2017).

En las células que dependen de la ruta ALT para el mantenimiento de los telómeros, la pérdida de DNA telomérico debido a la replicación y el procesamiento se contrarresta principalmente después de la replicación a través de eventos de recombinación inter e intramoleculares. Se cree que la alineación de las cromátidas permite la invasión del saliente 3' de una cromátida en la región dúplex de su hermana, que luego podría servir como molde para la copia de telómeros. Si la alineación es asimétrica, la elongación desigual de los telómeros de una cromátida ocurriría a expensas de la otra, dando lugar a telómeros extremadamente largos y cortos, que son típicos de las células en las que la vía ALT está activa (Fig. 6) (Oganesian, L., *et al.*, 2009).



**Figura 6. Mecanismos de recombinación en las células ALT.** A) Intercambio de cromátidas hermanas. La línea roja representa la secuencia TTAGGG y la línea azul la secuencia CCCTAA. Después de la replicación semiconservativa del DNA (las líneas punteadas representan DNA recién sintetizado), la recombinación homóloga puede conducir a intercambios post-replicativos. B) La recombinación homóloga en células ALT requiere de la invasión de la cadena por un voladizo del telómero adyacente, seguido de la extensión de la cadena invadida por DNA polimerasas (línea punteada roja). La cadena rica en C se complementa (línea punteada azul), resultando en un alargamiento telomérico. C) Resolución del *t-loop*. La resolución inadecuada da como resultado la formación de los círculos ECTR y telómeros truncados con un tamaño heterogéneo. En células de mamífero, la resolución del *t-loop* está mediada por las proteínas NBS1 y XRCC3, interaccionando directamente con el dominio básico de TRF2 (Tomado de Oganessian, L., *et al.*, 2009).

### 3.3.3.1 Cuerpos de Leucemia Promielocítica asociada a ALT (APB)

Los cuerpos APB son agregados nucleares de proteínas que, a pesar de no estar relacionados generalmente con telómeros, muchas líneas tumorales negativas a telomerasa los presentan asociados a la vía ALT (APB). Estos cuerpos además, incluyen **DNA telomérico y cromatina** (Nabetani, A., *et al.*, 2011).

Los cuerpos APB contienen muchas proteínas implicadas en la replicación, recombinación y reparación del DNA (Tabla 2) (Fig. 7) (Chung, I., *et al.*, 2011). Entre estas proteínas se encuentran PML, SP100, SUMO y proteínas asociadas a la repetición de los telómeros como TRF1, TRF2, POT1 o RAP1, así como la variante de la histona fosforilada H2A.X ( $\gamma$ H2A.X), la helicasa BLM similar a RecQ, la proteína HP1 de heterocromatina y proteínas del mantenimiento estructural del complejo cromosómico (SMC5 / 6), incluyendo a la ligasa SUMO E3 MMS21. Además, las proteínas implicadas en la recombinación homóloga se localizan en los cuerpos APB, como por ejemplo la endonucleasa MUS81, la proteína de replicación A (RPA), RAD51 y RAD52, la proteína de susceptibilidad al cáncer de mama 1 (BRCA1) y el complejo MRN que consiste en NBS1, MRE11 (proteína de recombinación meiótica 11) y RAD50 (Chung, I., *et al.*, 2012).

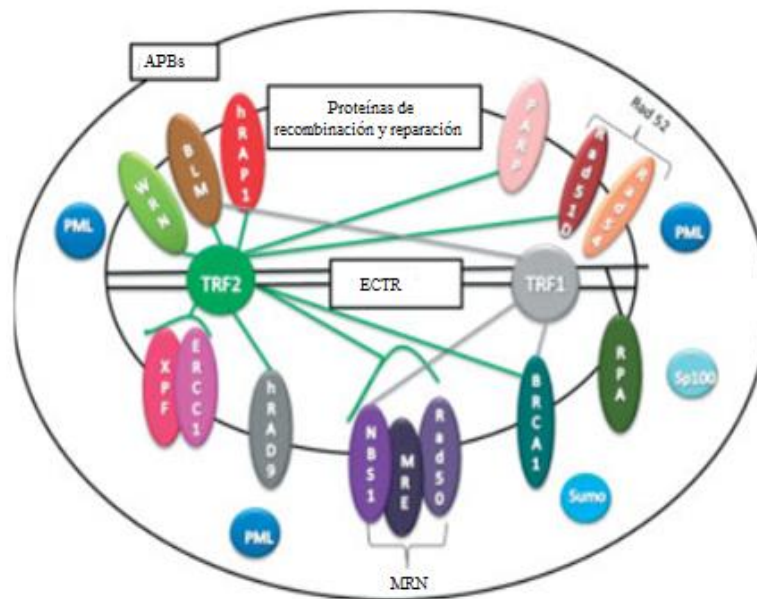
Debido a su capacidad para enriquecer ciertas proteínas y / o mejorar su actividad, los cuerpos APB pueden promover la replicación y / o la extensión de telómeros mediada por recombinación homóloga. Alteraciones en la formación de estos cuerpos, conduce al acortamiento de los telómeros en las células ALT, sugiriendo que los cuerpos APB están implicados en la actividad de la vía ALT (Florence, R., *et al.*, 2016). Diversas investigaciones sostienen fuertemente que los cuerpos APB tienen un rol funcional en el mantenimiento telomérico. En primer lugar, la aparición de los cuerpos APB es un marcador para la identificación de tumores humanos que utilizan el mecanismo ALT. En segundo lugar, la interrupción de los cuerpos APB mediante el secuestro del complejo MRE11-Rad50-NBS1, da como resultado un acortamiento de los telómeros (Chung, I., *et al.*, 2012).

Tabla 2. Proteínas de los cuerpos APB involucrados en la vía ALT (Tomado de Nabetani, A., *et al.*, 2011)

Name	Tests <sup>a</sup>	Remarks	Name	Tests <sup>a</sup>	Remarks
53BP1	LK	DDR	TopoII $\alpha$	L	DNA structure; topoisomerase, type II
ATM	L	DDR; PIKK	TopoIII $\alpha$	LK	DNA structure; topoisomerase, type IA
ATR	LK	DDR; PIKK	TRF1	LK	Shelterin; ds telomere DNA binding
BLM	LK	DSBR; RecQ-like helicase	TRF2	LK	Shelterin; ds telomere DNA binding
BRCA1	L	HR; breast cancer 1	WRN	LK	HR; RecQ-like helicase and nuclease
Cdk2	L	Cell cycle; CDK	XPF	L	Excision repair; endonuclease
COUP-TF1	L	Unknown; orphan nuclear receptor	XRCC3	K	HR, resolution of Holliday junction
COUP-TF2	L	Unknown; orphan nuclear receptor			
ERCC1	L	Excision repair; endonuclease			
FANCA	K	DSBR			
FANCD2	LK	DSBR			
FANCF	L	DSBR; structure-specific DNA helicase			
FANCL	K	DSBR; E3 ubiquitin ligase			
FEN1	K	Replication; flap endonuclease			
$\gamma$ -H2AX	L	DSB marker; phosphorylated H2AX			
hnRNP A2	L	Regulator of splicing; hnRNP			
HUS1	L	DDR; 9-1-1 PCNA-like clamp			
HP1 $\alpha$	LK	Heterochromatin			
HP1 $\beta$	LK	Heterochromatin			
HP1 $\gamma$	LK	Heterochromatin			
HSP90	L	Heat shock protein			
MDC1	L	DDR			
MMS21	LK	DDR; E3 SUMO ligase in SMC5/6			
MRE11	LK	HR; MRN complex subunit			
MUS81	LK	HR; structure-specific endonuclease			
NBS1	LK	HR; MRN complex subunit			
NXP2	L	PML body			
p21	LK	Regulator of growth; CDK inhibitor			
p53	LE <sup>b</sup>	Tumour suppression; transcription factor			
PARP2	L	DSBR; poly (ADP-ribose) polymerase			
PCNA	LK	Replication; clamp			
PML	LK	PML body			
POT1	L	Shelterin; ss telomere DNA binding			
RAD1	L	DDR; 9-1-1 PCNA-like clamp			
RAD9	L	DDR; 9-1-1 PCNA-like clamp			
RAD17	L	DDR; chromatin loader for 9-1-1 clamp			
RAD50	LK	HR; MRN complex subunit			
RAD51	LK	HR; RecA-like, strand exchange protein			
RAD51D	LK	HR; resolution of Holliday			
RIP140	L	Transcription; co-regulator			
RPA32	LK	Replication and HR; ss DNA binding			
RPA70	LK	Replication and HR; ss DNA binding			
SMC5	LK	DDR; structural maintenance complex			
SMC6	L	DDR; structural maintenance complex			
Sp-100	LKE	PML body			
STN1	L	Telomere; ss DNA binding CST complex			
TEP1	L	Telomere			
TF4	L	Unknown; orphan nuclear receptor			
TIN2	LK	Shelterin			

### 3.3.3.2 SUMOilación

La sumoilación es una modificación postraduccional mediante la cual algunas de las proteínas celulares son covalentemente modificadas en sus residuos de lisina mediante la adición de un péptido (11 a 20 kDa) llamada SUMO (Potts, P., & Yu, H., 2007). Muchos componentes de los cuerpos APB están SUMOilados. La presencia de varias proteínas SUMOiladas y de unión a SUMO en los cuerpos APB, ha llevado a proponer que los cuerpos APB son sitios de almacenamiento celular para proteínas SUMOiladas (Fig. 7). En particular, la proteína MMS21 del complejo SMC5/6 estimula la SUMOilación de cuatro de las seis proteínas del complejo *Shelterin* (TRF1, TRF2, TIN2 y RAP1). La SUMOilación de estas proteínas puede alterar su estabilidad y la unión entre ellas, conduciendo al desensamblaje del complejo, desprotegiendo a los telómeros y facilitando la recombinación homóloga en las células ALT (Draskovic, I., *et al.*, 2009). Por otra parte, el complejo SMC5/6 interactúa directamente con el complejo MRN para la formación de cuerpos APB, aunque se desconoce el mecanismo por el cual promueve la formación de ellos (Potts, P., & Yu, H., 2007).



**Figura 7. Componentes proteicos de los cuerpos APB.** Los cuerpos APB son estructuras intranucleares dinámicas compuestas por proteínas como PML, Sp100, miembros de la familia SUMO (SMC5 / 6), el complejo MRN (MRE11-Rad50-NBS1), y el complejo *Shelterin*, entre otros. Estos cuerpos son esenciales para una variedad de funciones celulares, que incluyen la regulación transcripcional, crecimiento celular, respuesta antiviral, senescencia celular, recombinación homóloga y reparación del DNA. Los cuerpos APB contienen ECTR's unidos por TRF2 y TRF1, que a su vez interactúan con otras proteínas involucradas en la recombinación del DNA (Tomado de Boeck, G., *et al.*, 2009).

### 3.4 Complejo MRN (MRE11-Rad50-NBS1)

El complejo MRN participa en el mantenimiento de los telómeros, principalmente a través de su asociación con la proteína TRF2 del complejo *Shelterin* (Zhu, XD., *et al.*, 2010). Además, se ha demostrado que la pérdida del complejo MRN reduce la longitud de la cadena rica en G de los telómeros, lo que podría inhibir la formación adecuada del *t-loop*, desestabilizando al telómero. También se ha demostrado que el alargamiento de los telómeros en las células cancerosas mediante la vía ALT, depende de MRN (Nabetani, A., *et al.*, 2011).

MRN consta de dos subunidades de unión a ATP Rad50, dos subunidades MRE11 (endo y exonucleasa) y la subunidad de acoplamiento reguladora NBS1, la cual es específica de los organismos eucariotas. La proteína Rad50 pertenece a la familia encargada del mantenimiento estructural de los cromosomas SMC, y forma parte de las cohesinas que organizan y unen el DNA entre cromátidas hermanas (Lafrance-Vanasse, J, *et al.*, 2015). Se caracteriza por tener una región en forma  $\alpha$ -helicoidal “*coiled-coil*”, donde sus regiones N-terminal y C-terminal se asocian de forma antiparalela, separando las cabezas globulares formadas por el dominio Walker A y B (AAA\_23) e importantes para su unión a nucleótidos y los dominios de ATPasa. A cada lado de los dominios Walker, se encuentran las regiones de unión a MRE11 (Fig. 8). En el centro de la región “*coiled-coil*” se encuentra el dominio conservado del dedo de Zinc (Zn-hook), a través del cual se pueden unir las dos subunidades de Rad50 (homodimerización) de manera dependiente de Zinc (Fig. 8) (Syed, A., *et al.*, 2018).

La proteína MRE11 tiene un dominio nucleasa en su extremo N-terminal y dos motivos de unión al DNA, uno en la región central y otro en su extremo C-terminal. En esta región se encuentra el dominio Gar, que son repetidos de glicina-arginina, el cual ayuda a regular su actividad 3'-5' exonucleasa (Lafrance-Vanasse, J, *et al.*, 2015). En esta misma región se encuentra el dominio de unión a Rad50. La región N-terminal de MRE11 es importante para la interacción con la proteína NBS1 y para su localización nuclear (Fig. 8). Así mismo, en esta región se encuentran los motivos de dimerización, los cuales ayudan a unir las dos subunidades. Esta forma homodimérica es necesaria para una correcta unión al DNA, así como para la función básica del complejo MRN (Williams, R., *et al.*, 2008) La actividad de nucleasa de MRE11 es

dependiente de ATP, de la presencia de NBS1 y de la estimulación por parte de Rad50 (Syed, A., *et al.*, 2018).

Por otra parte, la proteína NBS1 también conocida como Nibrin, no tiene actividad enzimática y regula las funciones del complejo MRN. Esta proteína se encuentra dividida en 3 regiones funcionales. La primera es la región N-terminal en la cual se encuentra el dominio FHA y dos dominios adyacentes de BRCT. El dominio de FHA se une a residuos fosforilados de treonina de proteínas que participan en el daño del DNA. La segunda región corresponde a la zona central, donde se encuentran los motivos SQ. Por último, la tercera región corresponde al C-terminal, que contiene el dominio de interacción con MRE11 y el dominio por el cual interacciona y recluta a ATM (Fig. 8) (Kijas, A., *et al.*, 2015).

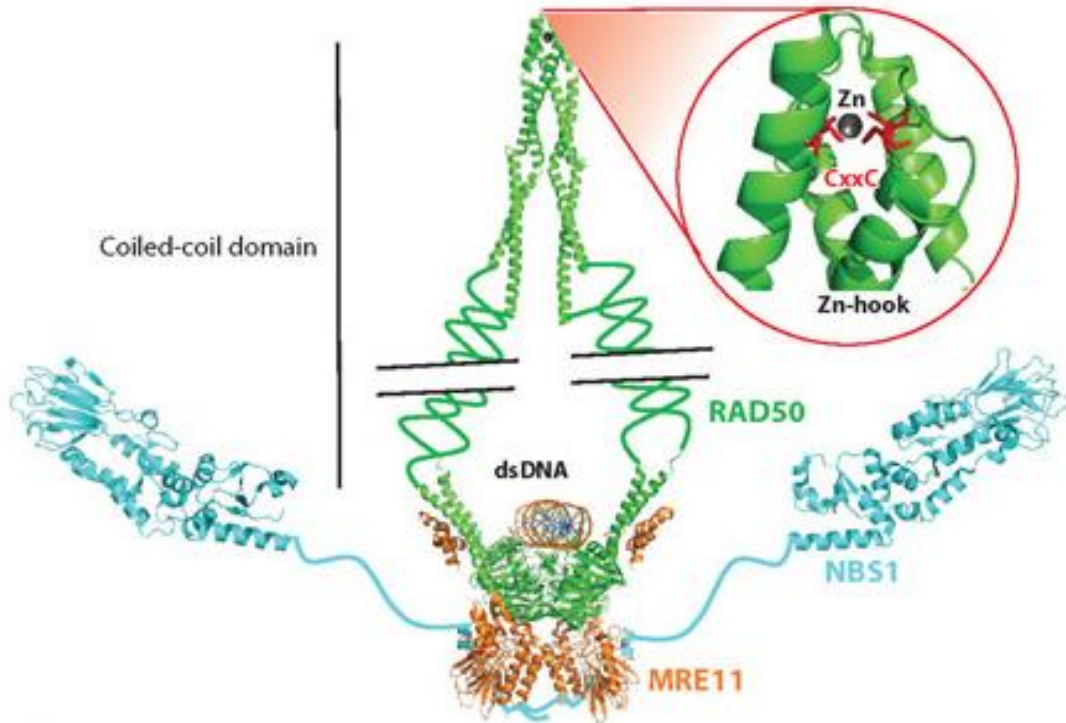
El complejo MRN está formado por dos subunidades MRE11, con actividad exonucleasa, que interactúan con las regiones “*coil*” de las dos subunidades Rad50, formando un heterotetrámero (Lamarche, B., *et al.*, 2010). De esta manera el complejo MRN detecta y se une a las DSBs. También, puede enlazar dos moléculas de DNA, mediante los dominios “*coil*” de Rad50. Además, las dos subunidades de NBS1 se unen para completar el heterohexámero, de modo que la proteína NBS1 actúa como proteína adaptadora muy flexible, interactuando con H2Ax y ATM y, desencadenando la vía de reparación DSB (Fig. 8) (Williams, R., *et al.*, 2008; Kijas, A., *et al.*, 2015).

Las funciones principales del complejo MRN son:

- Unión al DNA
- Activación de las rutas de señalización para detener el ciclo celular y reparar el DNA.
- Participación en la recombinación homóloga
- Mantenimiento telomérico

Este complejo es uno de los primeros en unirse a las roturas de doble cadena en el DNA de manera independiente de ATM (Williams, R., *et al.*, 2008). Esta unión se lleva a cabo por la nucleasa dependiente de  $Mn^{2+}$  MRE11 y la ATPasa Rad50, que se unen a los extremos dañados de DNA. ATM y el complejo MRN son reclutados en los sitios de lesión del DNA; inicialmente ATM se une directamente al DNA y luego se asocia al complejo MRN, a través de la proteína

NBS1. ATM fosforila a NBS1 en los residuos de serina 278 y 343, lo que contribuye a la activación de otras proteínas involucradas en esta ruta de señalización (Wen, J., *et al.*, 2013).



**Figura 8. Estructura del complejo MRN (MRE11-Rad50-NBS1).** Se muestra la estructura tridimensional del complejo MRN y el DNAs, basado en estructuras de cristal parciales derivadas experimentalmente. MRE11: naranja, Rad50: verde y NBS1: azul. El dedo de Zn enlazado alostéricamente se resalta en el recuadro, junto con los motivos CxxC (rojo) en dos monómeros Rad50 (Tomado de Syed, A., *et al.*, 2018).

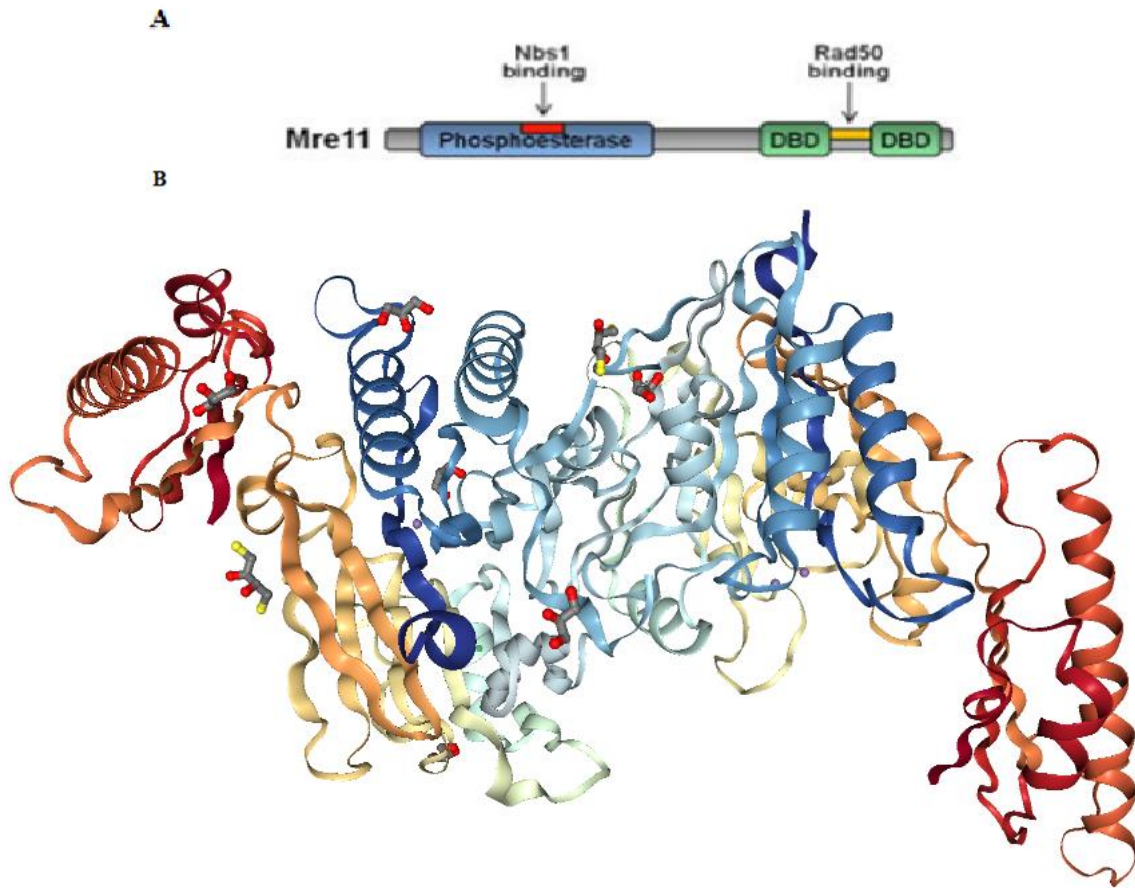
Debido a que en la vía ALT está implicada en la replicación por recombinación homóloga del DNA telomérico, está se asocia con el complejo MRE11-Rad50-NBS1, que convierte la energía de unión a DNA, ATP y proteínas asociadas, en cambios conformacionales que controlan las actividades de nucleasa (Chang, E., *et al.*, 2019). MRN se une al DNA y actúa como un sensor de daño además, se encarga de activar las cascadas de las cinasas ATM y ATR. Este complejo es importante en la fase inicial de la respuesta DDR, lo que lleva al procesamiento de la ruptura y la resección de los 5' a cada lado del daño, dando como resultado un sustrato para que se lleve a cabo la recombinación homóloga (Diotti, R., *et al.*, 2011). La exonucleasa MRE11 actúa en

asociación con la proteína CtLP fosforilada (Sae2 en levadura). La presencia de la nucleasa 5'-3-, EXO1 junto con BLM o WRN, promueve la resección del DSB para generar ssDNA 3', que constituye un paso fundamental para la HR. Los salientes de ssDNA 3' resultantes se recubren de la proteína RPA. El ssDNA recubierto de RPA puede activar una segunda ruta de punto de control: la señalización de ATR. El complejo MRN con RPA y ATR organiza la protección, remodelación y el reinicio de las horquillas de replicación (Syed, A., *et al.*, 2018)

Las mutaciones en cualquiera de los genes que codifican para los componentes del complejo MRN, causan graves consecuencias en los humanos. Mutaciones de la línea germinal, en MRE11 NBS1 o RAD50, causan un trastorno similar a la ataxia-telangiectasia (AT) (ATLD), el síndrome de rotura de Nijmegen (NBS) o un trastorno similar a la NBS (Bressan, DA., *et al.*, 1998; Syed, A., *et al.*, 2018).

### 3.4.1 MRE11 en *Homo sapiens*

MRE11 es una proteína altamente conservada de 70-90 kDa, compuesta por un dominio de fosfoesterasa N-terminal dependiente de  $Mn^{2+}/Mg^{2+}$  y dos dominios distintos de unión a DNA en su extremo C-terminal (Fig. 9). Sus principales funciones son: detectar el daño en el DNA, formar un puente entre las moléculas de DNA implicadas en la recombinación homóloga durante la reparación meiótica y mitótica; el mantenimiento de la longitud telomérica; y la reparación de roturas de doble cadena de DNA, ya que tiene actividad exonucleasa 3' a 5' y actividad endonucleasa de DNA (Syed, A., *et al.*, 2018). En su sitio activo, tiene cinco histidinas, dos ácidos aspárticos y unas asparaginas que coordinan dos iones  $Mn^{2+}$  y son importantes para la catálisis. Su dominio central, ayuda a discriminar entre sustratos de ssDNA y dsDNA y está involucrado en la orientación del sustrato dentro del sitio activo. El dominio C-terminal de esta proteína se predice como flexible, excepto por una pequeña región que forma hélices  $\alpha$ , la cual interactúa con la base de la región coiled-coil de Rad50. El resto del dominio C-terminal es responsable de las interacciones proteína-proteína y proteína-DNA y está sujeto a modificaciones postraduccionales como fosforilaciones y SUMOilaciones, así como a metilaciones de arginina (Lafrance-Vanasse, J., *et al.*, 2015; Syed, A., *et al.*, 2018) (Fig. 9).



**Figura 9. Estructura de la proteína MRE11.** A) Esquema de los dominios conocidos para la proteína MRE11: dominio fosfoesterasa en el extremo N- terminal (azul), dominios de unión al DNA en el C-terminal (verde) y dominios de unión a otras proteínas del complejo MRN. B) Estructura tridimensional de MRE11 (PDB: 3T11) (Tomado de Syed, A., *et al.*, 2018).

MRE11 es una proteína que juega un papel central en la activación eficiente de la cinasa ATM, que a su vez fosforila a MRE11, la cual es necesaria para la reparación de DSB y la supervivencia celular. Sin embargo, esta fosforilación no es necesaria para la formación del complejo MRN (Kijas, A., *et al.*, 2015).

El complejo MRN además, participa en el mantenimiento telomérico, probablemente a través de su interacción con TRF2 (Kijas, A., *et al.*, 2015). MRE11 interactúa con TRF2 y se localiza en los telómeros durante todo el ciclo celular. Estas dos proteínas también tienen un papel en la prevención de la fusión de los cromosomas después de la replicación, probablemente al

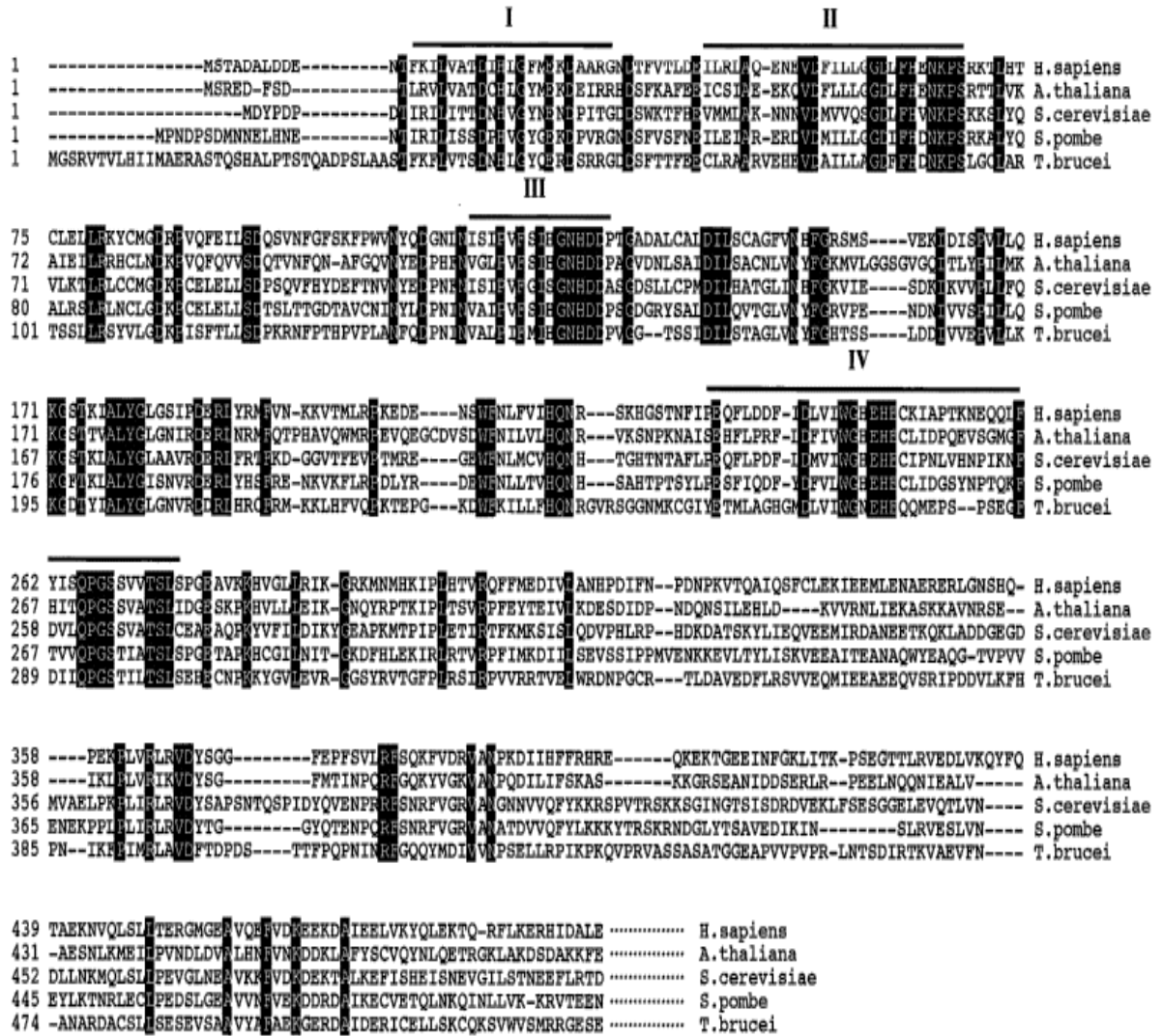
promover la resección de la cadena principal 5' para generar salientes 3' unidos a Pot1a-TPP1, que evitan el NHEJ (Deng, Y., *et al.*, 2009).

### 3.5 Complejo MRN en otras especies

La importancia funcional de MRN tanto en la señalización como en la reparación se evidencia por el alto grado de conservación evolutiva del subcomplejo catalítico central MRE11–Rad50 (MR), abarcando arqueas (*Pyrococcus furiosus*), eubacterias (*Escherichia coli* SbcC/D), fagos (T4 y gp46/47) y eucariotas, incluidos los homólogos en *Saccharomyces cerevisiae* y *Schizosaccharomyces pombe*. MRE11 y Rad50 se conservan en bacterias y arqueas, solo los eucariotas poseen Xrs2, que es el único componente MRX que alberga una señal de localización nuclear y es necesario para la translocación del subcomplejo MRE11–Rad50 al núcleo, (Casari, E., *et al.*, 2019). Aquí, este subcomplejo reconoce, señala e inicia la reparación de los DSB, presentando actividades estructurales y enzimáticas para iniciar la reparación y mantenimiento de los extremos de DSB unidos entre sí. MRX también recluta y activa a la proteína de punto de control Tel1 (ATM en mamíferos), coordinando así la reparación de DSB durante la progresión del ciclo celular (Casari, E., *et al.*, 2019; Desai-Mehta, A., *et al.*, 2001). En *S. cerevisiae*, se sabe que MRX interactúa con Rif2, que se recluta en los extremos del DNA telomérico y regula negativamente la elongación de los telómeros, mediada por la telomerasa (Casari, E., *et al.*, 2019). Curiosamente, Rif2, que se recluta para DSB, de una manera parcialmente dependiente de MRX, mejora la hidrólisis de ATP por Rad50 (Desai-Mehta, A., *et al.*, 2001).

La proteína MRE11 esta conservada en el parásito *Trypanosoma brucei*, denominada TbMRE11 la cual comparte 32%, 35%, 34% y 37% de identidad con *S. cerevisiae*, *S. pombe*, *Arabidopsis thaliana* y *H. sapiens*, respectivamente (Fig. 10). Las secuencias MRE11 se conservan predominantemente en el dominio N-terminal, sugiriendo que TbMRE11 comparte funciones similares con MRE11 de levadura y de *H. sapiens*. La región N-terminal de MRE11 proveniente de *S. cerevisiae*, contiene cuatro motivos de fosfoesterasa altamente conservados, que son importantes para la actividad de nucleasa de esta proteína (Tan, K., *et al.*, 2002). Se ha demostrado que el extremo N-terminal conservado, está involucrado en la resección

exonucleolítica 5', generando fragmentos que participan en la recombinación homóloga (Casari, E., *et al.*, 2019).



**Figura 10. Alineamiento del dominio N-terminal de las proteínas MRE11 de diferentes organismos.** Las secuencias de aminoácidos de las proteínas MRE11 fueron alineadas mediante Clustal W. Las secuencias que se compararon son *T. brucei* (Número de acceso del GenBank: AY077640), *S. cerevisiae* (NC001145), *S. pombe* (Q09683), *Homo sapiens* (NM005590) y *A. thaliana* (NM124806). Los residuos que son idénticos en todas las secuencias se resaltan en un fondo negro. Las regiones marcadas indican los motivos de fosfoesterasa, importantes para su actividad de nucleasa en *S. cerevisiae* (Tomado de Tan, K., *et al.*, 2002).

La existencia y la alta conservación de la proteína MRE11 en *T. brucei* (TbMRE11), podría proporcionar información sobre las funciones principales de esta proteína multifuncional.

TbMRE11 desempeña un papel en la respuesta al daño del ADN, sugierendo que al menos uno de sus propósitos es reparar DSBs (Tan, K., *et al.*, 2002).

### 3.6 Uso del inhibidor VE-821 para estudiar la vía ALT

El mantenimiento telomérico proporciona a las células cancerosas la inmortalidad celular. Una fracción significativa de tumores usa la vía ALT para alargar sus telómeros y obtener un potencial de proliferación ilimitado. Dado que la vía ALT es exclusiva de células cancerosas, se ha propuesto estudiar esta vía mediante el uso de inhibidores específicos, en líneas de células cancerosas. (Deeg, K., *et al.*, 2016)

En estudios recientes se investigaron las líneas celulares positivas para telomerasa y para la vía ALT, y se informó que las células que emplean la vía ALT son hipersensibles a la inhibición de ATR (Conomos, D., *et al.*, 2012). Esta proteína es una de las dos cinasas principales que activan el punto de control del daño del DNA en células humanas y se inhibe con **VE-821** (Fig.11). Este compuesto es un inhibidor competitivo selectivo de ATP de la proteína ATR; presenta actividad anticancerígena, induce fragmentación cromosómica, apoptosis y muerte celular *in vitro*; además, disminuye la fosforilación de Chk1 e inhibe la fosforilación de H2AX y limita de manera reversible la progresión del ciclo celular en las células normales, con muerte mínima o efectos perjudiciales a largo plazo (Deeg, K., *et al.*, 2016).

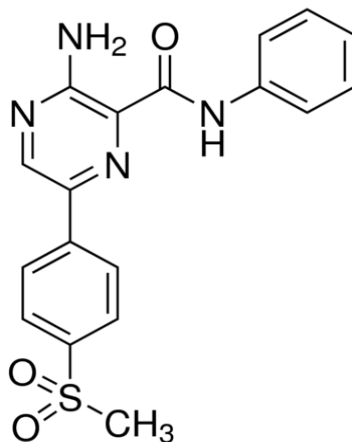


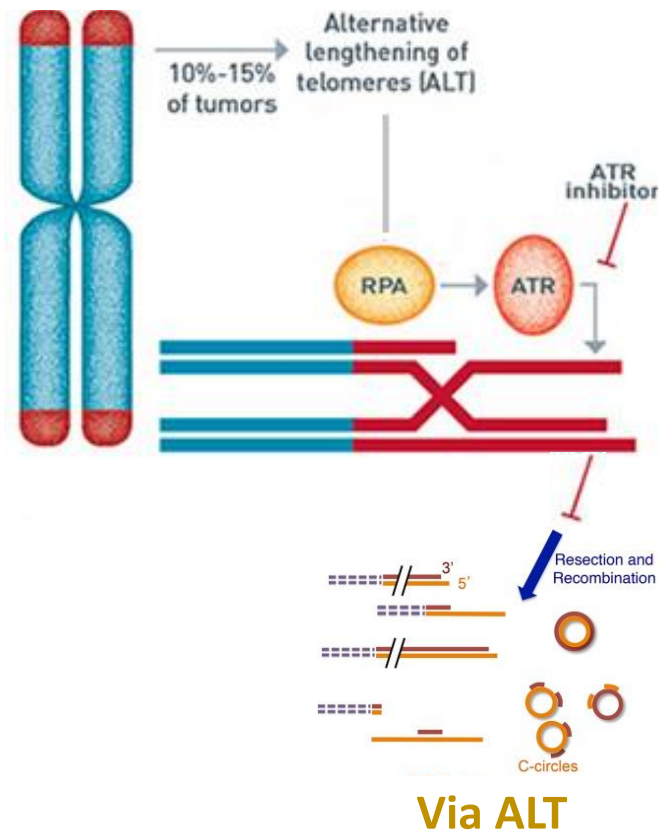
Figura 11. Estructura química del inhibidor VE-821. . C<sub>18</sub>H<sub>16</sub>N<sub>4</sub>O<sub>3</sub>S. (Tomado de Hendriks, C., *et al.*, 2017)

Se tiene reportes que las líneas cancerosas que presentan la vía ALT son osteosarcomas y fibroblastos por mencionar algunas. En la Tabla 3 se muestran diversas líneas celulares y se ejemplifican el tipo de mantenimiento telomérico (Flynn, R., *et al.*, 2015).

**Tabla 3. Líneas celulares y su mantenimiento telomérico (Tomado y modificado de Conomos, D., *et al.*, 2012)**

<b>Línea celular</b>	<b>Tipo celular</b>	<b>Mantenimiento telomérico</b>
WI38	Fibroblastoma, pulmón	Mortal
JFCF-6	Fibroblastoma, yeyuno	Mortal
GM02063	Fibroblastoma, piel	Mortal
HT1080	Fibrosarcoma	Telomerasa
HeLa	Carcinoma cervical	Telomerasa
GM639	Fibroblastoma, piel	Telomerasa
WI38- VA13/2RA	Fibroblastoma, pulmón	ALT
U-2 OS	Osteosarcoma	ALT
IIICF/c	Fibroblastoma, mama	ALT
JFCF-6/T.1M	Fibroblastoma, yeyuno	ALT
JFCF-6/T.1R	Fibroblastoma, yeyuno	ALT
GM847	Fibroblastoma, piel	ALT
SUSM.1	Fibroblastoma, hígado	ALT
Saos-2	Osteosarcoma	ALT

La vía de señalización de ATR se desencadena en respuesta al estrés replicativo del DNA y la acumulación de ssDNA, a través de la interacción de RPA (Fig. 12) (Diotti, R., *et al.*, 2011). El ssDNA recubierto por la proteína RPA es un punto clave para la replicación homóloga del DNA, ya que la proteína RPA promueve la recombinación de DNA y se sabe que la vía ALT depende de la recombinación. Por lo que la unión de RPA al DNA telomérico promueve la recombinación y la activación de la vía ALT, dando lugar a una elongación telomérica. La activación de ATR es fundamental para la activación del complejo MRN en la señalización de daños. Así que, la señalización inadecuada de ATR es una amenaza para la integridad de los cromosomas, debido a la naturaleza del telómero (Fig. 12) (Flynn, R., *et al.*, 2015; Jossé, R., *et al.*, 2014).



**Figura 12. Mecanismo de acción del inhibidor VE-821.** Este inhibidor competitivo de ATP de la proteína ATR, afecta su señalización, evitando que haya una recesión de los *t-loops*, por lo tanto, no se forman los círculos ECTR con lo cual no se llevará a cabo la recombinación y la vía ALT se verá inhibida (Tomado y modificado de José, R., *et al.*, 2014).

En estudios pre-clínicos, el inhibidor VE-821 mejora los efectos citotóxicos de varios agentes que dañan el DNA, en las células tumorales que tienen defectos en la vía ATM/p53 (Williamson, C., *et al.*, 2016). Varias células tumorales tienen una mayor dependencia de la señalización de ATR para la supervivencia, haciendo a ATR un objetivo prometedor para la terapia contra el cáncer (Song, N., *et al.*, 2018). Debido a que ATR es un componente esencial de la reparación por recombinación homóloga, los inhibidores de ATR reducen la capacidad de la reparación por HR, afectando directamente a la vía ALT (Song, N., *et al.*, 2018).

Se ha visto que la inhibición de ATR, afecta diversas proteínas, entre ellas ARID1A. Esta proteína tiene actividad de helicasa, ATPasa y forma parte del complejo SNF/SWI de remodelación de cromatina, el cual es necesario para la activación transcripcional de genes normalmente reprimidos por la estructura de la cromatina. Este complejo utiliza ATP para

modificar la arquitectura de la cromatina (Williamson, C., *et al.*, 2016). Por lo que una inhibición de esta proteína afecta el reclutamiento de TOP2A a la cromatina. TOP2A, es una enzima que cataliza la ruptura y la remodelación de la estructura topológica del DNA (Jossé, R., *et al.*, 2014) y es fundamental para los procesos de condensación de cromosomas, la separación de las cromátidas hermanas, la transcripción y la replicación del DNA (Williamson, C., *et al.*, 2016).

Los defectos en la localización TOP2A y la progresión del ciclo celular, en las células con una inhibición de ARID1A, genera una dependencia de ATR. TOP2A soluciona problemas topológicos del DNA, por lo que un defecto en TOP2A puede afectar a la expresión de otros genes causando inestabilidad genómica (Williamson, C., *et al.*, 2016; Jossé, R., *et al.*, 2014).

### **3.8 *Entamoeba histolytica***

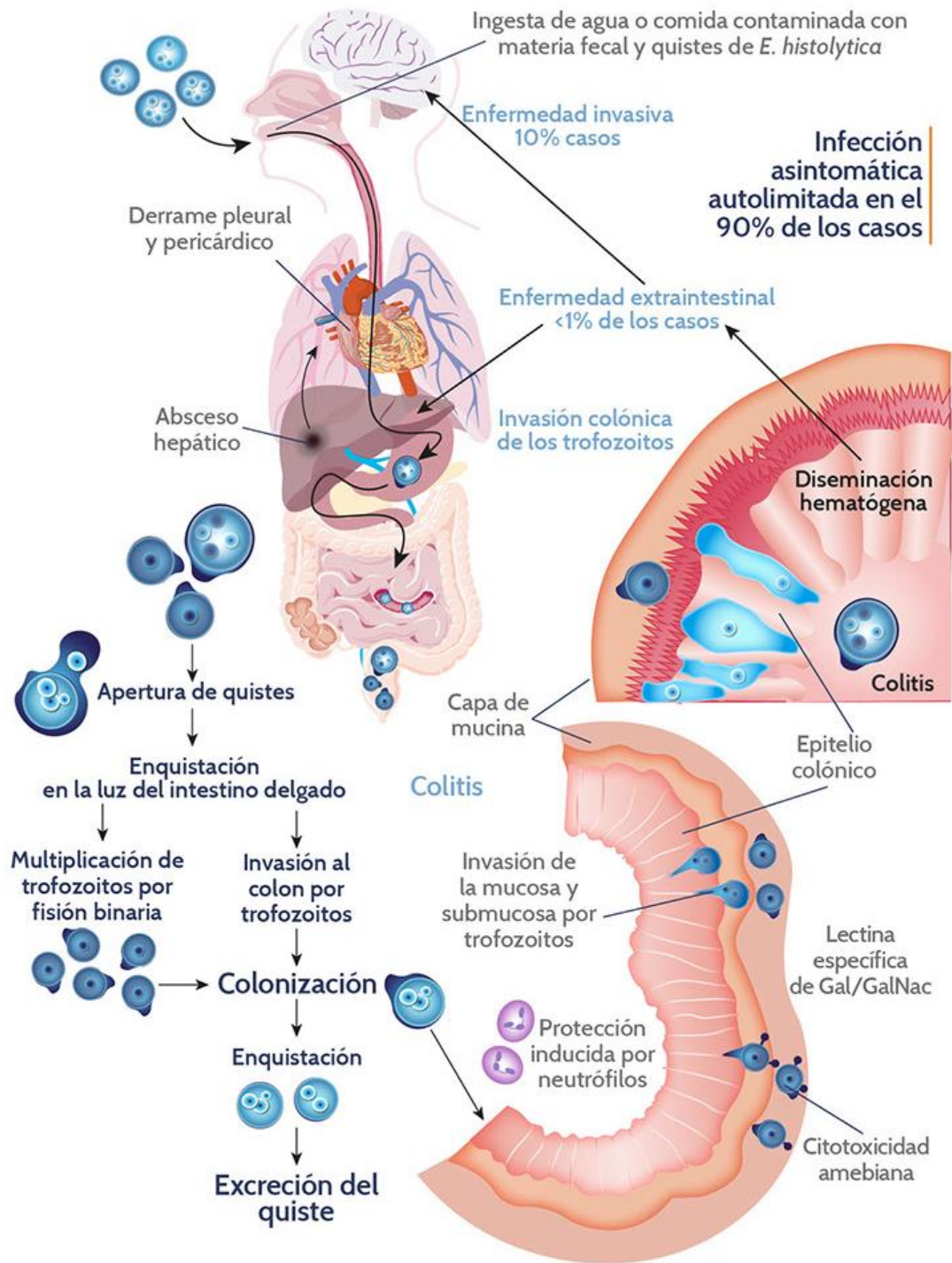
*E. histolytica* es un protozooario entérico anaerobio que infecta a humanos, y es causante de la amebiasis o disentería amebiana, la cual en la mayoría de los casos son asintomáticas, pero la enfermedad intestinal invasiva puede presentarse por varias semanas con calambres, dolor abdominal, diarrea acuosa o con sangre y pérdida de peso (Burgess, S., *et al* 2016). Además, se han descrito enfermedades extra-intestinales diseminadas, como absceso hepático, neumonía, pericarditis purulenta e incluso amebiasis cerebral. En el mundo se estima que alrededor de 50 millones de personas se ven afectadas por este parásito, presentándose principalmente en los países en desarrollo produciendo más de 100,000 muertes al año (Kantor, M., *et al.*, 2018).

#### **3.8.1 Ciclo de vida de *E. histolytica***

El proceso de infección comienza con la ingestión de agua o comida contaminada, donde se encuentran quistes maduros de *E. histolytica*. Este parásito tiene un ciclo de vida simple que consiste en un quiste tetranucleado inactivo que, en condiciones favorables, se convierte en trofozoíto uninucleado durante su paso por el estómago y el intestino delgado (Singh, P., *et al.*, 2013). A través del proceso de diferenciación los trofozoítos forman nuevos quistes, los cuales tienen el potencial de transmitir enfermedades debido a la protección conferida en su pared. Los quistes pueden sobrevivir de días a semanas en el ambiente externo, mientras que los trofozoítos son destruidos rápidamente una vez fuera del cuerpo o por secreciones gástricas si se ingieren (Fig. 13) (Kantor, M., *et al.*, 2018).

Entonces una vez que llegan al colon, los trofozoítos se unen a los enterocitos, colonizan el colon y sobreviven. El proceso de invasión dentro de los tejidos comienza cuando los trofozoítos residentes en el colon rompen la barrera intestinal (Pineda, E., *et al.*, 2017) (Fig.13).

Estos eventos necesitan la adhesión del parásito a las células humanas, lo cual es llevado a cabo por un grupo de proteínas llamadas adhesinas que están presentes en la superficie del trofozoíto. Ejemplo de una de estas adhesinas es la lectina Gal/GalNAc, la cual media los mecanismos para la adherencia y la citotoxicidad en las células huésped, ya que se dirige a los residuos de galactosa y N-acetil-D-galactosamina que se encuentra en las cadenas laterales de mucinas de los azúcares unidos a O<sub>2</sub>. Los mamíferos que no portan galactosa N-terminal o N-acetil-D-galactosamina son resistentes a la adherencia al trofozoíto, proporcionando cierto grado de inmunidad contra la enfermedad invasiva (Kantor, M., *et al.*, 2018).

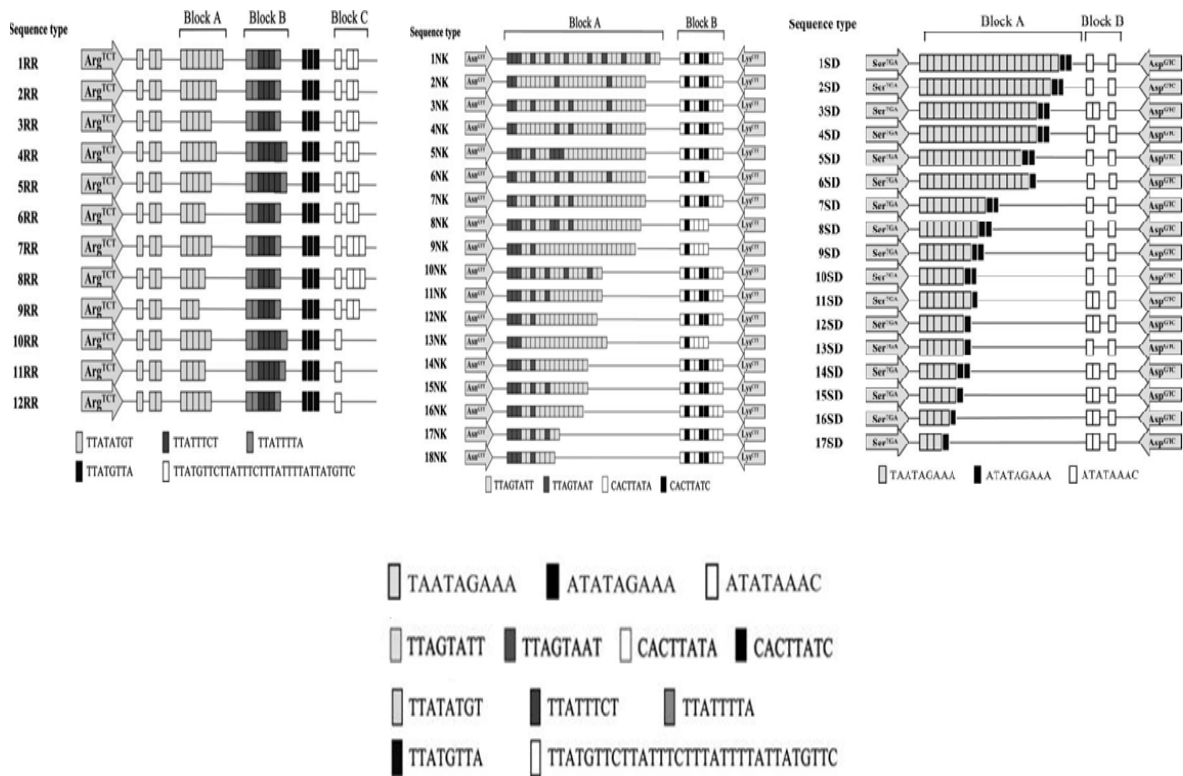


**Figura 13. Ciclo de vida de *E. histolytica*.** El ciclo de vida inicia con la ingestión de un quiste infeccioso, es reblandecido por los jugos gástricos, lo cual permite su esquistación en el intestino grueso, donde se puede desarrollar la infección invasiva o no. Al romperse el quiste, el trofozoíto termina su proceso de división y da lugar a cuatro trofozoítos metaquísticos. Si el trofozoíto continúa avanzando por el colon, inicia su proceso de enquistación con la formación de un prequiste mononuclear, que inicia un proceso de división celular dando lugar a un quiste tetranuclear. Posteriormente, termina el proceso de formación de la pared del quiste y, es expulsado con la materia fecal (Tomado de Abhyankar, M., et al., 2012).

### 3.8.2 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 400 pb a 2.3 kb, sugiriendo un denso empaquetamiento de genes. Los genes de rRNA se localizan en moléculas de DNA circulares extra-cromosomales con un tamaño aproximado de 26 kb (Loftus, B., *et al.*, 2005; Lorenzi, H., *et al.*, 2010). En la reanotación del genoma no se ha logrado identificar secuencias de repetidos teloméricas o subteloméricas, así como genes que codifiquen para la enzima telomerasa (Loftus, B., *et al.*, 2005; Lorenzi, H., *et al.*, 2010).

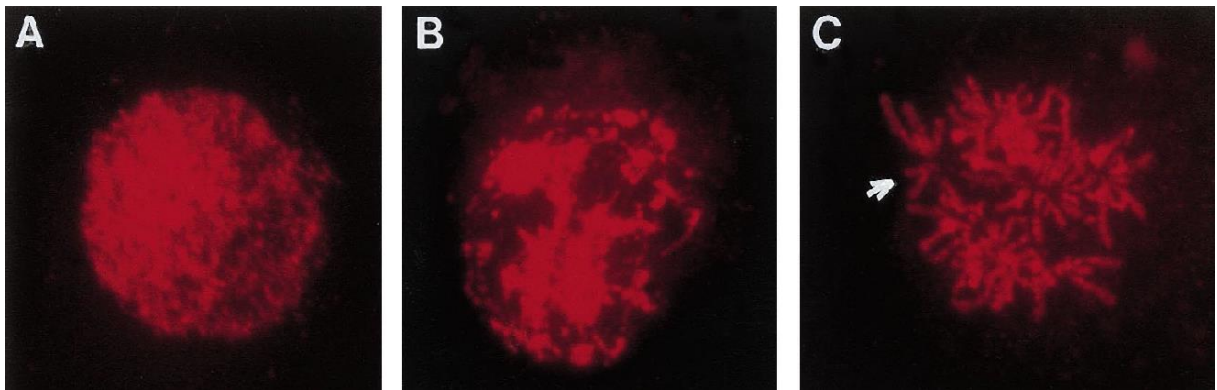
La secuenciación del genoma de la cepa virulenta mejor estudiada, HM-1: IMSS reveló que casi todos los genes de tRNA están organizados en matrices en tándem que constituyen más del 10% del genoma. Mediante un análisis de isocóros en seis diferentes *scaffolds* del genoma de *E. histolytica*, se evidencia la presencia de segmentos repetidos. Estos segmentos consisten en arreglos de genes tRNA en tándem que van de 490 a 1775pb los cuales contienen de 1 a 5 genes tRNAs y diferentes repetidos tipo STR. Los STR se podrían ubicar en las regiones terminales de los cromosomas, por lo que se han propuesto como posibles secuencias teloméricas (Fig.14) (Clark, C., *et al.*, 2006; Tawari, B., *et al.*, 2008). De manera interesante algunas de las secuencias de los STR comparten un parecido con la secuencia telomérica de mamíferos (**TTAGGG**) por ejemplo: **TTAGTATT** o **TTAGTAAT**.



**Figura 14.** Diferencias intraespecíficas en la organización de los STR en los arreglos del tRNAs de *E. histolytica*. Se muestran los tipos de secuencias identificadas mediante la secuenciación de los repetidos STR de diferentes arreglos de tRNAs. Se muestran bloques de STR, con distintas secuencias repetidas a las que se les asigna un sombreado diferente. La flecha indica la posición del gen de tRNA y contiene el código de aminoácidos de tres letras y el anticodón para el RNAt codificado. (Tomado y modificado de Tawari, B., et al., 2008)

### 3.8.3 Organización cromosómica de *E. histolytica*

En *E. histolytica* no se ha determinado el número exacto de cromosomas, (Loftus, B., et al. 2005) sin embargo, diversos investigadores han aportado información relacionada con su estructura. Por ejemplo, Willhoeft y Tannich (2000) identificaron por medio de microscopía de fluorescencia, de 30-50 cromosomas por núcleo con una estructura lineal (Willhoeft, U., et al., 1999). En el año 2006, Chavéz-Munguía en su equipo de trabajo, mediante microscopía electrónica mostró que los cromosomas de este organismo son estructuras lineales y al menos visualizaron 15 cromosomas (Fig. 15) (Chavéz-Munguía, B., et al., 2006).



**Figura 15. Microscopia de fluorescencia de las diversas etapas de *E. histolytica*.** A) Núcleos en interfase con una forma redonda y DNA concentrado en el centro. B) Núcleos en profase, donde se muestra la aparición de estructuras lineales débiles. C) Núcleos en metafase, en donde se observan al menos 15 cromosomas lineales (Tomado de Willhoeft, U., *et al*; 1999).

Se ha demostrado que el genoma de este parásito está organizado en cromatina, cuya unidad fundamental es el nucleosoma, y su genoma contiene genes que codifican para las histonas H2A, H2B, H3 y H4. Estas proteínas contienen residuos de lisina y arginina susceptibles a modificaciones postraduccionales como acetilación y metilación, a través de la acción de las acetiltransferasas de histonas (HAT) o mediante metiltransferasas de lisina o arginina (HKMT o PRMT) (Lozano-Amado, D., *et al.*, 2016).

A la fecha, las únicas modificaciones postraduccionales que se han demostrado en este organismo son la di y tri-metilación de la lisina 4 en la histona H3 (H3K4 me2/3) que se han correlacionado con actividad transcripcional (Lozano-Amado, D., *et al.*, 2016) así como la dimetilación en la lisina 27 de la histona H3 (H3K27me2), la cual está enriquecida en genes silenciados por RNA de interferencia. Las marcas epigenéticas (H4R3me2) y la acetilación de la histona H4 en su región N-terminal, están relacionadas con la activación transcripcional (Borbolla., V., *et al.*, 2016).

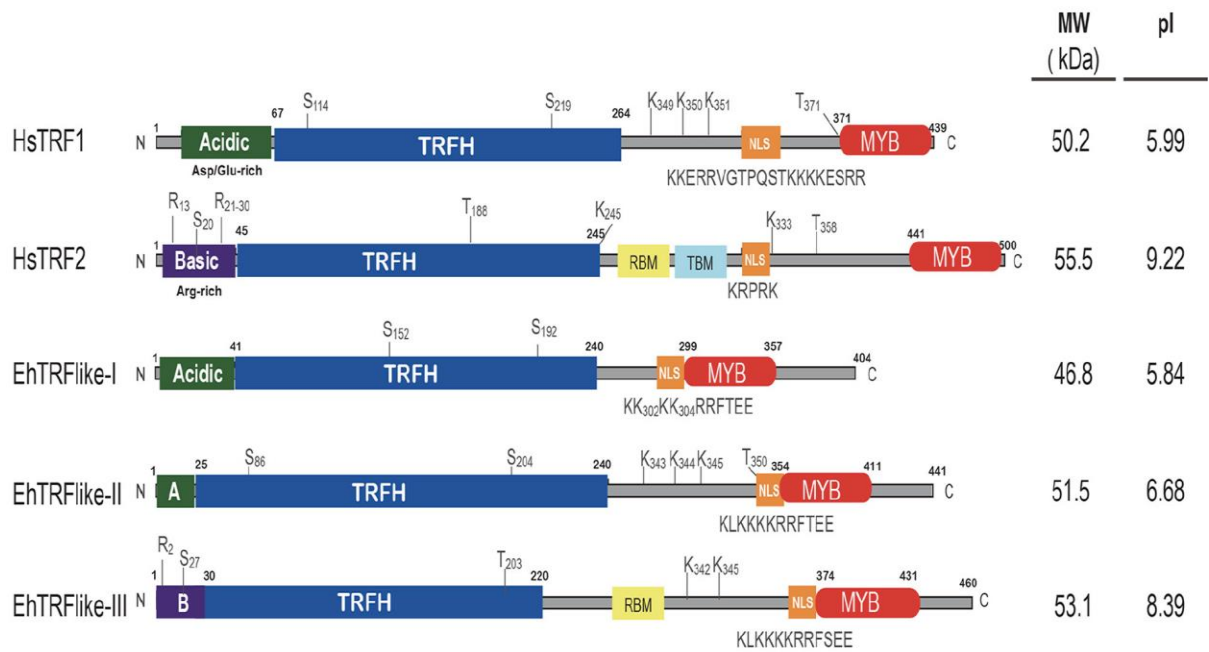
### 3.9 Antecedentes particulares

#### 3.9.1 Proteínas EhTRF-like de *E. histolytica*

*E. histolytica*, contiene tres genes homólogos a los reportados en *H. sapiens*, que codifican para las proteínas TRF. Estos genes están ubicados en los *loci*: EHI\_001110, EHI\_001090 y EHI\_148140. Tanto EHI\_001110 como EHI\_001090, se encuentran en el mismo *conting*, sugiriendo una duplicación de los genes en el genoma de *E. histolytica*. En trabajos previos llevados a cabo por nuestro grupo de trabajo, las proteínas para las que codifican estos genes se denominaron EhTRF-like I, EhTRF-like II y EhTRF-like III (Rendón-Gandarilla, F., *et al.*, 2018) (Fig. 16).

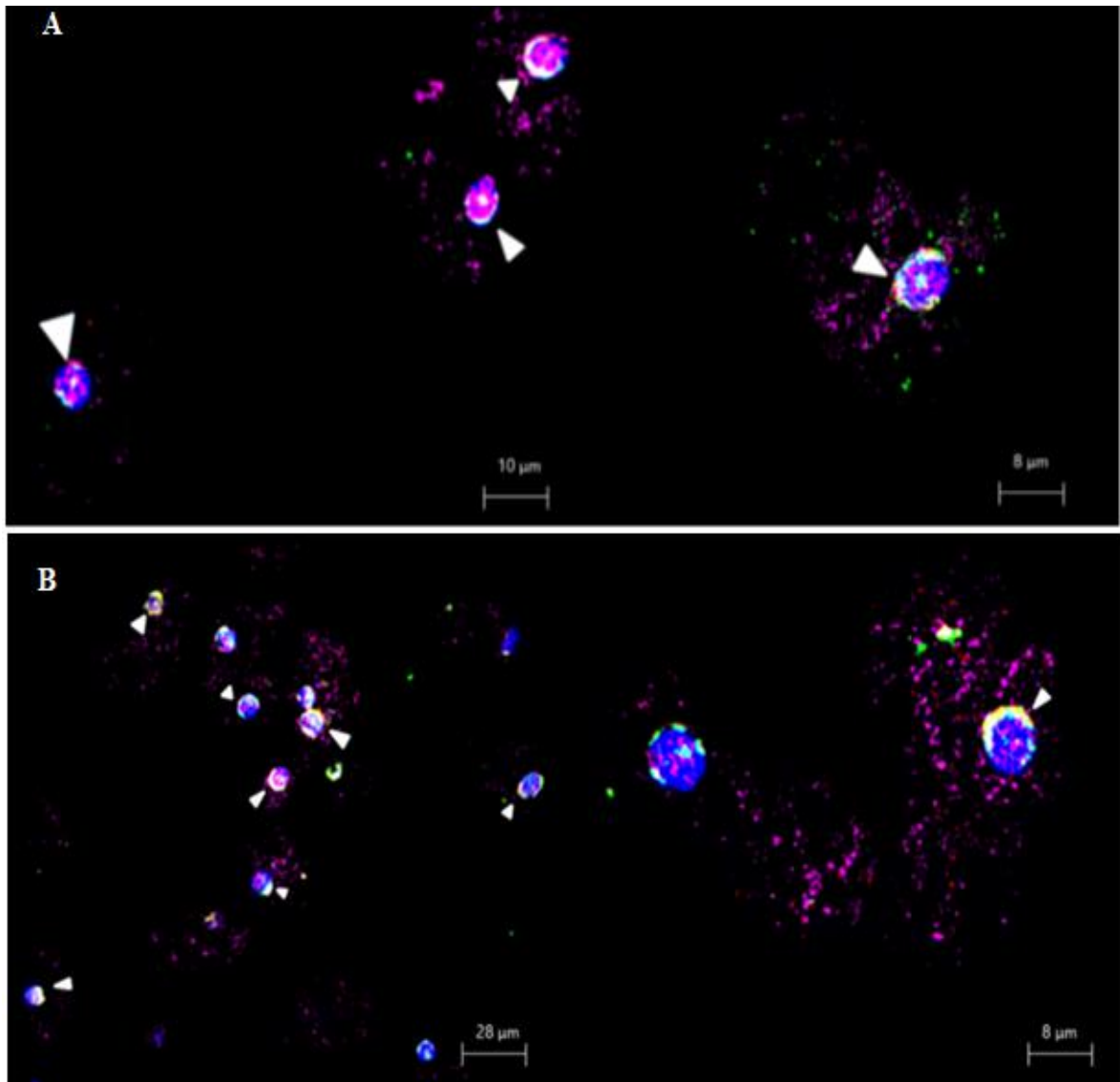
Estas proteínas conservan los dominios TRFH, como sucede en las proteínas TRF de *H. sapiens*. Este dominio de homodimerización le permite a las EhTRF-like su interacción con otras proteínas y contiene, además el dominio de unión al DNA, llamado MYB. Al analizar sus extremos N-terminal se encontraron aminoácidos de naturaleza ácida, ricos en ácido aspártico y ácido glutámico en las proteínas EhTRF-like I y EhTRF-like II, sugiriendo una mayor similitud con la proteína TRF1; en tanto que EhTRF-like III posee mayor cantidad de aminoácidos básicos lo cual coincide con las características del extremo N-terminal de la proteína TRF2.

Así mismo, en la proteína EhTRF-like III también se identificó el motivo RBM, importante para la unión de la proteína TRF2 y Rap1 del complejo *Shelterin*. Es por estas características que se ha propuesto que las proteínas EhTRF-like I y II podrían tener funciones similares a TRF1 y EhTRF-like III semejantes a TRF2 de *H. sapiens* (Fig. 16).



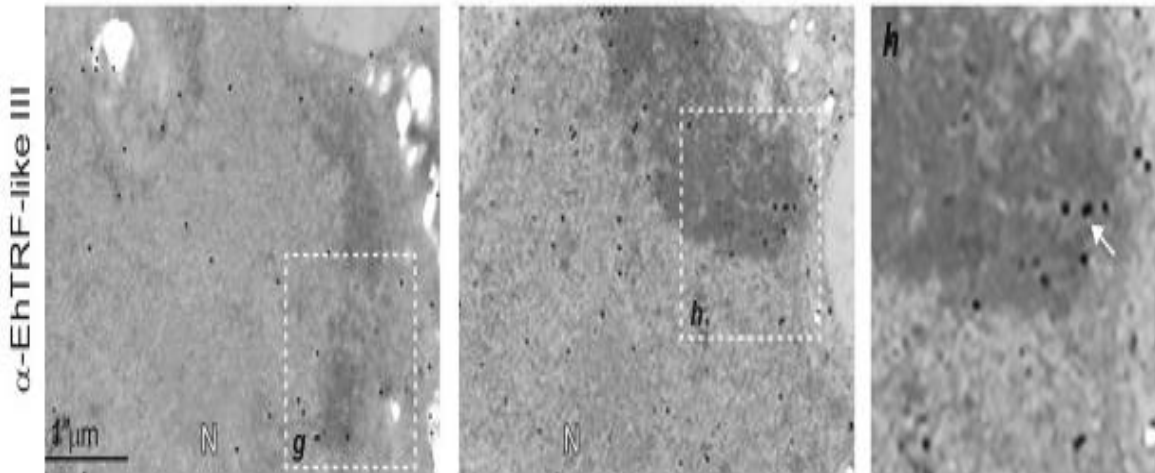
**Figura 16. Estructura de las proteínas TRF de *H. sapiens* (Hs) y *E. histolytica* (Eh).** Representación esquemática de los dominios principales de estas proteínas y las principales modificaciones postraduccionales presentes. TRFH, dominio de dimerización; NLS, señal de localización nuclear; MYB DBD, dominio de unión a DNA similar a Myb; A, N-terminal ácido; B, N-terminal básico; MW, peso molecular; y pI, punto isoeléctrico (Tomado de Rendón-Gandarilla, F., et al., 2018).

Con base a todas las características y similitudes encontradas de las proteínas EhTRF-like I, II y III con las proteínas TRF se proponen que realizan funciones similares en este parásito. Así mismo también se analizó su localización subcelular, por medio de ensayos de microscopía confocal, localizándose en la periferia nuclear junto con lámina B1, un marcador de periferia nuclear (Fig. 17A), y en *foci* donde co-localizan con la marca telomérica H4K20me3 (Fig. 17B). Estos resultados confirman su localización nuclear y su posible papel en la protección de los extremos terminales de los cromosomas de *E. histolytica*.



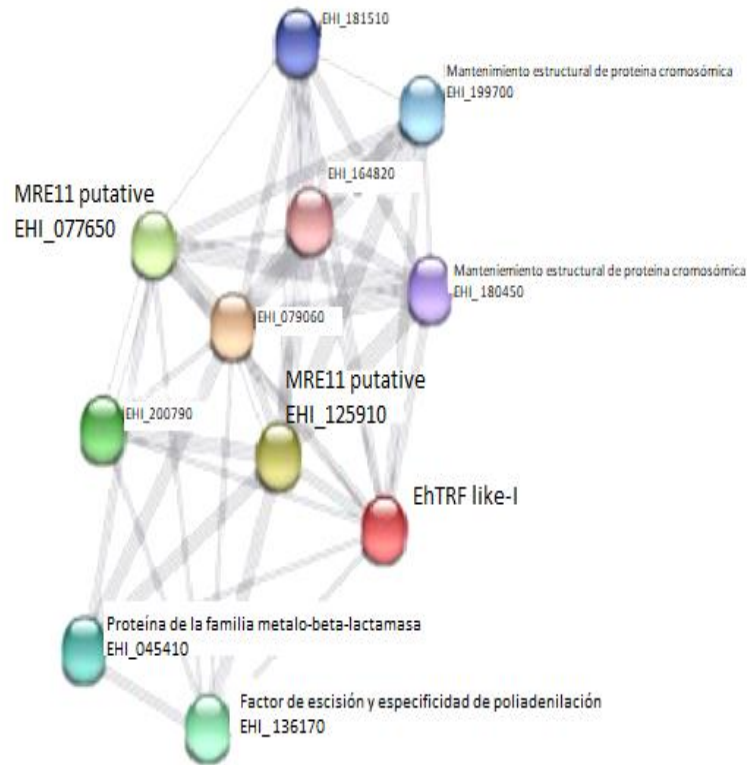
**Figura 17. Colocalización de EhTRF-like I y EhTRF-like III con lámina B1.** Trofozoítos de la clona A se incubaron con anticuerpos específicos marcados con fluoróforos. Los núcleos se contratiñeron con DAPI y se analizaron mediante microscopía confocal A) EhTRF-like I (Alexa 647, magenta) y la marca telomérica H4K20me3 (Alexa-488, verde) colocalizaron en la periferia nuclear con lámina B1 (Alexa- 555, rojo). B) EhTRF-like I (Alexa 647, magenta) y EhTRF-like III (Alexa-488, verde) colocalizaron con lámina B1 (Alexa- 555, rojo) en la periferia nuclear. Las flechas de color blanco señalan *foci* donde colocalizan las proteínas EhTRF-like I y III con la marca telomérica H4K20me3 y en la periferia nuclear con lámina B1 (Tomado de Álvarez, V., 2018).

La localización nuclear de la proteína EhTRF-like III se analizó a profundidad, utilizando microscopía electrónica de transmisión (TEM) en los trofozoítos de *E. histolytica* (Fig.18). En las imágenes se observó EhTRF-like III en regiones de heterocromatina condensada, lo cual coincide con la ubicación de regiones teloméricas (Rendón-Gandarilla, *F., et al.*, 2018).



**Figura 18. Localización de la proteína EhTRF-like III en el núcleo de trofozoítos de *E. histolytica*.** Imágenes de MET donde se utilizó el anticuerpo  $\alpha$ -EhTRF-like III. EhTRF-like III se observa claramente en los núcleos de los trofozoítos. Aumento de los núcleos donde se observa, el enriquecimiento de la proteína en regiones de heterocromatina (flecha blanca), cerca de la periferia nuclear (Tomado de Rendón-Gandarilla, *F., et al.*, 2018).

Por su parte EhTRF-like I se analizó mediante el programa STRING y en el interactoma obtenido se predicen interacciones con proteínas de mantenimiento estructural de los cromosomas; con MRE11, involucrada en la reparación de DNA de doble cadena; con una proteína de la familia metalo-beta-lactamasa, involucrada en el mantenimiento telomérico; con cinasas, las cuales estabilizan a TRF1; y con una proteína de corte y poliadenilación, involucrada en la maduración del RNA mensajero (Fig.19) (Álvarez, *V.*, 2018).



**Figura 19. Interactoma de la proteína EhTRF-like I.** Interactoma realizado con el programa STRING utilizando como referencia la secuencia de aminoácidos de la proteína EhTRF-like I con el número de acceso de UniProt C4M1I9. Se obtuvo una predicción de interacciones con dos proteínas MRE11 putativas (EHI\_077650 y EHI\_125910), las cuales están involucradas en la reparación del DNA de doble cadena, entre otras (Tomado de Álvarez, V., 2018).

Cabe destacar la interacción de EhTRF-like I con dos isoformas de la proteína MRE11, la cual está involucrada en la vía ALT. Por lo que se procedió a buscar los genes codificantes para las proteínas principales de este mecanismo en la base de datos de Amoeba DB. Interesantemente el resultado de este análisis indicó que en el genoma de *E. histolytica* se encuentran otros genes que codifican para la vía ALT (Tabla 4).

En esta búsqueda de proteínas se encontró al complejo MRN, formado por dos isoformas de EhMRE11 anotadas como proteínas putativas, EhRad50 y NBS1; las cuales están involucradas en la reparación de doble cadena del DNA, así como en la recombinación homóloga mediada por la vía ALT. La proteína WRN tiene una actividad de DNA-helicasa y juega un papel

importante en la recombinación homóloga. BLM también es una helicasa que desenrolla del DNA (Saharia, A., *et al.*, 2010).

Este hallazgo es relevante porque la presencia en el genoma de *E. histolytica* de los genes codificantes para proteínas de la vía ALT, sugiere la existencia del mecanismo de mantenimiento telomérico en este parásito. A pesar de que en este organismo como ya se explicó con anterioridad, no se ha detectado el gen que codifica para la telomerasa o secuencias teloméricas canónicas.

**Tabla 4. Proteínas de la vía ALT identificadas en *E. histolytica* (Tomado de Álvarez, V., 2018).**

<b>Proteína</b>	<b>Número de acceso*</b>	<b>Anotación</b>	<b>Peso Molecular kDa</b>
EhMRE11	EHI_125910	Proteína de reparación de doble hebra MRE-11 putativa	68.8
EhMRE11-like	EHI_077650	MRE-11 putativa	25.2
EhRad50	EHI_079960	Proteína de reparación por daño a DNA de doble hebra Rad50 ATPasa, putativa	146.4
NBS1	EHI_098770	Proteína putativa	51.5
RPA	EHI_062980	Factor de replicación A.1 putativo	66.7
Rad51	EHI_031220	Proteína de reparación del DNA Rad51 hipotética	40.5
Rad52	EHI_188230	Proteína de reparación y recombinación Rad52 putativa	26.30
WRN	EHI_023090	Helicasa recQ de DNA dependiente de ATP putativa	58.72
BLM	EHI_028890	Helicasa putativa	13.53

\*de acuerdo a AmoebaDB

### 3.9.2 MRE11 en *E. histolytica*

La proteína MRE11 es fundamental para la recombinación homóloga y constituye el punto central de la investigación del presente trabajo. El grupo de trabajo del Dr. López-Camarillo realizó un estudio sobre el mecanismo de la reparación del DNA por recombinación homóloga en *E. histolytica*, utilizando trofozoítos irradiados con UV (150J/m<sup>2</sup>). En la tabla 5 se muestran

genes de *E. histolytica* homólogos a los de levadura, del grupo de la epistasis RAD52, MRE11, RAD50 y NBS1. Estos genes están involucrados en la reparación de roturas de doble cadena de DNA por recombinación homóloga, sugiriendo que actúan como sensor primario de los DSB de DNA (López-Casamichana, M., *et al.*, 2008; López-Camarillo, C., *et al.*, 2009).

*E. histolytica* presenta dos proteínas, semejantes a MRE11 de *H. sapiens*, denominadas EhMRE11 y EhMRE11-like, de 596 y 223 aminoácidos, y con una identidad del 32 y 25% con la de humano, respectivamente EhMRE11-like es una proteína más pequeña y carece del dominio de unión a DNA. En el caso de la proteína EhRAD50, presenta una identidad del 23% con las proteínas de sus homólogos en *S. cerevisiae* y *H. sapiens*; mientras que la secuencia EhNBS1 parece ser más divergente (17 a 24% de identidad y valores de *e* de 0.003 a 0.002). *E. histolytica* también contiene genes que codifican para la recombinasa EhRAD51 y su proteína paróloga EhRAD51C. Las proteínas predichas EhRAD52, EhRAD54, EhRAD54B y EhRAD59 (EhRAD52/22 en la base de datos Pathema) también están codificadas en el genoma de *E. histolytica* (Tabla 5) (López-Casamichana, M., *et al.*, 2008).

**Tabla 5. Genes relacionados con la epistasis RAD52 y recombinación homóloga en *E. histolytica*, *H. sapiens* y *S. cerevisiae* (Tomado de López-Casamichana, M., *et al.*, 2008)**

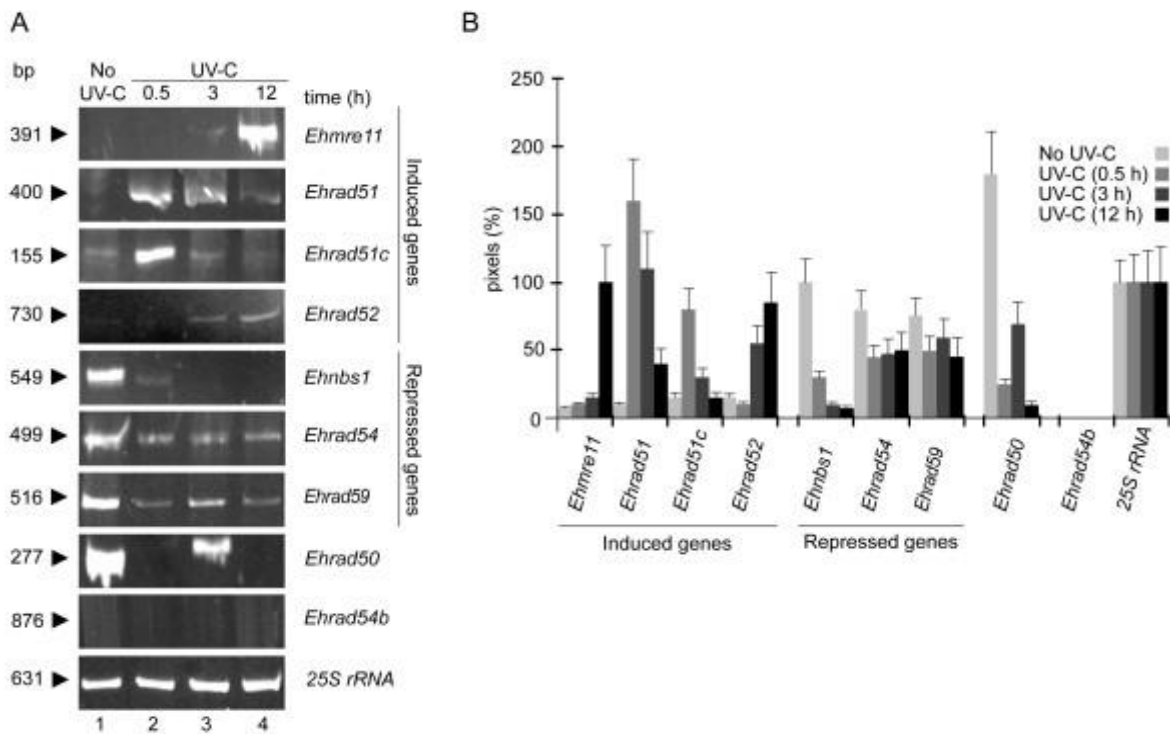
<i>Entamoeba histolytica</i>			<i>Homo sapiens</i>					<i>Saccharomyces cerevisiae</i>							
Predicted protein	Size (aa)	GeneBank ID	Locus name <sup>a</sup>	Protein	Accession number <sup>b</sup>	Size (aa)	e-value	H (%)	I (%)	Protein	Accession number <sup>b</sup>	Size (aa)	e-value	H (%)	I (%)
EhMRE11	596	<a href="#">XM_651393</a>	EHI_125910	MRE11	P49959	708	3e-49	51	32	MRE11	P32829	692	1e-33	45	26
EhMRE11-like	223	<a href="#">XM_644963</a>	EHI_077650	MRE11	P49959	708	3e-23	51	25	MRE11	P32829	692	2e-20	49	27
EhRAD50	1241	<a href="#">XM_647783</a>	EHI_079960	RAD50	Q92878	1312	2e-44	40	23	RAD50	P12753	1312	2e-43	46	27
EhNBS1	764	<a href="#">XM_647447</a>	EHI_098770	NBS1	Q6IQ31	754	0.0022	40	24	XRS2	P33301	854	e+3	28	17
EhRAD51	367	<a href="#">XM_648984</a>	EHI_031220	RAD51	Q06609	339	e-125	83	71	RAD51	P25454	400	2e-43	78	60
EhRAD51C	284	<a href="#">XM_619126</a>	EHI_122860	RAD51C	Q433502	376	3e-17	51	28	RAD57	P25301	460	e-109	47	27
-	-	-	-	RAD51B	O15315	350	-	-	-	RAD55	P38953	406	-	-	-
-	-	-	-	RAD51D	O75771	289	-	-	-	-	-	-	-	-	-
-	-	-	-	XRCC2	O43543	280	-	-	-	-	-	-	-	-	-
-	-	-	-	XRCC3	O43542	346	-	-	-	-	-	-	-	-	-
EhRAD52	243	<a href="#">XM_648599</a>	EHI_188230	RAD52	P43351	418	2e-35	71	48	RAD52	P06778	504	1e-23	57	38
EhRAD54	885	<a href="#">XM_648260</a>	EHI_103840	RAD54	Q92698	747	e-115	58	41	RAD54	P32863	898	e-106	56	37
EhRAD54B	765	<a href="#">XM_645236</a>	EHI_114930	RAD54B	Q9Y620	910	e-130	52	36	RDH54	P32863	920	e-114	55	39
EhRAD59 (EhRAD52/22 <sup>a</sup> )	190	<a href="#">XM_651011</a>	EHI_112840	-	-	-	-	-	-	RAD59	Q12223	238	2e-08	45	25

<sup>a</sup> *E. histolytica* Pathema datatabase

<sup>b</sup> Swiss-Prot/TrEMBL databases

I, identity; H, homology

La expresión de los genes del grupo de la epistasis RAD52 en respuesta a daño inducido por UV se evaluó mediante RT-PCR semicuantitativa. Los genes *Ehmre11*, *Ehrad51*, *Ehrad51c* y *Ehrad52* se transcribe a un nivel muy bajo; sin embargo, después de que los trofozoítos se irradiaron con UV, estos genes mostraron un perfil de expresión diferencial (Fig. 20, López-Casamichana, M., *et al.*, 2008). Además, en estas condiciones se presentan varias características distintivas de HR, por ejemplo: la histona H2AX se fosforila, indicando la existencia de daño en el DNA y la viabilidad celular no se afecta, sugiriendo reparación de DSB. En resumen, se puede concluir que *E. histolytica* expresa los genes que codifican para las proteínas que forman el complejo MRN y la epistasis RAD52; además presenta dos genes que codifican para la proteína MRE11, siendo estos los primeros datos sobre esta proteína en este parásito (López-Casamichana, M., *et al.*, 2008).



**Figura 20. Expresión de genes relacionados con el grupo de epistasis de RAD52 en *E. histolytica*.** A) Productos de RT-PCR obtenidos a partir de 1 µg RNA total de trofozoítos irradiados y no irradiados (no UV-C, carril 1), cosechados en diferentes momentos (UV-C; carril 2, 0.5 h; carril 3, 3h y carril 4, 12h). Las puntas de flecha indican la longitud (pb) de cada fragmento interno amplificado. B) Análisis densitométricos de los productos de RT-PCR mostrados en A. Los pixeles correspondientes al producto 24S rRNA se tomaron como 100% en cada carril. Los datos son la media de tres ensayos independientes (Tomado de López-Casamichana, M., *et al.*, 2008).

La recombinación homóloga es un mecanismo de reparación que ayuda a eliminar las rupturas de doble cadena del DNA. Además, es un mecanismo que genera diversidad genética y que es empleado por ciertos parásitos para evadir la respuesta inmune del huésped (Singh, N., *et al.*, 2013). Sin embargo, hasta ahora la HR no se había demostrado en *E. histolytica* o *E. invadens*.

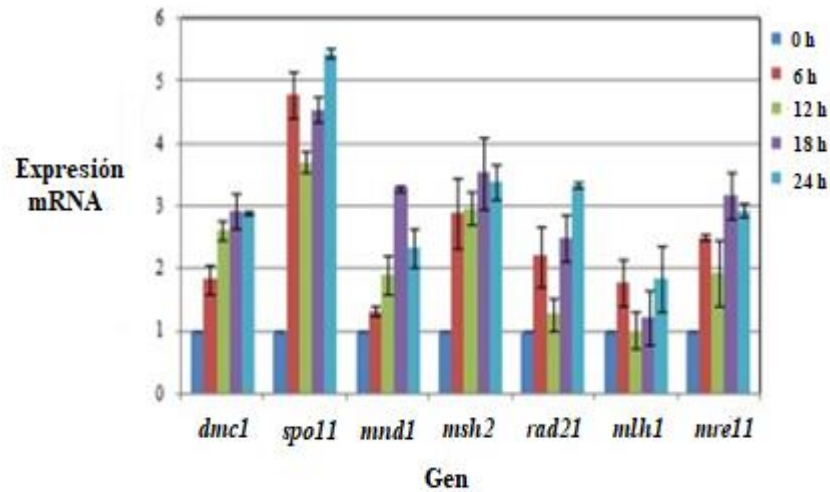
La mayoría de los estudios relacionados con HR se han llevado a cabo en organismos que van desde animales, hongos y plantas. Por lo que, basado en el modelo de estudio *S. cerevisiae*, existen eventos conservados. La HR es iniciada por los DSB de DNA, que podrían ser causados por daños del DNA o durante la meiosis por la endonucleasa SPO11. Los DSB son procesados nucleolíticamente por el complejo MRN / MRX, incluyendo a la proteína MRE11, para generar colas de cadena sencilla en los extremos 3´OH. El DNA monocatenario se asocia con proteínas específicas (Rad51) para formar un filamento de nucleoproteína que es estimulado por las proteínas HOP2-MND1 para invadir una secuencia homóloga y formar un *D-loop* intermedio (Singh, N., *et al.*, 2013). La presencia de genes específicos de HR en las secuencias del genoma sugiere la posibilidad de la presencia de este mecanismo en los parásitos. En el genoma de *E. histolytica*, algunos genes como *spo11*, *dmc1*, *mnd1* y muchos genes específicos de HR como *mre11*, *mlh1*, *msh2*, *rad21* y *rad51* están presentes, así como genes relacionados con el grupo epistático *rad52*, que se expresan diferencialmente cuando los DSB son inducidos por la radiación UV (Singh, N., *et al.*, 2013) (Tabla 6).

La recombinación homóloga también se ha descrito en otros parásitos protozoarios como *Trypanosoma*, *Plasmodium* y *Leishmania*. *P. falciparum*, ya que se han reportado homólogos para RAD51, MRE11 y RAD54. En particular, *Trypanosoma* y *Plasmodium* usan la HR para protegerse de la respuesta inmune del huésped, al inducir variación antigénica (Singh, N., *et al.*, 2013).

**Tabla 6. Proteínas y nucleótidos de genes involucrados en HR de *E. invadens* (Ei) y *E. histolytica* (Eh), encontrados mediante BLAST en las bases de datos Pathema y AmoebaDB (Tomado de Singh, N., *et al.*, 2013).**

Gene Name	Pathema ID	Super family	Conserved Domain	Yeast			Human		
				E-Value	Maximum Identity (%)	Accession No.	E-Value	Maximum Identity (%)	Accession No.
<i>EHDMC1</i> / <i>EDMC1</i>	EHL_050430EIN_249340	RecA_like NTPases	PTZ00035	1e-1221e	5252	NP011106.	3e-1369e-	6060	NP008999.
				-120		1NP011106.1	137	2NP008999.2	
<i>EHSPO11</i> / <i>ESPO1</i> <i>1A</i> / <i>ESPO1</i> <i>1B</i>	EHL_125320EIN_220180EIN_137380	TP6A_N &TOPRIM	PRK04342COG1 697PLN00060	7e-073e-	242926	EDV09027.	4e-211e-232e-	272828	NP937998.
				043e-09		1EGAS8462.1 NP011841.1	15	1NP937998.1 NP0365	
<i>EHMND1</i> / <i>EMND1</i>	EHL_120310EIN_051380	COG5124	Mnd1	1e-112e-	2726	NP011332.	1e-533e-	4341	NP115493.
				08		2NP011332.2	47	1NP115493.1	
<i>EHMLH1</i> / <i>EMLH1</i>	EHL_129950EIN_037260	HATPases_C &ToPolI_MutL_trans	MutL, MutL, mutL	2e-816e-	2927	ABC86942.	1e-782e-	2642	NP001245200.
				77		1AAA16835.1	79	1NP001245200.1	
<i>EHMRE11</i> / <i>EMRE11</i>	EHL_125910EIN_156370	MPP	Metallophos	1e-399e-	2626	EGA60925.	9e-581e-	3232	AAC78721.
				43		1EDV11715.1	56	1AAC78721.1	
<i>EHRAD21</i> / <i>ERAD21</i>	EHL_093880EIN_038720	Rad21_ RecB_N	Putative conserved	2e-091e-	4431	GAA22237.	6e-383e-	5227	AAI57892.
				10		1CAA88356.1	41	1AAI57892.1	
<i>EHMSH2</i> / <i>EMSH2</i>	EHL_172750EIN_047820	MutS_III &ABC_ ATPases	MUTSd	3e-1212e-	3938	AAA34802.	3e-1289e-	3938	NP001245210.
				-119		1CAY86200.1	123	1NP001245210.1	

Las células sometidas a una variedad de tensiones pueden sufrir daños en el DNA, lo que es un desencadenante de la HR. Así la inanición nutricional en *E. histolytica* puede ser un desencadenante para la diferenciación de trofozoíto en quiste, por lo que se ha estudiado las respuestas celulares en estas condiciones. Bhattacharya y colaboradores mediante análisis de qRT-PCR, analizaron el efecto de la inanición de suero sobre la expresión de genes de HR en *E. histolytica* (Fig.21). Para esto, se seleccionaron genes candidatos que cumplen una función específica en la recombinación, como la formación de DSB (SPO11), el emparejamiento de cromátidas hermanas (RAD21), la resección de extremos después de DSB (MRE11), en la formación de filamento de nucleoproteína (RAD51, DMC1), la estabilización del filamento presináptico (MND1), en la reparación del desajuste durante la invasión de la cadena (MSH2) y la resolución de HJ (MLH) (Singh, N., *et al.*, 2013). Estos genes presentaron cambios en su expresión durante diferentes tiempos de cultivo, lo cual podría relacionarse con un posible papel en la recombinación, durante el ciclo celular.



**Figura 21. Expresión de genes de recombinación homóloga en *E. histolytica*.** Análisis de RT-PCR en tiempo real en trofozoítos de *E. histolytica* control y sometidos a inanición de suero durante diferentes tiempos (0, 6, 12, 18 y 24 h). Se muestran los niveles relativos de RNAm de genes meióticos específicos como *spo11*, *dmc1* y *mnd1* (Tomado de Singh, N., *et al.*, 2013).

Además, Kelso y colaboradores en el año 2017 confirmaron que en el genoma de *E. histolytica* contiene la mayoría de los genes centrales de la recombinación homóloga (Tabla 7) (Kelso, A., *et al.*, 2017). Así estos trabajos demuestran que *E. histolytica* posee genes que codifican para proteínas involucradas en la HR; así mismo, estos genes cambian sus niveles de expresión en respuesta al ayuno de suero. El estudio de estos genes ayudará a inferir la presencia del mecanismo de HR en este parásito, el cual podría estar relacionado con eventos importantes como la diferenciación celular en el enquistamiento y en el mantenimiento telomérico mediante la vía ALT (Singh, N., *et al.*, 2013). Conocer si *E. histolytica* utiliza la HR, es importante ya que muchos parásitos protozoarios, utilizan esta vía para adaptarse a las condiciones ambientales y evadir los sistemas inmunes del huésped.

*E. histolytica* es responsable de la disentería amebiana y el absceso hepático amebiano, que tiene síntomas que van desde diarrea leve hasta disentería grave. El tratamiento universal consiste en metronidazol o tinidazol, seguido de paromomicina y otros fármacos activos contra los quistes presentes (Bhattacharya, A., *et al.*, 2013).

**Tabla 7. Proteínas involucradas en la recombinación homóloga identificadas en parásitos protozoarios (Tomado de Kelso, A., et al., 2017)**

Function	<i>Homo sapiens</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>Entamoeba histolytica</i>	<i>Trypanosoma brucei</i>	<i>Plasmodium falciparum</i>	<i>Leishmania major</i>
DSB End Resection	MRE11	Mre11	C4LVX7	Q8T8P1-?	A0A1C3KMQ6	E9ADG7
	RAD50	Rad50	N9V1K1	Q384J8	C6KSQ6	Q4Q8L7
	NSB1	Xrs2	?	?	?	?
Single-strand DNA Binding	RPA1-RPA2-RPA3	Rfa1-Rfa2-Rfa3	?-?-?	?-?-?	A0A1C3KN47/A0A1C3KQ72	?-?-?
Recombinase (Meiosis-specific)	RAD51	Rad51	Q86C17*	Q384K0*	Q8IIS8	O61127
Accessory Proteins	DMC1	Dmc1	C4LTR6*	Q38E34*	A0A1C3KPB3	O61128
	RAD54	Rad54	C4LVM6*	Q385M5	Q8IAN4	Q4QH75
	RAD54B	Rdh54	N9TAM9	?	?	?
	RAD55	Rad55	?	?	?	?
	RAD57	Rad57	?	?	?	?
	-	RAD59	?	?	?	?
	HOP2	Hop2	?	?	?	?
	MND1	Mnd1	M3TLC0	?	C6S3J7	Q4QAN2
Single-Strand Annealing	RAD52	Rad52	C4M197	?	?	?
Mediator	BRCA2	Rad52	N9TSL7	Q4GZF5	?	Q4QD38

\*Indicates characterized enzymes parasites.  
 ?Indicates no known homolog.

En los últimos años, los estudios de la recombinación homóloga ha abarcado el uso de inhibidores contra proteínas involucradas en la HR. Muchas terapias actuales contra el cáncer, como la radiación y la quimioterapia, están diseñadas para inducir daños en el DNA y provocar una respuesta apoptótica. Al dirigirse a las principales enzimas como RAD51, RAD54 y BRCA2, la susceptibilidad de las células cancerosas podría aumentar cuando se combina con otras terapias que dañan el DNA. Se podría argumentar de manera análoga la focalización de las enzimas involucradas en la HR en los parásitos protozoarios, que dependen de la HR para diversas adaptaciones ambientales, evasión inmune del huésped y resistencia a los medicamentos (Kelso, A., et al., 2017).

Con base en los resultados anteriores y considerando que la recombinación homóloga es el mecanismo por el cual se lleva a cabo la vía ALT, en el presente trabajo se planteó estudiar a la proteína EhMRE11 de *E. histolytica*, con la finalidad de que este conocimiento contribuya a dilucidar el mecanismo de mantenimiento telomérico en este parásito. Este trabajo inició con la

expresión de la proteína EhMRE11 en trofozoítos de *E. histolytica* en condiciones basales. Así mismo, mediante microscopia confocal se determinó su localización subcelular, seguido de la co-localización con las proteínas EhTRF-like I y III, H4K20me3, lámina B1, PCNA y Rad50 en los posibles cuerpos APB. Además, para evidenciar la posible presencia de la vía ALT en este parásito, se utilizó al inhibidor VE-821 y su efecto sobre localización de EhMRE11 en el núcleo de trofozoítos. Adicionalmente, mediante ensayos de inmuprecipitación se analizó la posible interacción de EhMRE11 con EhTRF-like III. Los resultados obtenidos con estas herramientas, permitió sugerir un posible mecanismo de mantenimiento telomérico en *E. histolytica*.

#### **4. HIPÓTESIS**

Si la proteína EhMRE11 colocaliza en el núcleo con EhTRF-like I y EhTRF-like III y los trofozoítos presentan sensibilidad al inhibidor específico VE-821, se tendrían indicios de la existencia de la Vía de Alargamiento Alternativo de Telómeros (ALT) en *Entamoeba histolytica*.

#### **5. JUSTIFICACIÓN**

Se ha sugerido que los cromosomas de *E. histolytica* contienen telómeros, debido a la presencia de secuencias repetidas tipo STR y aunque no se ha reportado la presencia del gen codificante para telomerasa, si se han descrito algunos genes codificantes de proteínas que participan en el mantenimiento telomérico como EhTRFs y EhMRE11.

Los organismos eucariotas no solo mantienen sus telómeros mediante telomerasa, sino que también emplean un mecanismo alternativo (ALT) que involucra la recombinación homóloga. Por lo tanto, es posible que los telómeros de *E. histolytica* se puedan mantener siguiendo esta vía ALT, con la participación de las proteínas EhTRFs y EhMRE11.

Por lo tanto, la colocalización de EhMRE11 con EhTRF-like I y EhTRF-like III podría sugerir que estas proteínas estarían involucradas en el mantenimiento telomérico. Además, la sensibilidad al inhibidor específico de la vía ALT (VE-821), sugeriría la presencia de esta vía en *E. histolytica*.

## **6. OBJETIVOS**

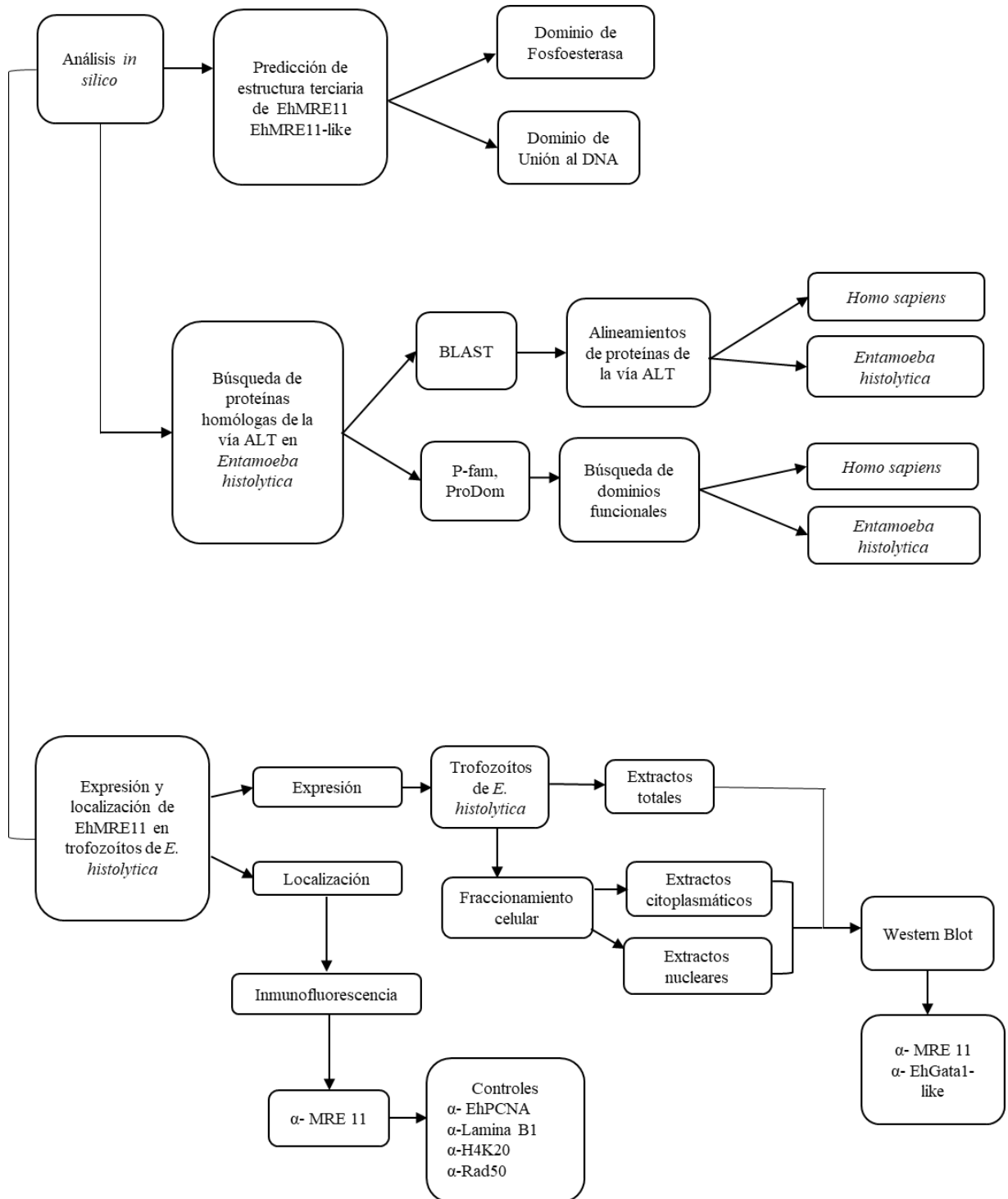
### **6.1 Objetivo General**

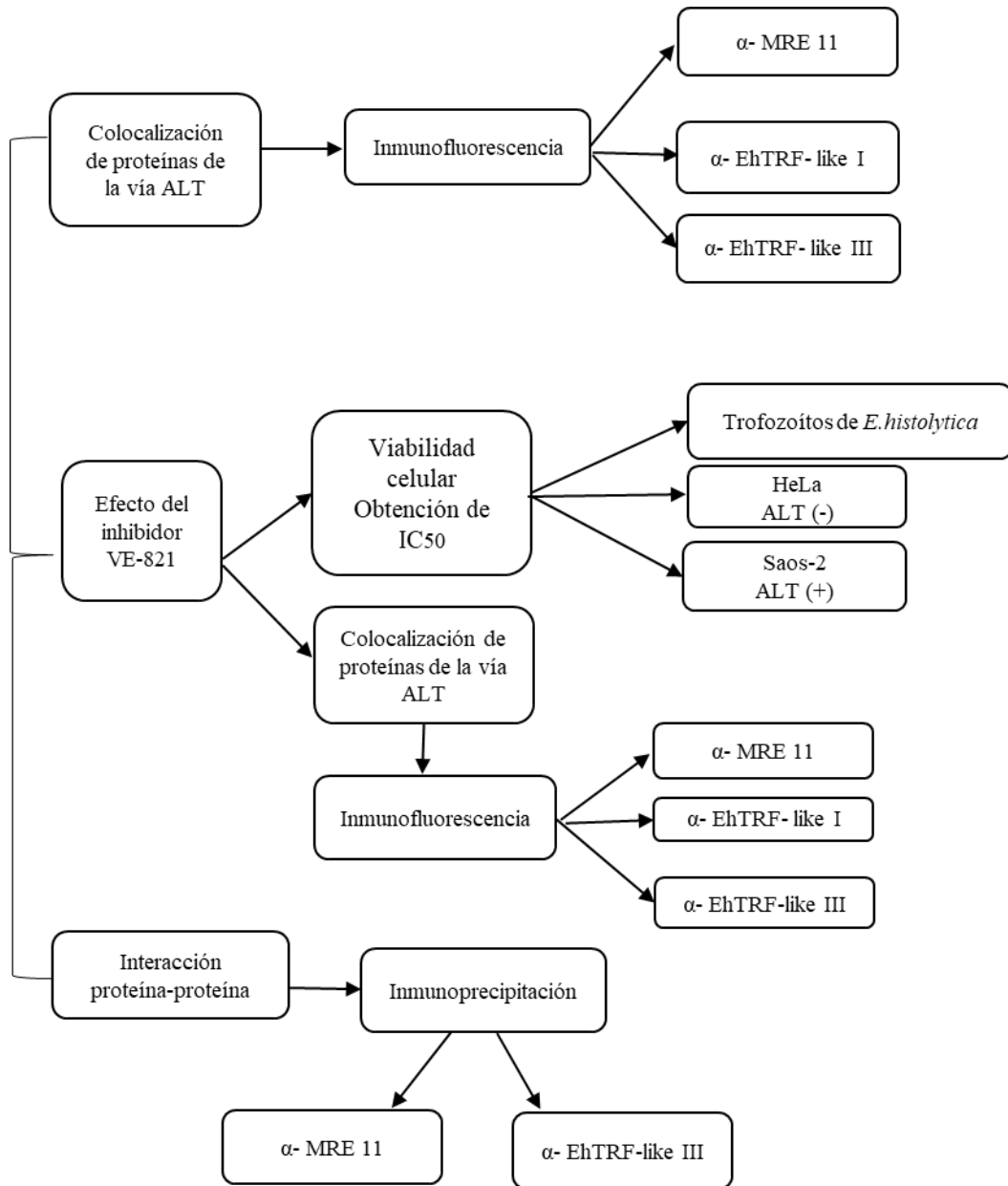
Analizar la expresión y localización subcelular de EhMRE11 y su participación en la vía ALT en *Entamoeba histolytica*

### **6.2 Objetivos Particulares**

- I.** Analizar la secuencia de aminoácidos de la proteína EhMRE11 en *E. histolytica* mediante herramientas bioinformáticas.
- II.** Identificar *in silico* las proteínas homólogas de la vía ALT en *E. histolytica*.
- III.** Determinar la expresión y localización subcelular de EhMRE11 en trofozoítos de *E. histolytica*.
- IV.** Evaluar la co-localización de las proteínas EhMRE11, EhTRF-like 1y EhTRF-like III en *foci* nucleares en *E. histolytica*.
- V.** Analizar el efecto del inhibidor VE-821 sobre la viabilidad celular y la co-localización de EhMRE11, EhTRF-like I y EhTRF-like III en *E. histolytica*.
- VI.** Determinar la interacción entre EhMRE11 con EhTRF-like III.

## 7. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL





## 8. MATERIALES Y MÉTODOS

### 8.1 Análisis bioinformático de la proteína EhMRE11

Las secuencias de aminoácidos en formato FASTA de las proteínas EhMRE11, EhMRE11-like y MRE11 se obtuvieron de la base de datos de UniProt (<https://www.uniprot.org/>) y de la base de datos AmoebaDB (<http://amoebadb.org/amoeba/>) respectivamente y se analizaron para buscar sus dominios funcionales utilizando el programa P-fam (<https://pfam.xfam.org/>). Así mismo se realizaron alineamientos empleando el programa Clustal Omega en la página del EMBL-EBI (<https://www.ebi.ac.uk>) para identificar residuos conservados. La predicción de la estructura terciaria se realizó mediante el servidor ROBETTA (<http://rosetta.bakerlab.org/>). Para analizar y visualizar los modelos de las estructuras se utilizó el programa UCFS Chimera.

### 8.2 Búsqueda bioinformática de proteínas homólogas de la vía ALT en *E. histolytica*

Para la identificación de los genes que codifican para proteínas involucradas en la vía ALT en el genoma de *E. histolytica* se realizaron búsquedas mediante blastp (proteinprotein BLAST) (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE=Proteins>) utilizando como sondas las secuencias de aminoácidos de las proteínas de *H. sapiens*. Las secuencias de aminoácidos de estas proteínas en *E. histolytica* se obtendrán de la base de datos AmoebaDB (<http://amoebadb.org/amoeba/>) y se analizaron para buscar sus dominios funcionales utilizando el programa P-fam (<https://pfam.xfam.org/>). Así mismo se realizaron alineamientos empleando el programa Clustal Omega en la página del EMBL-EBI (<https://www.ebi.ac.uk>) para identificar residuos conservados.

### 8.3 Cultivo de trofozoitos de *E. histolytica*

Los trofozoítos de la cepa HM1: IMSS se cultivaron a 37°C en tubos en medio TYI-S33 (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 estreptomicina 35 µg/mL (SIGMA). Para realizar los experimentos, se usaron trofozoítos en

fase de crecimiento logarítmica, los cuales se incubaron en un baño de hielo durante 10 min y se cosecharon por centrifugación a 1700 rpm durante 5 min a 4°C.

#### **8.4 Obtención de extractos totales de los trofozoítos de *E. histolytica***

Para obtener las proteínas totales se cosecharon los trofozoítos de *E. histolytica* (HMI: IMSS) y se lavaron en PBS 1X pH 6.8 a 1700 rpm por 5 min. Posteriormente, se realizó el conteo celular en una cámara Neubauer y se hicieron alicuotas de  $3 \times 10^6$  de células en tubos eppendorf, se centrifugaron con 100  $\mu$ L buffer de RIPA (20 mM Tris-HCl (pH 7.5), 2  $\mu$ L de E64 10mM (Sigma-Aldrich) y 5 $\mu$ L de Coctel de inhibidores 50x cOmp<sup>TM</sup> Protease Inhibitor Cocktail (Sigma-Aldrich) para poder realizar ciclos de congelamiento-descongelamiento, se centrifugaron a 5 min a 17000 rpm a 4°C y se recuperaron los sobrenadantes. Los extractos obtenidos se cuantificaron por el método de Bradford y se analizó su integridad por SDS-PAGE.

#### **8.5 Obtención de extractos citoplasmáticos 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 se utilizaron trofozoítos en fase de crecimiento logarítmica, se incubaron en un baño de agua-hielo durante 10-15min, para ser despegadas de las paredes de cultivo, luego se cosecharon por centrifugación a 1700 rpm durante 5 min a 4°C y se lavaron en 1 ml de PBS 1X pH 6.8. Las pastillas de células se resuspendieron en 400  $\mu$ l 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  $1 \times 10^6$  trofozoítos mezclando suavemente. Luego de 5 a 10 min, se añadió 25 $\mu$ L de NP40 al 10% por cada  $1 \times 10^6$  trofozoítos. Éstos se agitaron vigorosamente en el vórtex durante 30s. y se centrifugaron a 14000 rpm durante 10 min. El sobrenadante se transfirió a nuevos tubos. Se re-suspendió 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 re-suspendió en 100  $\mu$ L buffer de RIPA (20 mM Tris-HCl (pH 7.5). 150 mM NaCl, 1 mM Na<sub>2</sub>EDTA. 1 mM EGTA. 1% NP-40) y fueron sonicados para clarificarlos utilizando 3 ciclos de 30s con amplificación de 80%, Estos extractos se cuantificaron por el método de Bradford y se analizó su integridad por SDS-PAGE.

## **8.6 Cuantificación de proteínas**

La cuantificación de las proteínas obtenidas se realizó utilizando el reactivo del kit Protein Assay II (Bio- Rad) 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 papel Whatman # 1 para remover partículas precipitadas. También se preparó una solución concentrada de BSA. Posteriormente, en una placa de 96 pozos se adicionaron 200µL de la solución diluida de Bradford a cada pozo considerando los pozos para la curva para las muestras por triplicado. Se adicionaron 10µL de cada punto de la curva y de muestra proteica en el pozo correspondiente, se incubó la placa a temperatura ambiente durante 5 min. Transcurrido el tiempo de incubación se midió la absorbancia a 595nm en un lector de ELISA y con base a las lecturas se determinó la cantidad de proteína a cargar en los geles de SDS-PAGE.

## **8.7 SDS-PAGE**

Para determinar la expresión y localización de la proteína EhMRE11, los extractos antes obtenidos se separaron por electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE): 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 %. 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 2 h. Posteriormente, las proteínas separadas por SDS-PAGE se transfirieron a membranas de nitrocelulosa.

## **8.8 Transferencia de las proteínas separadas por SDS-PAGE a membranas de nitrocelulosa**

Las membranas de nitrocelulosa y los papeles de Whatman se incubaron durante 5 min en solución de transferencia de proteína (20% metanol, 10% Tris-Glicina). Posteriormente, se utilizó la cámara de transferencia para permitir migrar a las proteínas del polo negativo al positivo, de esta manera se transfirió 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 dejó correr a 20 Volts por 20 min. 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. Se lavaron las membranas con PBS-Tween 20 al 0.1% para retirar el colorante. Una vez transferidas las proteínas a las membranas, estas se incubaron durante toda la noche en una solución bloqueadora, que contenía 5% de leche descremada (Svelty) en PBS-Tween 20 al 0.1%. Se utilizó el anticuerpo monoclonal de ratón IgG producido contra los aminoácidos 3-194 de MRE11 de origen humano (Cat. No. sc-135992 Santa Cruz Biothecnology) a una dilución de 1:1000 en una solución de albumina al 1% con PBS-Tween 1X y se dejó 16 h en agitación a temperatura de 4°C. Después las membranas se lavaron durante 1h con PBS-Tween 1X y se adicionó al anticuerpo secundario acoplado a peroxidasa (anti-IgG de ratón) diluido 1:3000 en una solución de PBS-Tween 1X y leche descremada al 1.5% por 1h 30 min a 37°C en agitación; las membranas se lavaron durante 1h con PBS-Tween 1X, se adiciona peroxidasa Luminata Forte HRP (Cat. No. WBLUF0100 Millipore) y se dejó incubando 5min para visualizar las membranas en el equipo ChemiDoc MP (BIO-RAD) para detectar a la proteína.

### **8.9 Ensayos de inmunolocalización de la proteína EhMRE11, con EhTRF-like I y EhTRF-like III.**

Para determinar la localización de la proteína EhMRE11 en los trofozoítos de *E. histolytica*, éstos se centrifugaron a 1700 rpm durante 5 min a 4 °C, y se añadieron 800,000 trofozoítos en 200 µL 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 estériles. Las placas se incubaron durante 30 min a 37°C para adherir las células, enseguida se les retiró el medio y se permeabilizaron con etanol absoluto a -20 °C por 20 min y se lavaron 3 veces con PBS pH 6.8 filtrado y se adicionó 1 mL de NH<sub>4</sub>Cl a 50 mM incubándose por 30 min a 37°C. Se retiró el NH<sub>4</sub>Cl y las preparaciones se bloquearon con una solución de BSA al 1% a 37°C durante 30min para evitar uniones inespecíficas. Posteriormente, se adicionó el anticuerpo α-MRE11 1:100 y se incubó a 4°C toda la noche. Al día siguiente se realizaron tres lavados con PBS pH 6.8 filtrado y se incubó durante 1 h con el anticuerpo secundario de ratón acoplado al fluorocromo Isotiocianato de fluoresceína (FITC) a 37°C, cubierto de la luz. Se realizaron tres

lavados con PBS 6.8 filtrado para finalmente montar los cubreobjetos en portaobjetos estériles con 10  $\mu$ L de Vectashield DAPI (Vector Laboratories) para teñir el núcleo. Las preparaciones se observaron en un microscopio confocal Leica (SP2). Las imágenes obtenidas se procesaron y analizaron usando el programa Image J.

Para los ensayos de colocalización se emplearon los anticuerpos  $\alpha$ -EhTRF-like I,  $\alpha$ -EhTRF-like III marcados con Alexa-647, Alexa-488 respectivamente y  $\alpha$ -MRE11 con el anticuerpo secundario de ratón acoplado al fluorocromo tetrametilrodamina (TRITC), utilizando las siguientes diluciones  $\alpha$ -EhTRF-like I (1:50),  $\alpha$ -EhTRF-like III (1:200), y  $\alpha$ -MRE11 (1:100) durante toda la noche. Posteriormente, se realizaron tres lavados con PBS pH 6.8 filtrado para después montar los cubreobjetos en portaobjetos estériles con 10  $\mu$ L de Vectashield DAPI (Vector Laboratories) para así contra teñir el núcleo. Las preparaciones se observaron en un microscopio confocal Leica (SP2) en CINVESTAV. Las imágenes obtenidas se procesaron y analizaron usando el programa Image J.

## **8.10 Ensayos con el inhibidor VE-821**

### **8.10.1 Cultivo de la línea celular Saos-2 y HeLa.**

La línea celular Saos-2 proveniente de osteosarcoma de humano la cual tiene activada la vía ALT, se sembró en frascos para cultivo celular CellBIND®, con 10 ml de medio Dulbecco's Modified Eagle's Medium (D-MEM) y suero fetal bovino al 15% (SFB, Gibco, USA). La línea celular HeLa, la cual no tiene activada la vía ALT y proveniente de un carcinoma cervical se sembró con 10 mL de medio Dulbecco's Modified Eagle's Medium (D-MEM) y 5 % de suero de ternera neonata (STN, Gibco, USA). Los cultivos se mantuvieron a ciertas condiciones: 37 °C, 5 % de CO<sub>2</sub> y una atmósfera húmeda a saturación en incubadora (Nuair USA). Para la realización de los ensayos se utilizaron cultivos de células tumorales en fase de crecimiento exponencial a una densidad celular del 70 % (Morgan y Darling, 1993).

### **8.10.2 Determinación de la IC<sub>50</sub> del inhibidor VE-821 en líneas tumorales Saos-2 y HeLa**

Se sembraron 10,000 células en placas de 96 pocillos y se incubaron durante toda la noche. Las células del día siguiente se trataron con concentraciones crecientes (0,5, 1, 2, 4, 8 y 16  $\mu$ M) del

inhibidor de ATR VE-821 disuelto en DMSO. La determinación del número celular se realizó por la técnica de incorporación del colorante cristal violeta de acuerdo a Kueng *et al.*, (1989). Brevemente, esta técnica consistió en retirar el medio de cultivo de la placa de 96 pozos, e inmediatamente las células se fijaron con glutaraldehído al 1.1 % (Sigma- Aldrich. USA) por 20 min, al término del tiempo, se retiró el fijador, se realizaron dos lavados a la caja con agua destilada y se dejaron secar al aire, posteriormente se tiñeron las células con el colorante cristal violeta al 0.1 % (Sigma- Aldrich. USA) por 20 min, posteriormente se retiró el exceso de colorante a través de lavados con agua destilada, nuevamente, se dejó secar al aire. Por último, el colorante se solubilizó en ácido acético al 10 % en agitación por 20 min, para finalmente medir la absorbancia a 590 nm en un lector tipo ELISA. Los resultados se graficaron en una curva dosis-respuesta.

### **8.10.3 Determinación de la IC<sub>50</sub> del inhibidor VE-821 en los trofozoitos de *E. histolytica*.**

Las células se sembraron en placas de 24 pocillos con diferentes cantidades de células para determinar el número necesario para obtener una confluencia del 70-90%. Las células se trataron con concentraciones crecientes (1, 2.5, 5, 10, 12.5, 15, 17.5, 20  $\mu$ M) del inhibidor de ATR, VE-821 disuelto en DMSO. La determinación del número celular se realizó mediante el colorante azul de tripano. Este es un colorante empleado para evaluar la viabilidad de células por exclusión de captación, ya que no puede penetrar y teñir a las células vivas con membranas íntegras; por lo que ayuda a diferenciar células muertas. Los resultados se graficaron en una curva dosis-respuesta.

### **8.10.4 Ensayos de microscopia confocal en trofozoitos de *E. histolytica***

Una vez establecida la IC<sub>50</sub> para el inhibidor VE-821 en *E. histolytica* se analizó su efecto sobre la colocalización de las proteínas EhTRF-like I, EhTRF-like III, y EhMRE11. Para ello se realizaron ensayos de inmunofluorescencia de acuerdo al protocolo ya descrito. Las preparaciones se observaron en un microscopio confocal Leica (SP2) en el CINVESTAV. Las imágenes obtenidas se procesaron y se analizarán usando el programa Image J.

### **8.11 Ensayos de inmunoprecipitación para identificar la interacción entre las proteínas EhMRE11 y EhTRF-like III**

Para corroborar la interacción entre las proteínas EhMRE11 y EhTRF-like III se realizaron ensayos de inmunoprecipitación para ello se utilizaron cultivos de trofozoítos de la cepa HMI: IMSS, se enfriaron y se cosecharon en un tubo de 50mL. Posteriormente se lavaron dos veces a 4° C y centrifugando a 1,500 rpm durante 5 min, con 30 mL de PBS pH 6.8 tibio, antes de la última centrifugación se tomó una alícuota para contar las células en una cámara Neubauer y se hicieron alícuotas de  $3 \times 10^6$  de células en tubos eppendorf, se centrifugaron con 100  $\mu$ L buffer de RIPA (20 mM Tris-HCl (pH 7.5), 2  $\mu$ L de E64 10mM (Sigma-Aldrich) y 5 $\mu$ L de Coctel de inhibidores 50x cOmple™ Protease Inhibitor Cocktail (Sigma-Aldrich) para poder realizar ciclos de congelamiento-descongelamiento, se centrifugaron a 5 min a 17000 rpm a 4°C y se recuperaron los sobrenadantes. Para iniciar el protocolo de inmunoprecipitación se utilizó el kit SureBeads™ Proteín G Magnetic Beads (Bio Rad), el cual se incubó con el anticuerpo monoclonal de ratón IgG producido contra los aminoácidos 3-194 de MRE11 de origen humano (Santa Cruz Biothecnology) durante 1 hr a 4° C en agitación constante, las cuáles se lavaron 3 veces con 1mL de PBS-Tween 20 al 0.1% a pH 7.4 magnetizando y descartando sobrenadante. Posteriormente, se les adicionó 100  $\mu$ g del extracto total 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  $\mu$ g de anticuerpo  $\alpha$ -MRE11 con las perlas durante 1 h 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  $\mu$ g) obtenido en el pre clarificado se adicionó a las perlas conteniendo el anticuerpo  $\alpha$ -MRE11 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  $\mu$ 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 ser transferidas a una membrana de nitrocelulosa para inmunodetectarse con el anticuerpo anti  $\alpha$ -MRE11 y  $\alpha$ -EhTRF-like III .

## **9. RESULTADOS**

### **9.1 Análisis *in silico* de la proteína EhMRE11 y EhMRE11-like en *E. histolytica***

Con la finalidad de conocer si *E. histolytica* posee la proteína MRE11, se realizó una búsqueda utilizando como sonda a la proteína MRE11 de *H. sapiens* obtenida de la base de datos UniProt y mediante la herramienta Blast, en la base de datos de AmoebaDB (Fig. 22). Los resultados mostraron que en el genoma de este parásito se encuentran dos genes que codifican para dos proteínas similares a MRE11 de *H. sapiens*. Estas proteínas se denominaron EhMRE11 y EhMRE11-like, presentaron una identidad del 33% y 25% y un valor  $e$  2.00E-25 y 2.00E-20, respectivamente. Una vez identificados los genes que codifican para las proteínas EhMRE11 y EhMRE11-like, las secuencias de aminoácidos de las proteínas obtenidas de la base de datos AmoebaDB se analizaron para identificar la presencia de sus dominios funcionales mediante el programa P-fam. En la proteína EhMRE11-like de 223 aa se identificó solo el dominio de fosfoesterasa, el cual tiene actividad de exonucleasa/endonucleasa. Por su parte, EhMRE11 de 595 aa conserva los dominios de fosfoesterasa y el dominio de unión al DNA como su homólogo en *H. sapiens* (Fig. 22). Posteriormente, se alinearon las secuencias de aminoácidos de las proteínas EhMRE11 y EhMRE11-like de *E. histolytica* y MRE11 de *H. sapiens* empleando la herramienta ClustalW. En este alineamiento se observó que los 4 motivos de fosfoesterasa (I-IV) están conservados tanto en EhMRE11 como en EhMRE11-like (Fig. 22). De manera interesante, los residuos críticos para la actividad de nucleasa D20, D29, H217 y H247 están conservados en ambas. En el caso del dominio de unión a DNA solo se encuentra conservado en la proteína EhMRE11 (Fig. 22). Finalmente se realizó la predicción de la estructura terciaria de las proteínas EhMRE11 y EhMRE11-like, mediante el servidor ROBETTA. Sin embargo, solo se determinó la estructura del dominio de fosfoesterasa de ambas proteínas (Fig. 23). El modelo obtenido con un valor de confianza de 0.94 muestra que el dominio de fosfoesterasa de la proteína EhMRE11 conserva las 7 alfa-hélices presentes en el dominio fosfoesterasa de *H. sapiens*. Estos resultados demostraron que el genoma de *E. histolytica* codifica para dos proteínas similares a MRE11 de *H. sapiens*, así mismo demostrando que las dos proteínas de este parásito conservan dominios funcionales.

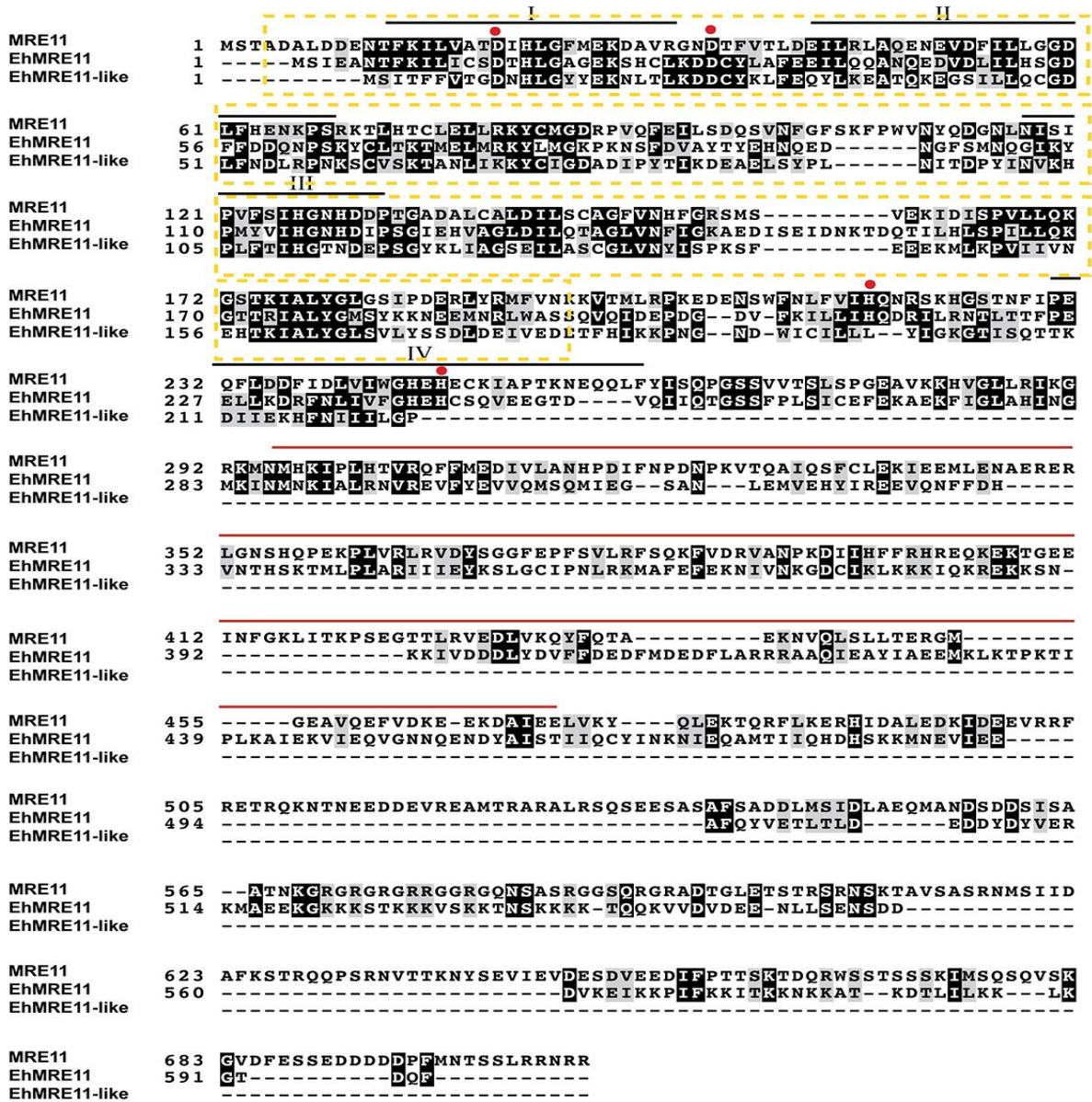
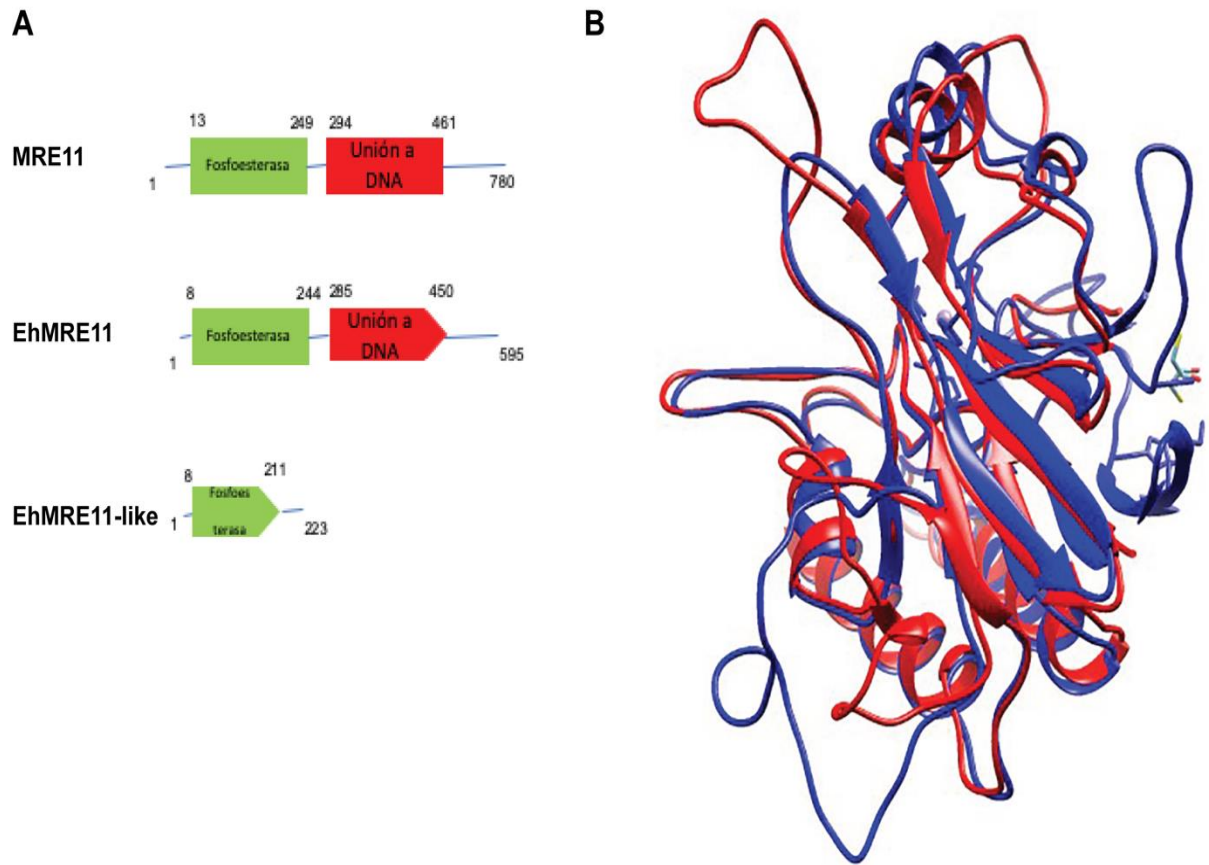


Figura 22. Alineamiento de proteínas MRE11 de *E. histolytica* y MRE11 y *H. sapiens*. Se realizó un alineamiento de la secuencia de aminoácidos de EhMRE11 (C4LVX7), EhMRE11-like (C4M8N7) y MRE11 (P49959), mediante la herramienta Clustal W. Los residuos que son idénticos en las secuencias se resaltan en fondo negro. Las barras negras ilustran la posición del dominio conservado de fosfoesterasa, que incluye desde el 8 a los 249 aminoácidos. Las barras de color rojo ilustran la posición del dominio de unión al DNA que se encuentra desde el 285 a los 461 aminoácidos. Este dominio se conserva en la proteína EhMRE11. Los puntos rojos representan aminoácidos importantes para los motivos de fosfodiesterasa (D358, D398, H706 and H792). El recuadro amarillo señala los aa reconocidos por el anticuerpo monoclonal anti-MRE11.



**Figura 23. Proteínas MRE11 de *E. histolytica* y *H. sapiens*.** A) Dominios conservados de la proteína MRE11 de *H. sapiens* y las proteínas EhMRE11 y EhMRE11-like de *E. histolytica*. Se observa el dominio de fosfoesterasa en verde y el dominio de unión a DNA en rojo. B) Alineamiento estructural del dominio de fosfoesterasa mediante el servidor ROSETTA de MRE11 (azul) y EhMRE11 (rojo).

## **9.2 Búsqueda *in silico* de las proteínas homólogas de la vía ALT en *E. histolytica*.**

Con el objetivo de determinar la presencia de la vía ALT en este parásito, se realizó una búsqueda de proteínas homólogas involucradas en esta vía (Tabla 8). Para ello se utilizaron como sondas las proteínas de *H. sapiens* obtenidas de la base de datos UniProt y, se realizaron búsquedas mediante la herramienta Blast en la base de datos de AmoebaDB. Los resultados mostraron que en el genoma de este parásito se encuentran la mayoría de los genes que codifican para proteínas involucradas en esta vía. Se identificaron 51 genes de los 59 descritos para esta vía, con una identidad que varía del 12 al 48% y un valor de E comprendido entre 6.00E-04 y 2.00E-179. En la Tabla 8 se describen a las proteínas que consideramos más relevantes, como proteínas involucradas en la respuesta de daño al DNA (DDR) y la reparación del DNA, entre ellas ATM y ATR, las cuales hasta la fecha no habían sido identificadas en este protozoario. La presencia del gen codificante para la proteína ATR es importante debido a que es el principal blanco del inhibidor VE-821. También fue posible identificar a un posible homólogo de la proteína NBN, lo cual podría indicar la presencia del complejo MRN y su papel en la recombinación homóloga, como ya se ha descrito en *H. sapiens* (Nabetani, A., *et al.*, 2010). Previamente se ha descrito que la vía ALT se lleva a cabo en los cuerpos APB, por lo que al analizar el genoma de este organismo también se identificaron los genes codificantes para las proteínas PML y SP100 (Tabla 8), constituyentes de los cuerpos APB (Jiang, WQ., *et al.*, 2005). Así mismo, se identificaron genes que codifican para proteínas relacionadas con la heterocromatina telomérica, conocidas como CBX1, CBX3 y CBX5. Estas proteínas son componentes de la heterocromatina y reconocen a la histona H3K9me, que es una marca de represión epigenética típica de regiones de DNA telomérico. Finalmente, también se identificaron los genes que codifican para las topoisomerasas, las cuales son proteínas necesarias para evitar el efecto topológico de la cromatina y sobre las cuales recientemente se ha demostrado que el inhibidor VE-821 bloquea su actividad (Williamson C. *et al.*, 2016.).

**Tabla 8. Proteínas involucradas en la vía ALT identificadas en *E. histolytica***

<b>PROTEÍNAS DEL COMPLEJO <i>SHELTERIN</i></b>									
Nombre de la proteína	<i>Homo sapiens</i>			<i>Entamoeba histolytica</i>					
	Función	N° de acceso	Núm. de aa	Locus	UniProt	Anotación	% de Identidad	Valor E	Núm. de aa
POT1	Proteína 1 de protección de los telómeros	Q9NUX5	634	ND					
TERF2IP	Proteína 1 que interactúa con TERF2	Q9NYB0	399	ND					
TINF2	Factor nuclear 2 que interactúa con TERF1	Q9BSI4	451	EHI_109980	C4M3L6	Proteína hipotética	6%	5.90E+00	680
TERF1	Factor de unión a repeticiones teloméricas 1	P54274	439	EHI_148140	C4LSY4	Proteína hipotética	44%	2.00E-07	460
TERF2	Factor de unión a repeticiones teloméricas 2	Q15554	542	EHI_001090	C4M1I9	Proteína hipotética	37%	3.00E-07	404
<b>PROTEÍNAS ASOCIADAS A TELOMERASA</b>									
STN1	Subunidad STN1 del complejo CST	Q9H668	368	EHI_181140	C4M602	Proteína hipotética con dominio conservado	8%	2.70E+00	219
TEP1	Componente de la proteína telomerasa 1	Q99973	2,627	EHI_171280	C4M6P6	Subunidad de proteína de unión a nucleótidos de guanina beta 2, putativo	27%	5.00E-17	320
<b>RESPUESTA AL DAÑO DEL DNA (DDR)</b>									
ATM	Proteína-serina cinasa ATM	Q13315	3,056	EHI_017670	C4M3H1	Proteína hipotética	30%	3.00E-83	2,457
ATR	Proteína serina/treonina cinasa	Q13535	2,644	EHI_197310	C4LVE7	Familia de fosfatidilinositol 3- y 4-cinasas	28%	8.00E-64	2,284
TP53BP1	Proteína de unión a TP53 1	Q12888	1,972	ND					

TESIS

HUS1	Proteína de punto de control HUS1	O60921	280	EHI_118290	C4LZ11	Proteína hipotética	18%	4.00E-06	260
MDC1	Mediador de la proteína 1 del punto de control del daño del DNA	Q14676	2,089	ND					
NSMCE2	E3 SUMO - proteína ligasa NSE2	Q96MF7	247	EHI_068180	C4LU11	Proteína hipotética conservada	28%	7.00E-12	222
RAD1	Proteína del punto de control del ciclo celular RAD1	O60671	282	EHI_178700	C4LUT4	Proteína hipotética con dominio conservado	44%	3.80E+00	396
RAD9A	Proteína del punto de control del ciclo celular RAD9A	Q99638	391	EHI_186880	C4LVQ5	Proteína hipotética	8%	2.00E+00	225
RAD17	Proteína del punto de control del ciclo celular RAD17	O75943	681	EHI_082050	C4M5T7	Proteína hipotética	28%	9.00E-14	430
RIF1	Proteína asociada a los telómeros RIF1	Q5UIP0	2,472	EHI_121500	C4M927	Proteína hipotética	31%	4.70E+00	1,542
SMC5	Proteína 5 de mantenimiento estructural de cromosomas	Q8IY18	1,101	EHI_106280	C4M392	Proteína que contiene el dominio RecF / RecN / SMC	30%	4.00E-130	1,027
SMC6	Proteína 6 de mantenimiento estructural de cromosomas	Q96SB8	1,091	EHI_033700	C4M433	Proteína que contiene el dominio RecF / RecN / SMC	49%	5.00E-97	1,023
<b>REPARACIÓN DE RUPTURA DE DOBLE CADENA (DSBR)</b>									
BLM	Proteína del síndrome de Bloom	P54132	1,417	EHI_028890	C4M4V5	Helicasa de la familia RecQ, putativa	39%	8.00E-122	1,182

TESIS

FANCA	Proteína del grupo A de anemia de Fanconi	O15360	1,455	EHI_124870	C4M981	Proteína con dominio HEAT	5%	1.90E+00	549
FANCD2	Proteína D2 del grupo de anemia de Fanconi	Q9BXW9	1,451	EHI_017600	C4M3G5	Proteína fosfatasa Ser/Thr, putativo	6%	6.10E+00	532
BRIP1	Proteína del grupo J de anemia de Fanconi	Q9BX63	1,249	EHI_054240	C4M6T8	Helicasa de reparación del DNA, putativo	29%	4.00E-68	1,033
FANCL	Proteína ubiquitina-ligasa E3 FANCL	Q9NW38	375	EHI_190430	C4M9T6	Proteína hipotética con dominio conservado	33%	1.10E-02	1,407
H2AFX	Histona H2AX	P16104	143	EHI_188960	C4M2W3	Histona H2A, putativa	61%	1.00E-37	159
PARP2	Poli (ADP-ribosa) polimerasa 2	Q9UGN5	583	EHI_136960	C4M5X0	Poli (ADP-ribosa) polimerasa, putativa	32%	1.00E-67	891
<b>PROTEÍNAS DE RECOMBINACIÓN HOMÓLOGA (HR)</b>									
BRCA1	Proteína de susceptibilidad a cancer de mama tipo 1	P38398	1,863	EHI_168070	C4M4Q4	Proteína que contiene dedos de zinc	40%	6.00E-07	229
MRE11	Proteína de reparación de rotura de doble hebra MRE11	P49959	708	EHI_125910	C4LVX7	Proteína putativa de reparación de rotura de doble hebra MRE11	33%	2.00E-57	595
				EHI_077650	C4M8N7	MRE11, putativa	25%	2.00E-20	223
MUS81	Endonucleasa MUS81	Q96NY9	551	ND					
NBN	Nibrin	O60934	754	EHI_098770	C4M874	Proteína hipotética	12%	6.00E-04	442
RAD50	Proteína de reparación de DNA, RAD50	Q92878	1,312	EHI_079960	C4M2L7	Proteína hipotética con	48%	5.00E-49	1,241

						dominio conservado			
RAD51	Proteína de reparación del DNA homólogo 1	Q06609	339	EHI_031220	C4M4K4	Proteína de reparación del DNA RAD51, putativa	70%	2.00E-167	366
RAD51D	Proteína de reparación del DNA homólogo 4	O75771	328	EHI_031220	C4M4K4	Proteína de reparación del DNA RAD51, putativa	30%	1.00E-15	366
RAD52	Proteína de reparación del DNA homólogo RAD52	P43351	418	EHI_188230	C4M197	Proteína de reparación y recombinación del DNA, RAD52 putativa	48%	2.00E-43	242
RPA2	Proteína A de replicación de DNA, subunidad de 32kDa	P15927	270	EHI_147000	C4M8T1	Proteína hipotética	3%	2.80E-02	149
RPA1	Proteína A de replicación de DNA, subunidad 70kDa	P27694	616	EHI_062980	C4M8G6	Proteína A putativa	28%	4.00E-34	588
WRN	Helicasa del Síndrome de Werner dependiente a ATP	Q14191	1,432	EHI_023090	C4LUM1	Familia de helicasa RecQ	37%	6.00E-73	509
XRCC3	Proteína de reparación del DNA, XRCC3	O43542	346	EHI_122860	C4M5L7	Proteína de reparación del DNA, RAD51 putativa	27%	1.00E-09	283
<b>PROTEÍNAS DE LOS CUERPOS PML</b>									
MORC3	Proteína 3 de dedo de zinc tipo CW de la familia MORC	Q14149	939	ND					
PML	Proteína PML	P29590	882	EHI_025870	B1N4D7	Proteína hipotética	25%	4.00E-05	672

TESIS

SP100	Antígeno nuclear Sp-100	P23497	879	EHI_045480	C4LTF9	Proteína que contiene dominio HMG	42%	6.00E-13	111
<b>HETEROCROMATINA</b>									
CBX1	Homólogo 1 de la proteína Chromobox	P83916	185	EHI_200710	C4M3X7	Proteína hipotética	39%	3.00E-08	580
CBX3	Homólogo 3 de la proteína Chromobox	Q13185	183	EHI_200710	C4M3X7	Proteína hipotética	35%	2.00E-80	580
CBX5	Homólogo 5 de la proteína Chromobox	P45973	191	EHI_200710	C4M3X7	Proteína hipotética	35%	3.00E-05	580
<b>TOPOISOMERASAS</b>									
TOP2A	DNA Topoisomerasa II alfa	P11388	1,531	EHI_120640	Q6RCM0	DNA Topoisomerasa II, putativa	48%	0.00E+00	1,349
TOP3A	DNA Topoisomerasa III alfa	Q13472	1,001	EHI_038920	C4LZR4	DNA Topoisomerasa III, putativa	44%	2.00E-179	607
<b>ENDONUCLEASAS</b>									
ERCC1	Proteína de reparación por escisión de DNA ERCC-1	P07992	297	EHI_126160	C4LW01	Proteína de reparación por escisión de DNA, putativa	14%	1.00E-13	238
FEN1	Endonucleasa Flap 1	P39748	380	EHI_099740	C4M6G8	Nucleasa Flap, putativa	51%	4.00E-135	376
ERCC4	Endonucleasa de reparación de DNA, XPF	Q92889	916	EHI_148310	C4LT01	Endonucleasa de reparación de DNA, putativa	23%	1.00E-38	882
<b>CO-REGULADOR DE LA TRANSCRIPCIÓN</b>									
NRIP1	Proteína que interactúa con	P48552	1,158	EHI_022990	C4LUL2	Proteína hipotética	9%	2.40E+00	1,005

	el receptor nuclear 1								
<b>FACTORES NUCLEARES</b>									
NR2F1	Factor de transcripción COUP 1	P10589	423	ND					
NR2F2	Factor de transcripción COUP 2	P24468	414	EHI_138750	C4M4I1	Cinasa-tirosina, putativa	23%	2.50E-01	1,088
MLX	Proteína Max-like X	Q9UH92	298	EHI_058500	C4M5F6	Familia Peptidasa, C54	10%	4.70E+00	325
<b>PROTEÍNA NUCLEAR</b>									
PCNA	Antígeno nuclear de células proliferativas	P12004	261	EHI_128450	C4M9R9	Antígeno nuclear de células proliferativas, putativo	35%	9.00E-52	262
<b>SUPRESOR DE TUMORES</b>									
TP53	Antígeno tumoral celular p53	P04637	393	EHI_023420	Q868M8	Proteína hipotética conservada, p53	30%	6.00E-49	430
<b>REGULADOR DE SPLICING</b>									
HNRNPA2B1	Ribonucleoproteína nucleares heterogéneas A2/B1	P22626	353	EHI_056660	C4M9T1	Proteína de unión a RNA, TIA-1 putativa	24%	2.00E-12	306
<b>CINASA</b>									
CDKN1A	Inhibidor de la cinasa dependiente de ciclina 1	P38936	164	ND					
<b>PROTEÍNA DEL CICLO CELULAR</b>									
CDK2	Cinasa 2 dependiente de ciclina	P24941	298	EHI_065280	C4M6K6	Proteína de división celular, cinasa 2 putativa	52%	1.00E-107	291

PROTEÍNA DE CHOQUE TÉRMICO									
CDC37	Hsp90 co-chaperona Cdc37	Q16543	378	EHI_168850	B1N3F6	Proteína hipotética	29%	2.50E+00	167

Una vez detectados los genes que codifican para las proteínas involucradas en la vía ALT, las secuencias de aminoácidos de las proteínas obtenidas de la base de datos AmoebaDB se analizaron mediante el programa P-fam y se identificaron sus dominios funcionales. Los resultados mostraron que las proteínas involucradas en la respuesta al daño de DNA (DDR), proteínas de los cuerpos PML, de heterocromatina y topoisomerasas, conservan algunos de sus dominios funcionales, cuando se compararon con sus homólogos de *H. sapiens* (Tabla 9)

Por ejemplo, en el caso de la proteína similar a ATR se identificaron los dominios PI3\_P14 cinasa y FATC, los cuales son relevantes para su actividad enzimática. Cabe destacar que el dominio PI3\_P14, además es la región blanco del inhibidor VE-821.

En cuanto a las proteínas del complejo MRN, es interesante que *E. histolytica* tenga dos proteínas homólogas a MRE11, de las cuales solo una conserva el dominio de con actividad de exonucleasa y endonucleasa y, la otra proteína contiene todos los dominios funcionales, tal y como su homólogo en *H. sapiens*. En el caso de Rad50, la cual ya había sido descrita por López-Casamichana, 2008, solo conserva el dominio AAA\_23, relacionado con la actividad de ATPasa y carece del dominio *zinc-hook*. En el caso de la proteína NBS1 solo conserva el dominio FHA el cual tiene un papel crucial para el reconocimiento de la histona H2AFX y para la relocalización del complejo of MRE11/RAD50 durante el reconocimiento del daño al DNA o el mantenimiento de la longitud telomérica (Tabla 9).

En tanto que las proteínas putativas Sp-100 y PML de *E. histolytica* carecen de los dominios funcionales presentes en sus contrapartes humanas. En el caso de las proteínas relacionadas con la heterocromatina, las identificadas en este parásito conservan el dominio CHROMO, el cual está relacionado con la condensación de la cromatina (Tabla 9).

Finalmente, las topoisomerasas mantienen casi todos sus dominios funcionales, especialmente la homóloga a la topoisomerasa 2A, que además es blanco del inhibidor VE-821 (Tabla 9).

En resumen, se puede concluir que como resultado de este análisis *in silico* se identificaron los genes que codifican para proteínas claves de la vía ALT, en el genoma de *E. histolytica*. La identificación de estas proteínas podría explicar algunas de las características de los cromosomas de *E. histolytica*, por ejemplo la variación en el tamaño en las regiones subteloméricas y teloméricas y la variación de las regiones que codifican para tRNA, las cuales contienen diferentes repetidos STR. Además, la presencia de este mecanismo podría contribuir al mantenimiento telomérico en este parásito; sin embargo, es necesario demostrar la expresión de estas proteínas en futuros trabajos.

**Tabla 9. Dominios funcionales presentes en la proteína de la vía ALT identificadas en *E. histolytica***

<i>Homo sapiens</i>	<i>Entamoeba histolytica</i>
<b>PROTEÍNAS DEL COMPLEJO SHELTERIN</b>	
<p>POT1</p> 	ND
<p>TERF2IP (RAP-1)</p> 	ND
<p>TINF2</p> 	Proteína hipotética
<p>TERF1</p> 	Proteína hipotética
<p>TERF2</p> 	Proteína hipotética
<b>PROTEÍNAS ASOCIADAS A TELOMERASA</b>	
<p>STN1</p> 	Proteína hipotética con dominio conservado
<p>TEP1</p> 	Subunidad de proteína de unión a nucleótidos de guanina beta 2, putativa
<b>RESPUESTA AL DAÑO DEL DNA (DDR)</b>	
<p>ATM</p> 	Proteína hipotética
<p>ATR</p> 	Familia de fosfatidilinositol 3- y 4- cinasas

TP53BP1	ND
HUS1	Proteína hipotética
MDC1	ND
NSMCE2	Proteína hipotética conservada
RAD1	Proteína hipotética con dominio conservado
RAD9A	Proteína hipotética
RAD17	Proteína hipotética
RIF1	Proteína hipotética
SMC5	Proteína que contiene el dominio RecF/RecN/SMC
SMC6	Proteína que contiene el dominio RecF/RecN/SMC
<b>REPARACIÓN DE RUPTURA DE DOBLE CADENA (DSBR)</b>	
BLM	Helicasa de la familia RecQ, putativa
FANCA	Proteína con dominio HEAT
FANCD2	Proteína fosfatasa Ser/Thr, putativa
BRIP1	Helicasa de reparación del DNA, putativa

<p>FANCL</p>	<p>Proteína hipotética con dominio conservado</p>
<p>H2AFX</p>	<p>Histona H2A, putativa</p>
<p>PARP2</p>	<p>Poli(ADP-ribosa) polimerasa, putativa</p>
<p><b>RECOMBINACIÓN HOMÓLOGA (HR)</b></p>	
<p>BRCA1</p>	<p>Proteína que contiene dedos de zinc</p>
<p>MRE11</p>	<p>Proteína putativa de reparación de rotura de doble hebra, MRE11</p> <p>MRE11, putativa</p>
<p>MUS81</p>	<p>ND</p>
<p>NBN</p>	<p>Proteína hipotética</p>
<p>RAD50</p>	<p>Proteína hipotética con dominio conservado</p>
<p>RAD51</p>	<p>Proteína de reparación del DNA RAD51, putativa</p>
<p>RAD51D</p>	<p>Proteína de reparación del DNA RAD51, putativa</p>

# TESIS

<p><b>RAD52</b></p>	<p>Proteína de reparación y recombinación del DNA RAD52, putativa</p>
<p><b>RPA2</b></p>	<p>Proteína hipotética</p>
<p><b>RPA1</b></p>	<p>Proteína A putativa</p>
<p><b>WRN</b></p>	<p>Familia de helicasas RecQ</p>
<p><b>XRCC3</b></p>	<p>Proteína de reparación del DNA RAD51 C, putativa</p>
<b>CUERPOS PML</b>	
<p><b>MORC3</b></p>	<p>ND</p>
<p><b>PML</b></p>	<p>Proteína hipotética</p>
<p><b>SP100</b></p>	<p>Proteína que contiene dominio HMG</p>
<b>HETEROCROMATINA</b>	
<p><b>CBX1</b></p>	<p>Proteína hipotética</p>
<p><b>CBX3</b></p>	<p>Proteína hipotética</p>
<p><b>CBX5</b></p>	<p>Proteína hipotética</p>
<b>TOPOISOMERASAS</b>	
<p><b>TOP2A</b></p>	<p>DNA Topoisomerasas II, putativa</p>

# TESIS

ENDONUCLEASAS	
<p>ERCC1</p>	<p>Proteína de reparación por escisión de DNA, putativa</p>
<p>FEN1</p>	<p>Nucleasa Flap, putativa</p>
<p>ERCC4</p>	<p>Endonucleasa de reparación de DNA, putativa</p>
CO-REGULADOR DE LA TRANSCRIPCIÓN	
<p>NRIP1</p>	<p>Proteína hipotética</p>
FACTOR NUCLEAR	
<p>NR2F1</p>	<p>ND</p>
<p>NR2F2</p>	<p>Cinasa-tirosina, putativa</p>
<p>MLX</p>	<p>Familia Peptidasa, C54</p>
PROTEÍNA NUCLEAR	
<p>PCNA</p>	<p>Antígeno nuclear de células proliferativas, putativa</p>
SUPRESOR DE TUMORES	
<p>TP53</p>	<p>Proteína hipotética conservada, p53</p>
REGULADOR DE SPLICING	
<p>HNRNPA2B1</p>	<p>Proteína de unión a RNA, TIA-1 putativa</p>

CINASA	
<p>CDKN1A</p>	ND
CICLO CELULAR	
<p>CDK2</p>	<p>Proteína de división celular, cinasa 2 putativa</p>
PROTEÍNA DE CHOQUE TÉRMICO	
<p>CDC37</p>	<p>Proteína hipotética</p>

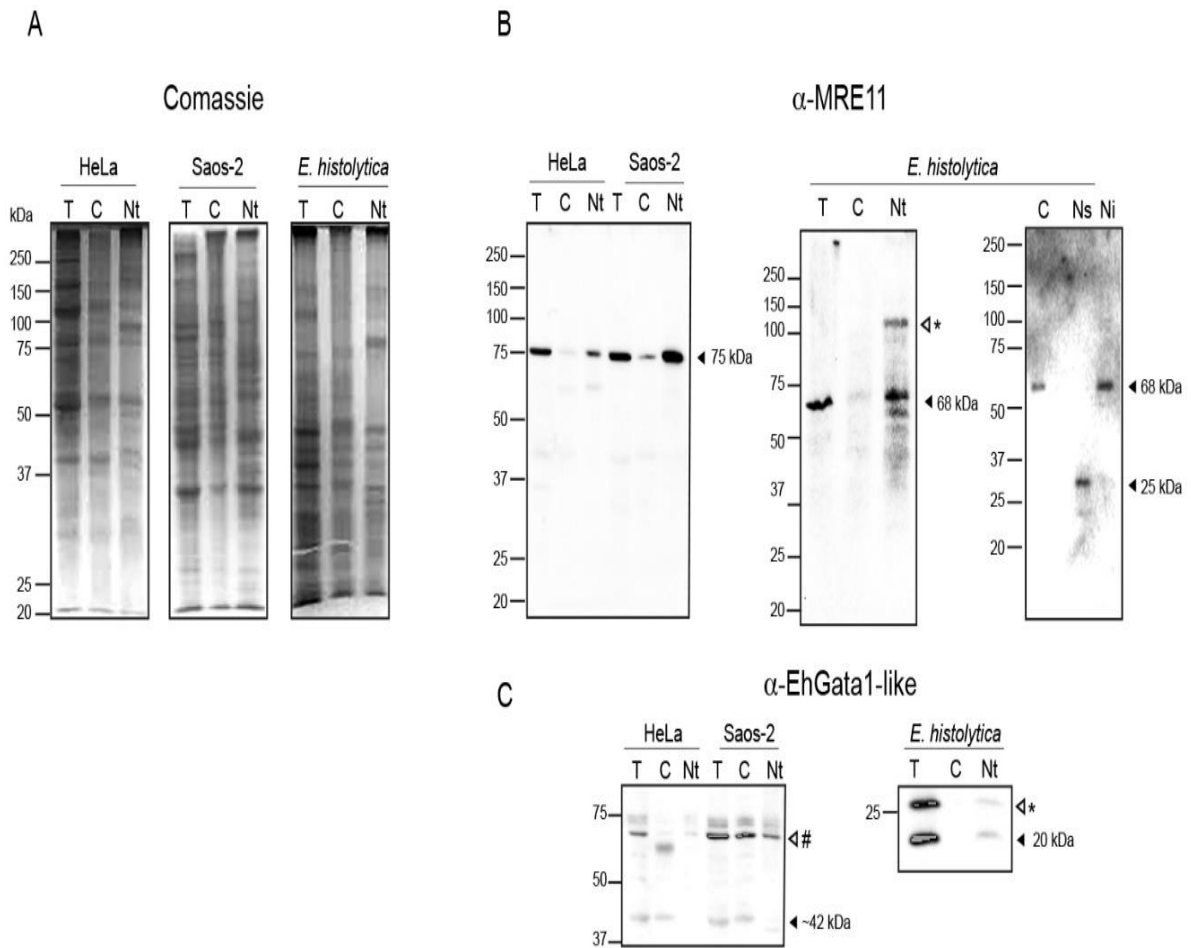
### 9.3 Determinar la expresión y localización de EhMRE11 en trofozoítos de *E. histolytica*.

El análisis *in silico* sugiere la presencia de dos proteínas tipo MRE11 en este parásito, pero para demostrar su expresión se realizaron ensayos de inmunodetección empleando el anticuerpo monoclonal comercial anti-MRE11. Este anticuerpo está dirigido contra un péptido que incluye los aminoácidos 3-194 de MRE11 de origen humano (Santa Cruz Biotechnology) (Fig. 22), los cuales están conservados en las proteínas EhMRE11 y EhMRE11-like. En estos ensayos se usaron extractos totales, citoplasmáticos y nucleares de trofozoítos de *E. histolytica*, y como controles positivos se obtuvieron lisados de las líneas tumorales Saos-2 y HeLa. Los extractos proteínicos se separaron en geles SDS-PAGE al 10% y se analizó su integridad mediante una tinción con azul de Coomassie. En estos geles se comprobó la integridad de las proteínas obtenidas, con un patrón que incluyó proteínas de alto y bajo peso molecular, así como concentraciones similares en cada uno de los extractos analizados (Fig. 24A).

Posteriormente, estos geles se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa y se llevaron a cabo los ensayos de inmunodetección (Fig. 24B-C). Como control del fraccionamiento, las membranas se re-inmudetectaron con el anticuerpo  $\alpha$ -EhGata 1-like, ya que es un factor de

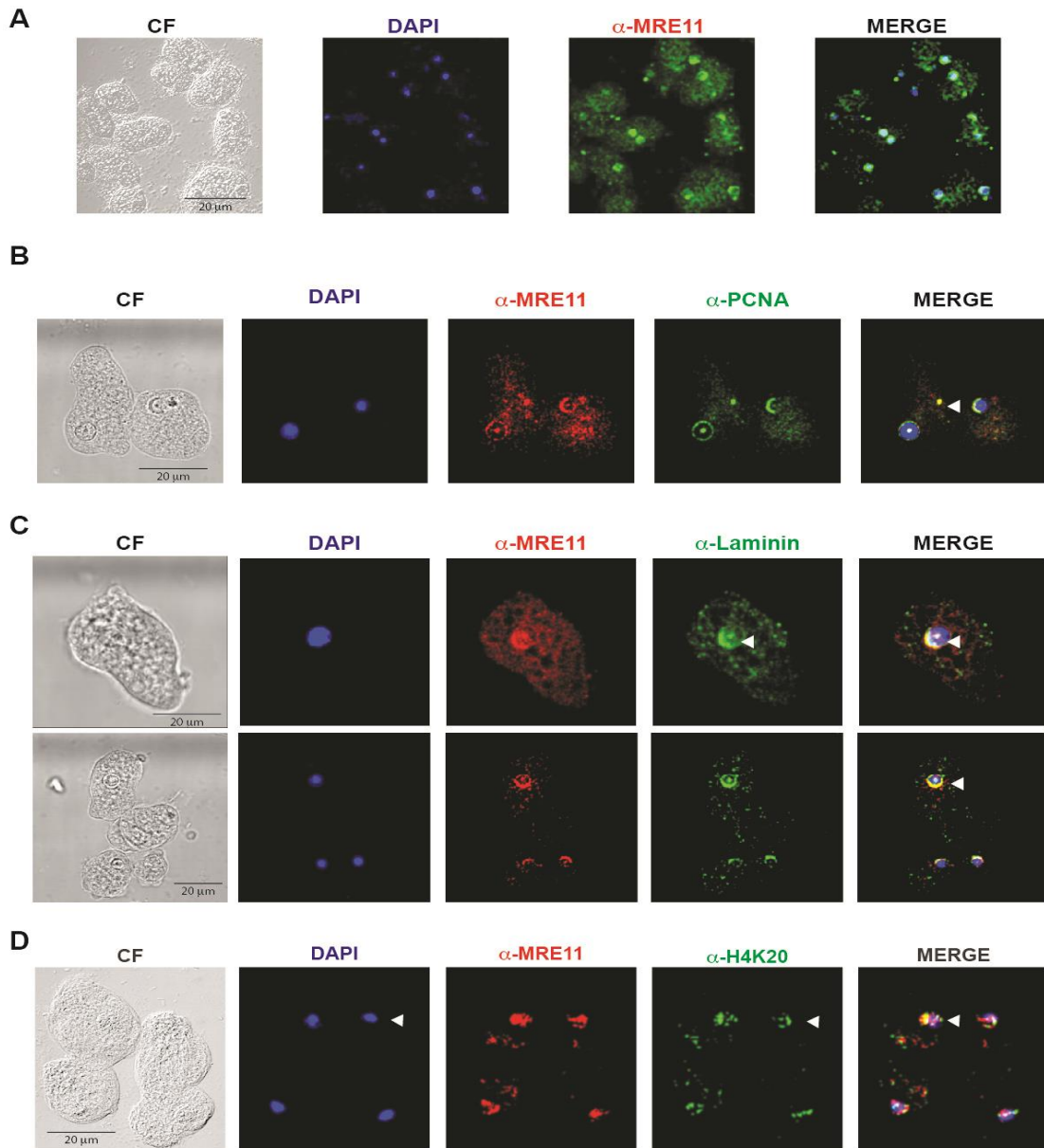
transcripción. Tanto en los lisados totales, como en la fracción nuclear se evidenció una banda de 25 kDa, correspondiente al peso molecular reportado para esta proteína (Fig. 24C). Esta proteína también se detectó en los lisados de las células control Saos-2 y HeLa (Fig. 24C). En extractos proteicos, pero empleando el anticuerpo anti-MRE11 se detectó una banda de 75kDa, correspondiente al peso molecular de la proteína MRE11 (Fig. 24B); en tanto que en los extractos de *E. histolytica* se detectó una banda de 68 kDa, la cual corresponde con el peso predicho de la proteína EhMRE11. Cabe mencionar que esta proteína se enriqueció en la fracción nuclear, donde de manera adicional se evidenció una banda de aproximadamente 120 kDa (fig. 24B, asterisco), que podría corresponder a una forma modificada post-traduccionalmente. Debido al tamaño encontrado, podría tratarse de una forma SUMOylada. Hasta el momento, estos hallazgos sugerían que *E. histolytica* solo expresaba a la proteína EhMRE11, pero aparentemente no a EhMRE11-like.

Adicionalmente, se realizó un fraccionamiento nuclear para analizar las proteínas solubles e insolubles con la idea de estudiar la presencia de EhMRE11 en regiones asociadas a la membrana nuclear (fracción insoluble) y proteínas difusas en el nucleoplasma (fracción soluble). En la fracción insoluble se inmunodetecto la banda de 68 kDa correspondiente a EhMRE11; en tanto que en la fracción soluble se evidenció una banda de 25 kDa, que corresponde con el peso molecular predicho para EhMRE11-like, de acuerdo con la base de datos AmoebDB (Fig. 24B). En conjunto, ambos resultados indican que *E. histolytica* expresa tanto EhMRE11 como EhMRE11-like, sugiriendo que estas proteínas podrían tener funciones diferentes dentro del núcleo de este organismo.



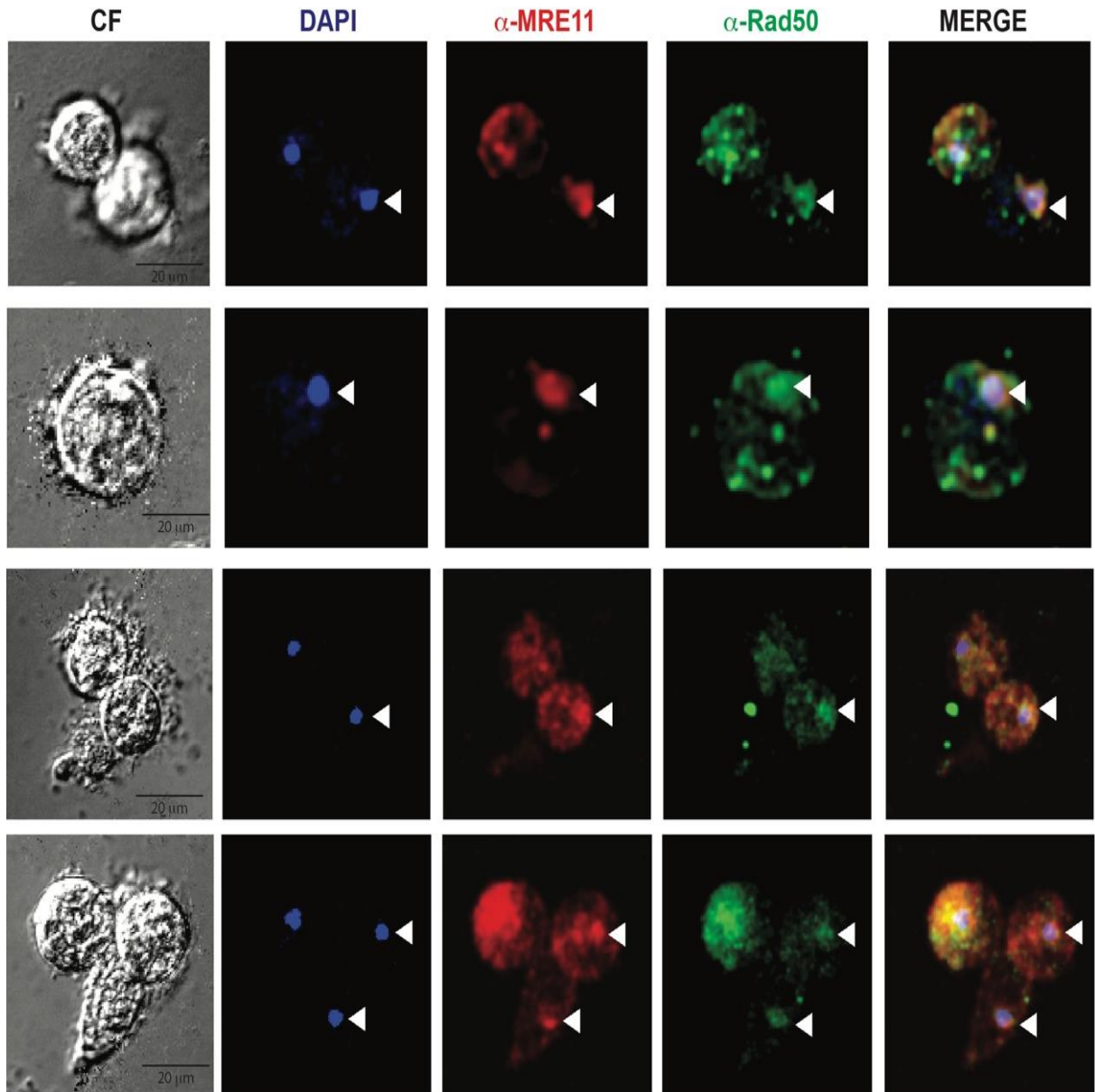
**Figura 24. Inmunodetección de la proteína EhMRE11 y EhMRE11-like en *E. histolytica*.** A) Extractos totales, citoplasmáticos y nucleares totales de las líneas tumorales HeLa y Saos-2 y de trofozoítos de *E. histolytica*, se separaron en un gel de SDS-PAGE al 10% y se tiñeron con azul de Coomassie. (B) Geles similares se transfirieron a membranas de nitrocelulosa para la inmunodetección de la proteína MRE11, utilizando el anticuerpo monoclonal  $\alpha$ -MRE11 (\*: la banda correspondiente a una posible forma modificada de MRE11). C) El anticuerpo  $\alpha$ -EhGata1-like se utilizó como control de la fracción nuclear. (#) Posibles dímeros de Gata y (\*) Forma modificada post-traduccionalmente de Gata. T, extractos totales; C, extractos citoplasmáticos; Nt, extractos nucleares totales; Ns, extractos nucleares solubles; Ni, extractos nucleares insolubles.

Los resultados anteriores sugieren que EhMRE11 y EhMRE11-like se concentran en el núcleo de los trofozoítos, por lo tanto, con el objetivo de determinar la localización subcelular de estas proteínas se realizaron ensayos de inmunofluorescencia (Fig. 25). Para ello, los trofozoítos de *E. histolytica* se sembraron sobre cubreobjetos, se permeabilizaron con etanol y se incubaron con el anticuerpo  $\alpha$ -MRE11. Debido a que este anticuerpo reconoce a ambas proteínas y solo las puede diferenciar por su peso molecular en ensayos de western blot, pero no de Inmunofluorescencia, en adelante nos referimos a ambas proteínas como una sola y la denominaremos EhMRE11. Las imágenes de microscopía confocal muestran a EhMRE11 en el núcleo, enriquecida en regiones cercanas a la membrana nuclear de algunos trofozoítos (Fig. 25A). En el núcleo co-localizó con el marcador nuclear DAPI y con proteínas de función nuclear, como EhPCNA, lámina B1 y H4K20me3 (Fig.25B-D). EhPCNA está relacionada con la replicación del DNA y también se ha descrito su presencia en los cuerpos APB. Tanto EhMRE11 como EhPCNA co-localizaron cerca de la membrana nuclear (Fig. 25B). De manera congruente, EhMRE11 co-localizó con lámina B1, un marcador de periferia nuclear (Fig. 25C). Además, la co-localización EhMRE11 con la marca de heterocromatina telomérica H4K20me3 (Fig. 25D), proporciona evidencia de la presencia de EhMRE11 en regiones de heterocromatina, particularmente en *foci* que podrían corresponder a posibles cuerpos APB.



**Figura 25. Localización de la proteína EhMRE11 en los trofozoítos de *E. histolytica*.** Los trofozoítos de *E. histolytica* en estado basal se adherieron a cubreobjetos, se fijaron y permeabilizaron con etanol absoluto a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Posteriormente, las muestras se bloquearon con albumina al 1% y se incubaron con los anticuerpos específicos. A)  $\alpha$ -MRE11 (verde). En los siguientes ensayos se utilizó el anticuerpo  $\alpha$ -MRE11 acoplado a TRITC (rojo). B) El anticuerpo  $\alpha$ -PCNA fue utilizado como control de localización nuclear (verde). C) El anticuerpo  $\alpha$ -lámina B1 se utilizó como control de periferia nuclear (verde). D) El anticuerpo  $\alpha$ -H4K20me3 (verde) fue un control de heterocromatina y región telomérica. Las imágenes de microscopía confocal son representativas de ensayos realizados por triplicado. Las cabezas de flecha blancas indican la presencia de la proteína EhMRE11 en el núcleo de los trofozoítos, así como la formación de *foci* los cuales podrían estar relacionados con cuerpos APB. Los núcleos se contratiñeron con DAPI (azul). CF, contraste de fases.

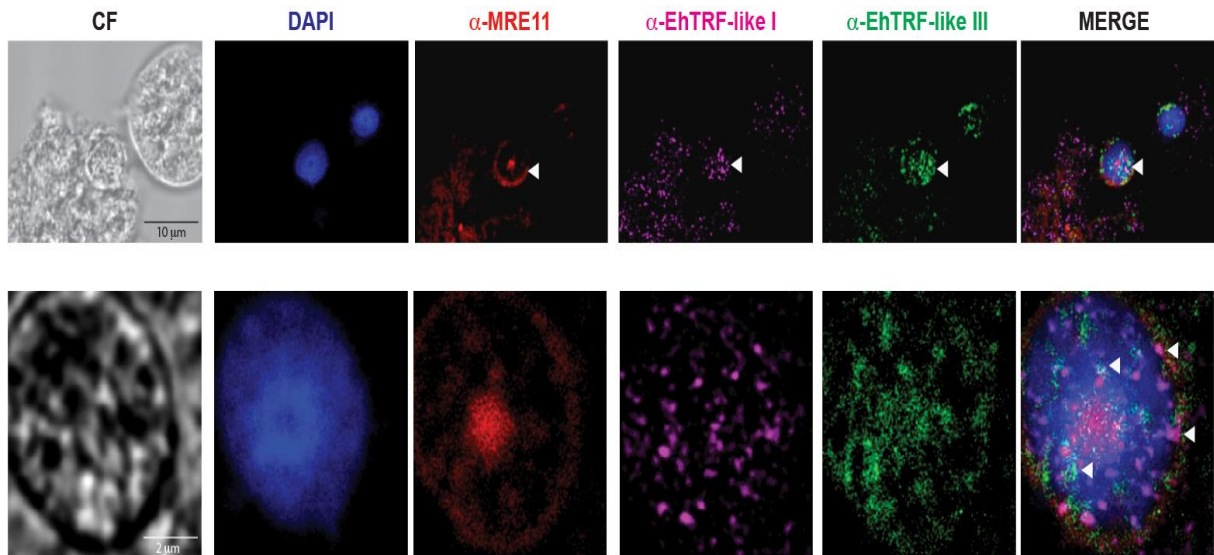
Así mismo, para evidenciar la co-localización de las proteínas EhMRE11 y EhRad50 en este parásito se realizaron ensayos de inmunofluorescencia (Fig. 26) utilizando el anticuerpo  $\alpha$ -MRE11 y  $\alpha$ -RAD50, detectados con anticuerpos secundarios anti-conejo marcados con TRITC y FITC respectivamente. De manera interesante se observó co-localización de EhMRE11 con RAD50, en algunos sitios nucleares, lo cual provee evidencia de la presencia del complejo MRN. En los eucariotas, el complejo MRN ha sido identificado como crucial en muchas etapas del proceso de reparación de las roturas de DNA de doble cadena: detección inicial de una lesión, detención del ciclo celular para permitir la reparación y selección de una vía de reparación específica, es decir, mediante recombinación homóloga. MRE11 y Rad50 interaccionan para formar el complejo MRN y su función está relacionada con la HR, lo que nos podría indicar la presencia de cuerpos APB relacionados con la vía ALT en este parásito.



**Figura 26.** Colocalización de EhMRE11 y EhRAD50 en trofozoítos de *E. histolytica*. Los trofozoítos se prepararon para ensayos de Inmunofluorescencia, adhiriéndose a cubreobjetos, fijándose y permeabilizándose con etanol absoluto a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Posteriormente, las muestras se bloquearon con albumina al 1% y se incubaron con los anticuerpos monoclonales  $\alpha$ -MRE11 (rojo) y  $\alpha$ -RAD50 (verde). Los núcleos se contratiñeron con DAPI (azul). Las imágenes de microscopía confocal son representativas de ensayos realizados por triplicado. Las cabezas de flecha blancas señalan la co-localización nuclear de ambas proteínas. CF, contraste de fases.

#### 9.4 Co-localización de las proteínas EhMRE11, EhTRF-like I y EhTRF-like III en *foci* nucleares en *E. histolytica*.

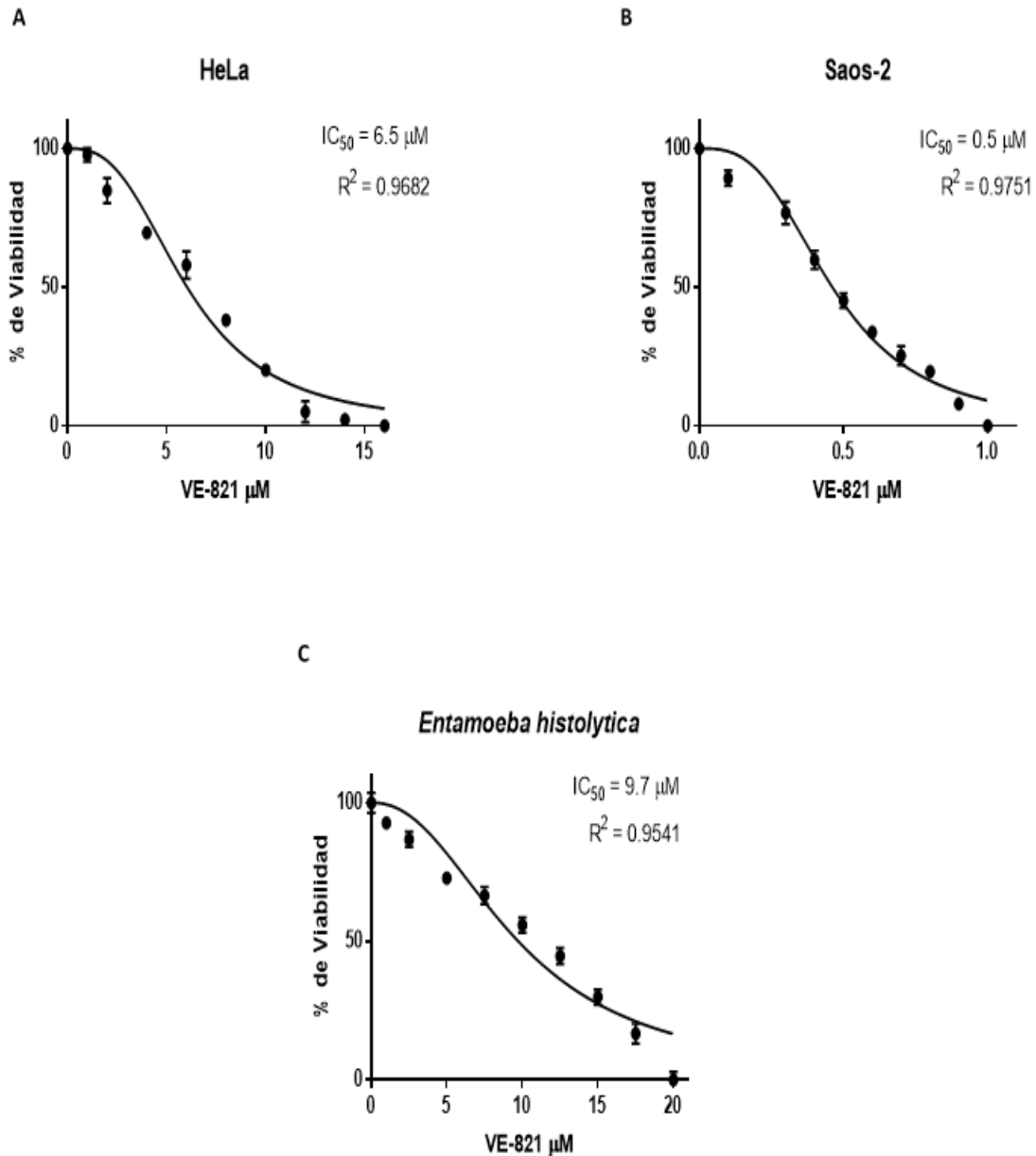
Para determinar la presencia de los cuerpos APB en este parásito se determinó si las proteínas EhMRE11, EhTRF-like I y III compartían la misma localización en el núcleo de este parásito, información que nos permitiría contar con los primeros indicios del mecanismo de mantenimiento telomérico en este organismo por medio de la vía ALT. Los trofozoitos cultivados en condiciones basales se procesaron para Inmunofluorescencia, utilizando los anticuerpos  $\alpha$ -MRE11 (detectado con un anticuerpo secundario anti-conejo TRITC),  $\alpha$ -EhTRF-like I marcado con Alexa 647 y  $\alpha$ -EhTRF-like III marcado con Alexa 488. Las imágenes de microscopía confocal evidenciaron la presencia de EhMRE11, EhTRF-like I y III principalmente en la periferia nuclear y en algunos *foci* dentro del núcleo (Fig. 27). Teniendo en cuenta que estas proteínas podrían participar en la protección de los extremos terminales de los cromosomas y que EhMRE11 podría contribuir en los mecanismos de recombinación homóloga, nuestras observaciones aportan una evidencia sólida de la posible presencia de cuerpos APB y del mecanismo ALT en *E. histolytica*.



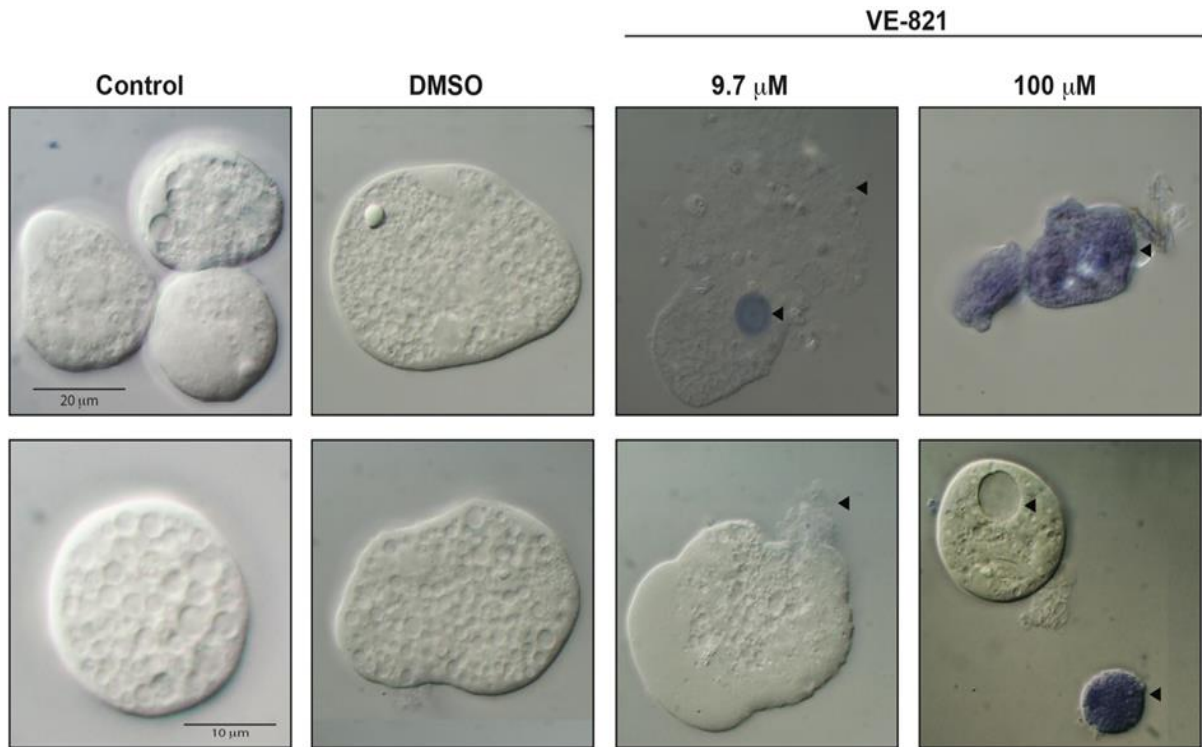
**Figura 27. Colocalización de las proteínas EhMRE11, EhTRF-like I y EhTRF-like III.** Los trofozoitos de *E. histolytica* se prepararon para microscopía, se adhirieron a cubreobjetos se fijaron y permeabilizaron con etanol absoluto a  $-20^{\circ}\text{C}$ , posteriormente se bloquearon con albumina al 1% y se incubaron con los anticuerpos  $\alpha$ -MRE11 (Rojo),  $\alpha$ - EhTRF-like I marcado con Alexa 647 (magenta) y  $\alpha$ -EhTRF-like III marcado con Alexa 488 (verde). Los núcleos se contratiñeron con DAPI (Azul). CF; Contraste de fases. En el panel inferior se muestra un aumento de uno de los núcleos. Las flechas blancas indican la formación *focis*, los cuáles podrían estar relacionados a cuerpos APB en este parásito. CF, contraste de fases.

### **9.5 Efecto del inhibidor VE-821 sobre la viabilidad celular y la co-localización de EhMRE11, EhTRF-like I y EhTRF-like III en *E. histolytica*.**

El compuesto VE-821 es un inhibidor competitivo de ATP que afecta específicamente a la proteína ATR (Deeg, K., *et al.*, 2016). La proteína ATR es un componente importante de los cuerpos APB y su activación está relacionada con la vía ALT (Conomos, D., *et al.*, 2012). Este inhibidor se ha utilizado para caracterizar a las células tumorales que utilizan esta vía para mantener sus telómeros (Flynn, RL., *et al.* 2015). En primer lugar, para analizar el efecto del inhibidor VE-821, se utilizó la línea celular Saos-2 como control positivo de la vía ALT y al as células HeLa como control negativo de esta vía, ya que son positivas a la telomerasa (Conomos, D., *et al.*, 2012). En estos ensayos, las células se sembraron por triplicado en placas de 96 pozos y se dejaron crecer hasta alcanzar una confluencia del 70 a 90% durante 24 h, posteriormente se trataron con concentraciones crecientes (0,5, 1, 2, 4, 8 y 16  $\mu\text{M}$ ) del inhibidor VE-821, disuelto en DMSO. El efecto del inhibidor se determinó evaluando la viabilidad celular por la técnica de incorporación del colorante cristal violeta, de acuerdo con Kueng *et al.*, (1989). La línea tumoral HeLa proveniente de cáncer cervicouterino, presentó una  $\text{IC}_{50}$  de 6.5  $\mu\text{M}$  (Figura 28A); en tanto que la línea de osteosarcoma Saos-2, se mostró una  $\text{IC}_{50}$  de 0.5  $\mu\text{M}$  (Figura 28B). Es decir que el inhibidor de ATR, a una dosis baja de 0.5  $\mu\text{M}$ , inhibe el 50% de las células Saos-2, positivas a la vía ALT; a diferencia de la concentración elevada de 6.5  $\mu\text{M}$  empleada para inhibir la línea tumoral HeLa, demostrando que son negativas a esta vía y necesitan una dosis mayor para inhibir el 50% de su población.



**Figura 28.** Efecto del inhibidor VE-821 en la viabilidad celular de las líneas celulares HeLa y Saos-2 y en trofozoítos de *Entamoeba histolytica*. A y B) Las células HeLa y Saos-2 fueron cultivadas en placas de 96 pozos (10,000 células/pozo) por 24 h, posteriormente se trataron con concentraciones crecientes del inhibidor VE-821. C) Trofozoítos de *E. histolytica* fueron cultivados en placas de 24 pozos (100,000 células/pozo) y estimulados con concentraciones crecientes del inhibidor VE-821 durante 72 h. Los gráficos presentados muestran la media y el error estándar de tres ensayos independientes llevados a cabo por triplicado. El porcentaje de viabilidad se analizó mediante el programa GraphPad Prism 7, para obtener la  $IC_{50}$  y la  $R^2$ .

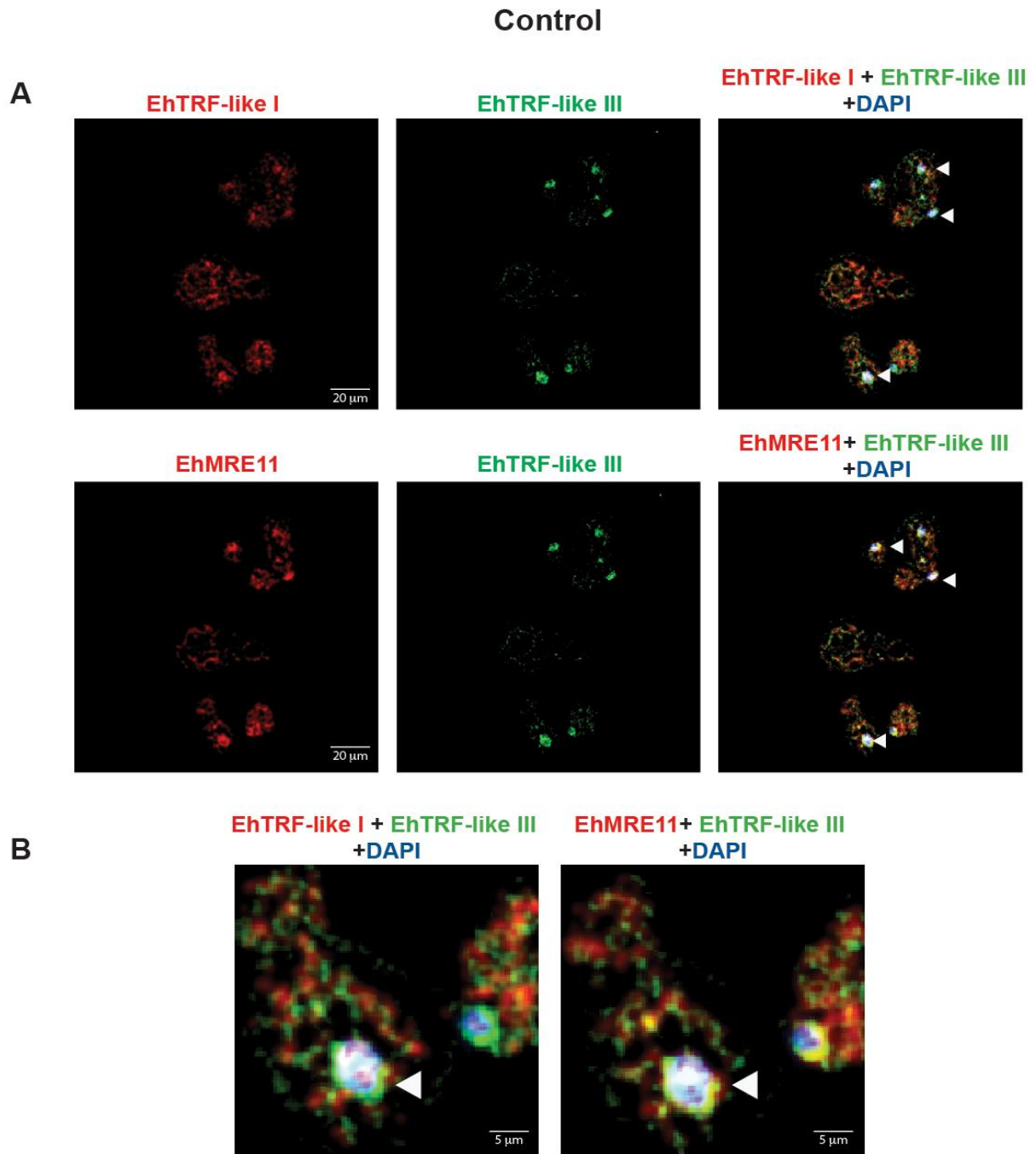


**Figura 29.** Efecto del inhibidor VE-821 en los trofozoítos de *E. histolytica*. Trofozoítos control, con DMSO (vehículo), o tratados con VE-821 a dos dosis (9.7  $\mu$ M y 100  $\mu$ M), se tiñeron con azul de tripano y se observaron mediante microscopía óptica. Las imágenes son representativas de ensayos por triplicado.

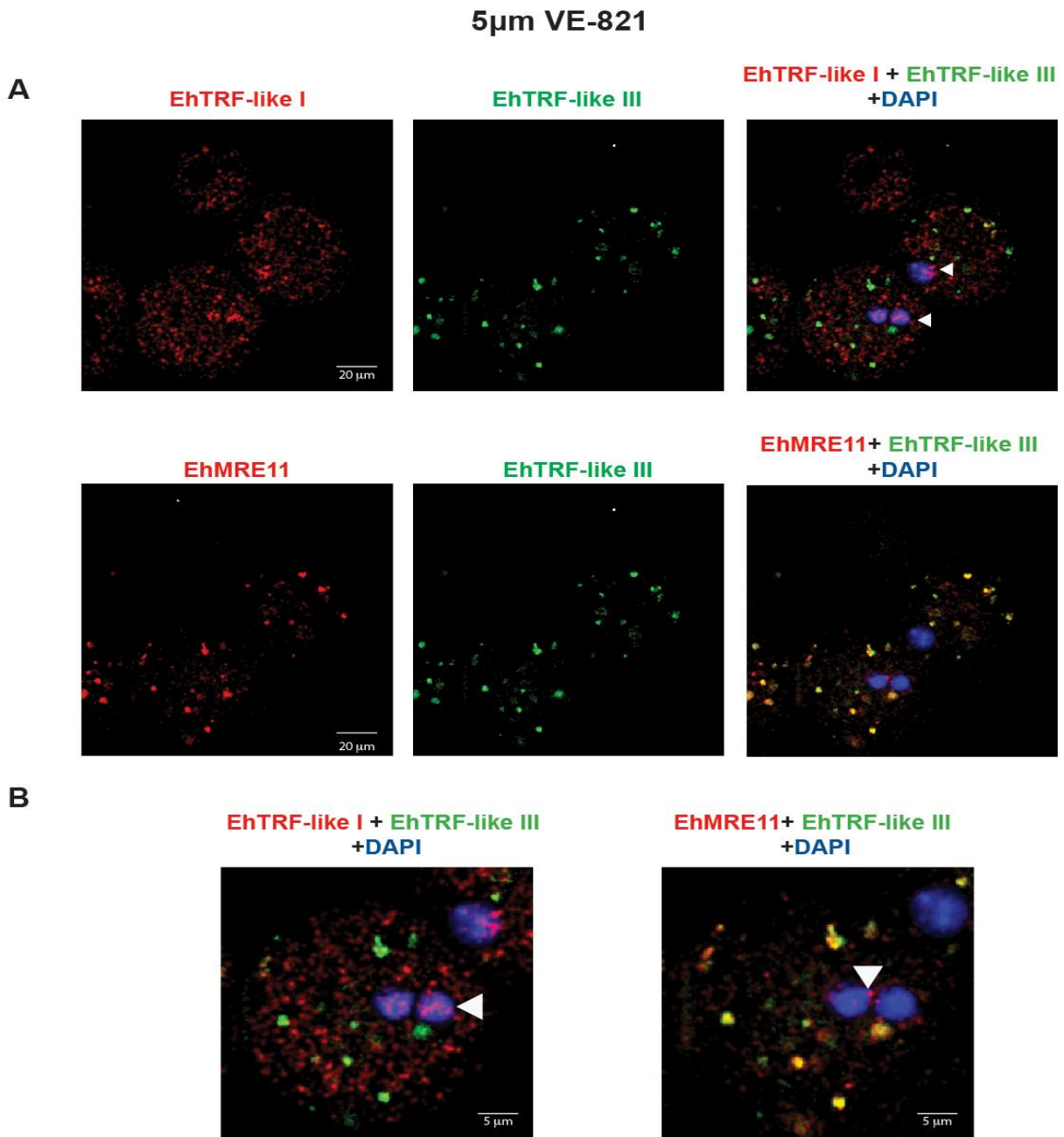
Una vez demostrada la especificidad del inhibidor, se evaluó su efecto sobre trofozoítos de *E. histolytica*, los cuales se sembraron en placas de 24 pozos y se estimularon durante 72 h con concentraciones crecientes (1, 2.5, 5, 10, 12.5, 15, 17.5 y 20  $\mu$ M) de VE-821 disuelto en DMSO. La viabilidad celular se determinó utilizando el colorante azul de tripano, el cual permitió discriminar entre células vivas y muertas. Las células vivas no presentan daño en su membrana por lo que el colorante no se incorpora en su interior, a diferencia de las células muertas que se tiñen de azul (Fig. 29). La concentración inhibitoria media ( $IC_{50}$ ) se calculó mediante el programa GraphPad Prism 7, encontrándose una  $IC_{50}=9.7 \mu$ M (Figura 28C). Debido a que esta concentración fue más alta que la presentada por las dos líneas tumorales empleadas como control, se analizó además la morfología de los trofozoítos en diferentes condiciones: control, DMSO (vehículo), a la dosis de  $IC_{50}$  (VE-821 a 9.7  $\mu$ M) y a una dosis letal (VE-821 a 100  $\mu$ M). En presencia del inhibidor, los trofozoítos mostraron daño en su membrana, ya que se tiñeron con el azul de tripano y sus núcleos lucieron de mayor tamaño (Fig. 29). Este efecto fue más

dramático en la dosis letal, demostrando que VE-821 es capaz de afectar severamente a estos parásitos.

Una vez demostrado el efecto del inhibidor VE-821 en la viabilidad de los trofozoítos, se procedió a evaluar su efecto en la localización de las proteínas EhMRE11, EhTRF-like I y EhTRF-like III, mediante ensayos de Inmunofluorescencia y empleando parásitos tratados durante 72 h con dos concentraciones de VE-821 (5 y 9.7  $\mu\text{M}$ ). Los anticuerpos utilizados fueron  $\alpha$ -MRE11 (seguido por un anticuerpo secundario anticonejo-TRITC),  $\alpha$ -EhTRF-like I marcado con Alexa 647 y  $\alpha$ -EhTRF-like III marcado con Alexa 488. De manera interesante, la presencia del inhibidor ocasionó una disminución de la localización nuclear de las tres proteínas y pérdida de los *foci* donde previamente se había conservado co-localización de EhMRE11, EhTRF-like I y EhTRF-like III; así como un aumento en la tinción citoplasmática (Fig. 30, 31, 32 y 33). Este cambio de localización subcelular (desde el núcleo hacia el citoplasma) fue más evidente para la proteína EhMRE11 (Fig. 31, 32 y 33).

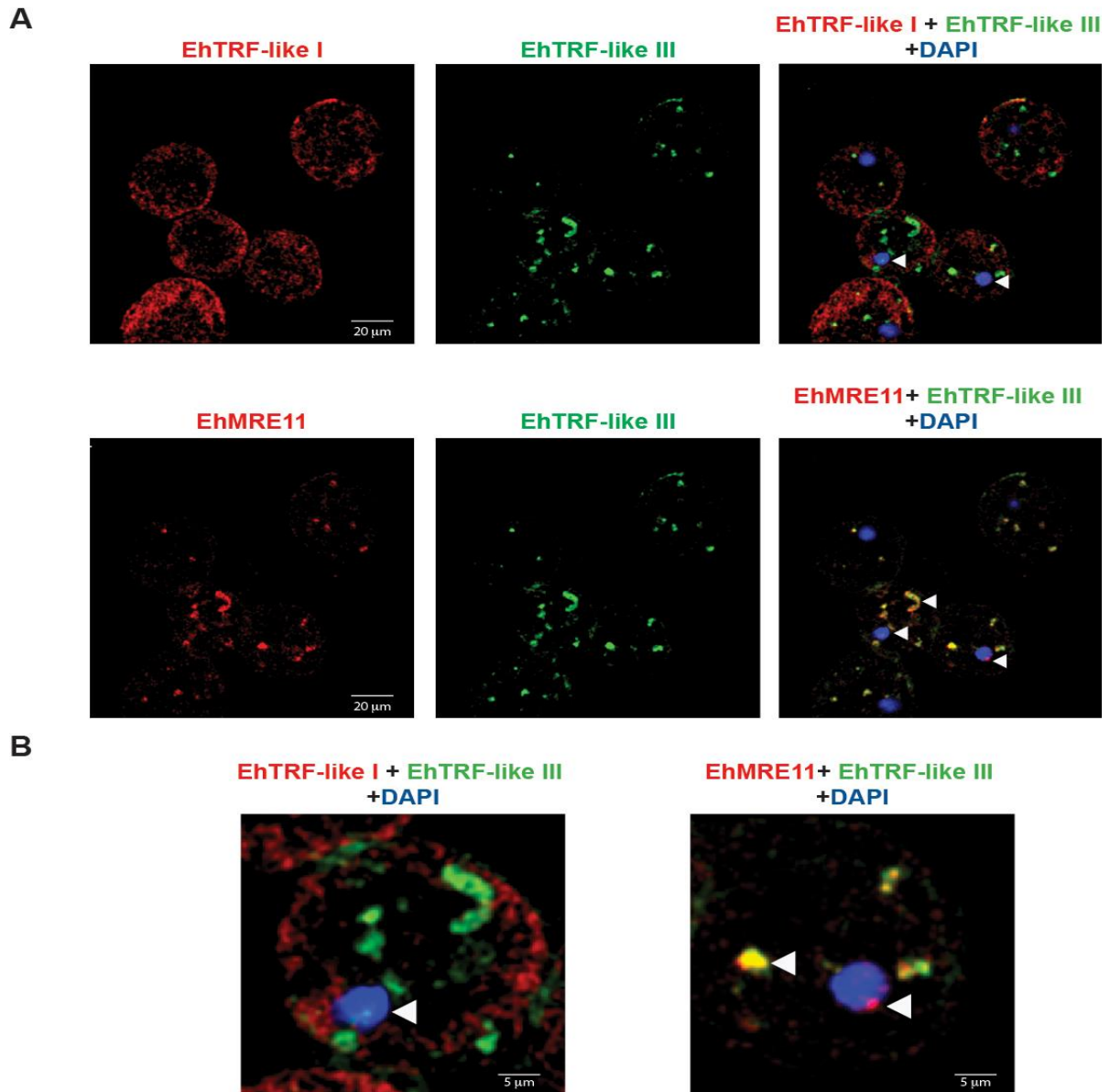


**Figura 30. Co-localización de EhMRE11, EhTRF-like I y EhTRF-like III en trofozoítos de *E. histolytica*.** A) Trofozoítos se sembraron en placas de 24 pozos durante 72 h, se prepararon para microscopía, se adhirieron a cubreobjetos, se fijaron y permeabilizaron con etanol absoluto a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Posteriormente, las muestras se bloquearon con albumina al 1% y se incubaron con los anticuerpos monoclonales  $\alpha$ -MRE11 (rojo)  $\alpha$ - EhTRF-like I (rojo) y  $\alpha$ - EhTRF-like III (verde). B) Aumento de los núcleos de trofozoítos dónde co-localizan EhTRFs (izquierdo) EhMRE11 (derecha) con EhTRF-like III. Las cabezas de flecha blancas indican la presencia de EhMRE11 en el núcleo, así como la formación de *foci*. Los núcleos se contratiñeron con DAPI (azul).

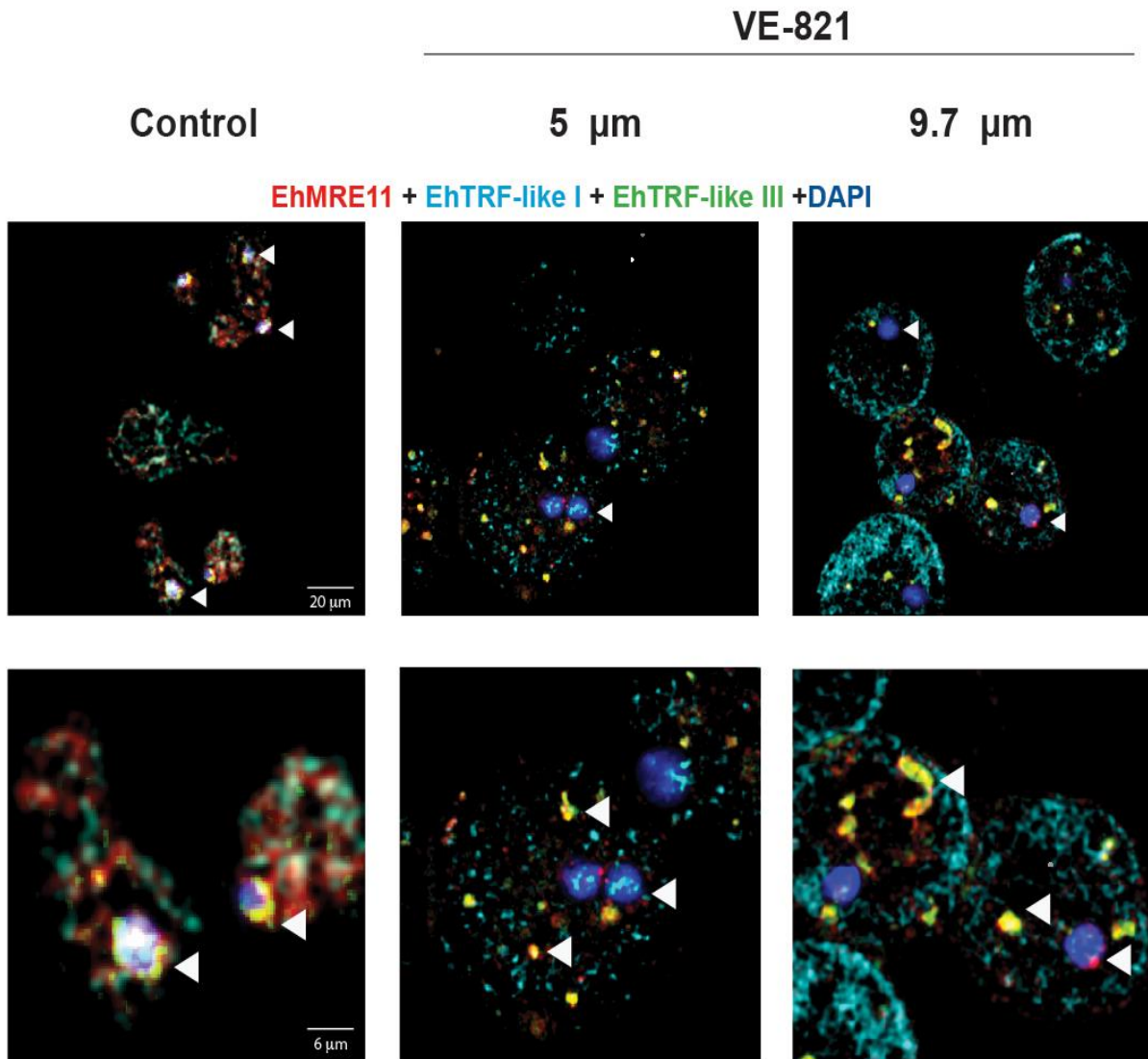


**Figura 31. Efecto del inhibidor VE-821 a una concentración de 5  $\mu$ m en la co-localización de las proteínas EhMRE11, EhTRF-like I y III en trofozoítos de *E. histolytica*.** A) Trofozoítos se sembraron en placas de 24 pozos y con el inhibidor VE-821 a una concentración de 5  $\mu$ m durante 72 h. Los parásitos se prepararon para microscopía, se adherieron a cubreobjetos, se fijaron y permeabilizaron con etanol absoluto a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Posteriormente, las muestras se bloquearon con albumina al 1% y se incubaron con los anticuerpos monoclonales  $\alpha$ -MRE11 (rojo)  $\alpha$ - EhTRF-like I (rojo) y  $\alpha$ -EhTRF-like III (verde). B) Aumento de los núcleos de trofozoítos, dónde se co-localizan EhTRFs (izquierda) y EhMRE11 (derecha) con EhTRF-like III. Las cabezas de flecha blancas indican la presencia de EhMRE11 en el núcleo, así como la formación de foci. Los núcleos se contratiñeron con DAPI (azul).

9.7  $\mu\text{m}$  VE-821

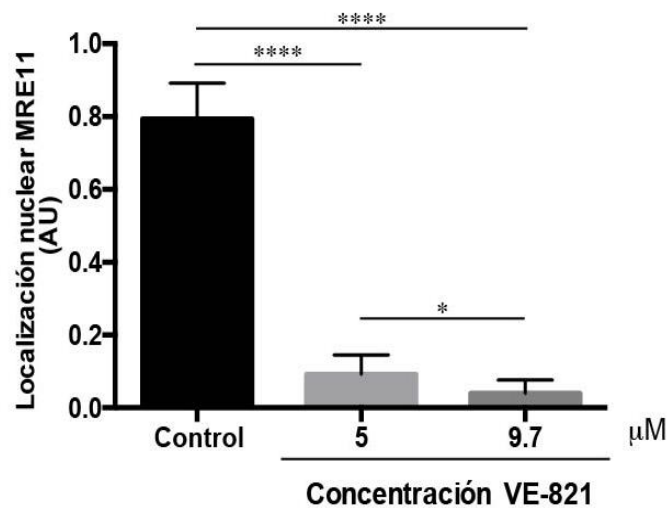


**Figura 32.** Efecto del inhibidor VE-821 a una concentración de 9.7  $\mu\text{M}$  en la co-localización de las proteínas EhMRE11, EhTRF-like I y III en los trofozoítos de *E. histolytica*. A) Trofozoítos se sembraron en placas de 24 pozos y con el inhibidor VE-821 a una concentración de 9.7  $\mu\text{M}$  durante 72 h. Los parásitos se prepararon para microscopía, se adherieron a cubreobjetos, se fijaron y permeabilizaron con etanol absoluto a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Posteriormente, las muestras se bloquearon con albumina al 1% y se incubaron con los anticuerpos monoclonales  $\alpha$ -MRE11 (rojo)  $\alpha$ - EhTRF-like I (rojo) y  $\alpha$ -EhTRF-like III (verde). B) Aumento de los núcleos de trofozoítos, dónde se co-localizan EhTRFs (izquierda) y EhMRE11 (derecha) con EhTRF-like III. Las cabezas de flecha blancas muestran la deslocalización nuclear de las proteínas EhMRE11, EhTRF-like I y III; sin embargo, se hace evidente la co-localización de estas proteínas en el citoplasma formando *foci*. Los núcleos se contratiñeron con DAPI (azul).



**Figura 33. Efecto del inhibidor VE-821 en la co-localización de la proteína EhMRE11, EhTRF-like I y III en los trofozoítos de *E. histolytica*.** Trofozoítos se sembraron en placas de 24 pozos y con el inhibidor VE-821 a dos concentraciones (5 y 9.7  $\mu\text{M}$ ) durante 72 h. Los parásitos se prepararon para microscopía, se adhirieron a cubreobjetos, se fijaron y permeabilizaron con etanol absoluto a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Posteriormente, las muestras se bloquearon con albumina al 1% y se incubaron con los anticuerpos monoclonales  $\alpha$ -MRE11 (rojo)  $\alpha$ - EhTRF-like I (cyan) y  $\alpha$ -EhTRF-like III (verde). Las cabezas de flecha blancas muestran la descolocalización nuclear de las proteínas EhMRE11, EhTRF-like I y III; sin embargo, se hace evidente la co-localización de estas proteínas en el citoplasma formando *foci*. Los núcleos se contratiñeron con DAPI (azul).

Para corroborar la presencia de la proteína EhMRE11 en el núcleo de los trofozoítos de *E. histolytica*, se cuantificó la fluorescencia en varias imágenes de microscopía confocal y se empleó el programa ImageJ. En el gráfico se muestra que en condiciones control, EhMRE11 se localizó dentro del núcleo; en tanto que en presencia del inhibidor (a concentraciones de 5 y 9.7  $\mu\text{M}$ ), la proteína disminuyó significativamente dentro de este organelo (Fig. 34). En general, nuestros resultados revelaron que el inhibidor VE-821 produce una translocación importante de EhMRE11 y de las EhTRFs, sacándolas del núcleo y afectando su co-localización.



**Figura 34.** Cuantificación de la localización nuclear de EhMRE11 en trofozoítos de *E. histolytica*. Cuantificación del canal de fluorescencia rojo en las diferentes condiciones: control y en las concentraciones del inhibidor VE-821 (5 y 9.7  $\mu\text{M}$ ); utilizando la tinción nuclear (DAPI) como referencia para determinar el número de células. AU, unidades arbitrarias.

Durante el mantenimiento telomérico MRE11 se asocia con TRF y otras proteínas de la recombinación homóloga (Deng, Y., *et al.*, 2009). Por lo tanto, para saber si EhMRE11 no solo comparte la misma localización nuclear con EhTRF, sino que también se asocian realizamos ensayos de inmunoprecipitación con extractos totales de *E. histolytica*. En estos extractos, se inmunoprecipitó a EhMRE11 con el anticuerpo monoclonal anti-MRE11 de origen humano (Santa Cruz Biotechnology), y como control negativo se empleó suero pre-inmune de ratón. Las proteínas inmunoprecipitadas se resolvieron en un gel SDS-PAGE al 10% y se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa, para posteriormente realizar un ensayo de inmunodetección utilizando los anticuerpos  $\alpha$ -MRE11 y  $\alpha$ -EhTRF-like III. La eficacia de la inmunoprecipitación



## 10. DISCUSIÓN

Los telómeros son estructuras de nucleoproteínas localizados en los extremos de los cromosomas lineales de las células eucariotas. El DNA de los telómeros es repetitivo y contiene una cadena G rica en guanina (en humanos 5'-TTAGGG-3') y una cadena complementaria llamada cadena C, rica en citosinas (Lee, M., *et al.*, 2018). Las proteínas que se unen al DNA telomérico conforman una maquinaria conocida como *Shelterin* y desempeña papeles críticos en la regulación en la longitud de los telómeros y protección del extremo cromosómico. La interacción estable del complejo *Shelterin* con los telómeros depende de la asociación de dos proteínas, TRF1 y TRF2 (de Lange, T., 2005).

En cada división celular los telómeros se acortan, por lo que existen dos mecanismos de mantenimiento telomérico. El primero es mediado por la enzima telomerasa, con actividad transcriptasa inversa y que adicionan repeticiones de la secuencia telomérica TTAGGG en los extremos de los cromosomas (Lee, M., *et al.*, 2018). El otro mecanismo es independiente de la telomerasa y se conoce como vía alternativa de alargamiento de telómeros (ALT) que depende de la recombinación homóloga (Minasi, S., *et al.*, 2019).

Hasta la fecha, en *E. histolytica* no ha sido posible determinar secuencias relacionadas con los extremos terminales de los cromosomas y en su genoma no se ha identificado el gen que codifica para la telomerasa, por lo que no se había sido propuesta algún mecanismo de mantenimiento telomérico (Loftus, B., *et al.*, 2005; Lorenzi, H., *et al.*, 2010). En cambio, se ha comprobado la existencia de una recombinación homóloga (HR) eficiente en este parásito (Singh, N., *et al.*, 2013). En su genoma se encuentran los genes que codifican para enzimas que están involucradas en la HR, como *spo11*, *dmc1*, *mnd1*, *mlh1*, *msh2*, *rad21*, *rad51* y *mre11*. La expresión de estos genes cambia en respuesta a daño al DNA inducido por UV, por estrés durante la ausencia de suero y durante el enquistamiento (López-Casamichana, M., *et al.*, 2008; Singh, N., *et al.*, 2013). En *Entamoeba invadens*, una amiba que infecta reptiles, se ha demostrado también la existencia de la HR y su susceptibilidad durante eventos relacionados con el estrés y durante el proceso de enquistamiento (Singh, N., *et al.*, 2013). Estos datos sugieren que la HR podría estar implicada en el mantenimiento telomérico del género *Entamoeba*.

El mantenimiento telomérico que sigue la vía ALT se ha descrito en células que carecen de actividad de telomerasa; como es el caso de algunas células tumorales y mutantes de levaduras (Conomos, D., *et al.*, 2012). Las células que emplean esta vía, presentan diferentes características como heterogeneidad en la longitud de los telómeros, presencia de secuencias de repetidos variables, círculos bicatenarios (ECTR) y cuerpos de leucemia promielocítica asociada a ALT (APB) (Bhattacharya, A., *et al.*, 2013; Nabetani, A., *et al.*, 2011). En el caso de *E. histolytica*, los genes tRNA están organizados en arreglos asociados con repeticiones en tándem de tipo STR (Loftus, B., *et al.*, 2005), los cuales se organizan en 25 tipos diferentes, conteniendo entre 1 y 5 tipos de tRNA por unidad de repetición y STR, asemejando a microsatélites. Se ha propuesto que estas matrices pudieran localizarse en los extremos del cromosoma, actuando como regiones teloméricas que podrían cumplir un papel estructural en el genoma. De manera interesante los elementos repetidos STR ubicados en regiones subterminales de los cromosomas, mantienen un parecido con la secuencia telomérica de mamíferos (TTAGGG). Sin embargo, también presentan una alta variación, lo cual podría ser el resultado de recombinación homóloga (ejemplo: TTAGTATT o TTAGTAAT).

Otra característica de las células que mantienen la vía ALT es la formación de cuerpos nucleares de leucemia promielocítica (PML) asociados a ALT y denominados cuerpos APB, los cuales son estructuras macromoleculares que contienen DNA telomérico y proteínas de unión a telómeros (Nabetani, A., *et al.*, 2011). En ellos se han descrito al menos 59 proteínas involucradas en diferentes funciones, como las proteínas del complejo *Shelterin*, otras involucradas en la respuesta y reparación del daño al DNA y de recombinación homóloga, por mencionar algunas (Nabetani, A., *et al.*, 2011). Es por ello que en este trabajo se realizó la búsqueda *in silico* de los 59 genes que codifican para las proteínas involucradas en la vía ALT en el genoma de este parásito. Nuestra búsqueda identificó 51 genes de los 59 en el genoma de *E. histolytica*, con porcentajes de identidad que varían del 9 al 61 % con respecto a sus homólogos en *H. sapiens*. Se identificaron genes que codifican para proteínas del complejo *Shelterin*, proteínas involucradas en la respuesta al daño y reparación de ruptura de doble cadena del DNA, proteínas involucradas recombinación homóloga, proteínas específicas de los cuerpos PML, proteínas de heterocromatina, topoisomerasas y endonucleasas. Todas las proteínas identificadas fueron analizadas para conocer si conservaban los dominios funcionales y se

encontró que, en este parásito, solo se conservan algunos de los dominios funcionales de estas proteínas. Por ejemplo, en el caso de la proteína similar a ATR se identificaron solo los dominios PI3\_P14 cinasa y el dominio FATC, aunque solo con éstos la proteína puede tener actividad enzimática. De manera relevante, el dominio PI3\_P14 cinasa de la proteína ATR es la región blanco del inhibidor VE-821, el cual es usado para caracterizar a las células que tiene activa la vía ALT (Deeg, K., *et al.*, 2016).

Entre las proteínas involucradas en el proceso de HR y en la vía ALT se encuentra el complejo MRN formado por MRE11, Rad50 y NBS1. Este complejo participa en el mantenimiento de los telómeros principalmente a través de su asociación con la proteína TRF2 del complejo *Shelterin* (Kijas, A., *et al.*, 2015). Por otra parte, se ha demostrado que la pérdida del complejo MRN reduce la longitud de la cadena rica en G de los telómeros, lo que podría inhibir la formación adecuada del *t-loop*, desestabilizando al telómero (Nabetani, A., *et al.*, 2011; Zhu, XD., *et al.*, 2010). En *E. histolytica* se han reportado dos genes que codifican para la proteína MRE11, las cuales se denominaron EhMRE11 y EhMRE11-like (López-Casamichana, M., *et al.*, 2008). Estas proteínas tienen una identidad del 33% y 25% y un valor  $e$  2.00E-25 y 2.00E-20, respectivamente con su homólogo de *H. sapiens*. EhMRE11 corresponde a una isoforma que tiene un tamaño similar a la de su homólogo en humano y EhMRE11-like es una isoforma más pequeña, la cual conserva solo el dominio de fosfoesterasa con actividad de exonucleasa/endonucleasa. La proteína EhMRE11 conserva el dominio de unión al DNA y los 4 motivos de fosfoesterasa, importantes para su actividad de nucleasa, como sus homólogos de *H. sapiens* y *T. brucei*. El hecho de que EhMRE11 y EhMRE11-like de *E. histolytica* conserven dominios funcionales, sugiere fuertemente que estas proteínas comparten funciones similares con MRE11 (Tan, K., *et al.*, 2002).

En condiciones basales de cultivo, la expresión del gen *ehmre11* es baja, aunque se han reportado cambios en su expresión a nivel de transcrito, en respuesta al daño al DNA inducido por UV, en respuesta al estrés inducido por la ausencia de suero, por choque térmico y peróxido (Singh, N., *et al.*, 2013). Hasta ahora no se había demostrado la expresión de estas proteínas en el parásito, por lo que en este trabajo, empleando un anticuerpo heterólogo, determinamos la presencia de las proteínas EhMRE11 y EhMRE11-like en las fracciones nucleares obtenidas de trofozoítos de *E. histolytica* en condiciones basales. Las proteínas EhMRE11 y EhMRE11-like

están compuestas por 595 y 223 aminoácidos y presenta un peso teórico de 68 y 25 kDa, respectivamente. Nosotros inmunodetectamos a la proteína EhMRE11 en la fracción nuclear insoluble, sugiriendo su asociación con la membrana nuclear; y a EhMRE11-like en la fracción nuclear soluble. Además, en la fracción nuclear total se inmunodetectó una banda de mayor peso molecular, que podría tratarse de formas con modificaciones postraduccionales como las SUMOilaciones. Al respecto, se sabe que la proteína MRE11 de *H. sapiens* sufre modificaciones postraduccionales para cumplir sus funciones, entre ellas la SUMOilación (Potts, P., & Yu, H., 2007). Esto correlaciona con que el hecho de que los cuerpos APB de la vía ALT son sitios de almacenamiento para proteínas SUMOiladas (Draskovic, I., *et al.*, 2009).

Así mismo, en este trabajo determinamos la localización subcelular de la proteína EhMRE11 empleando microscopía confocal. Los resultados revelaron la presencia de la proteína EhMRE11 en la periferia nuclear y formando *foci* nucleares. En estos ensayos además se incluyeron diferentes controles: como lámina B1, como control de periferia nuclear; H4K20me3 como control de heterocromatina telomérica; y EhPCNA, relacionada con la replicación del DNA y descrita también en los cuerpos APB. Nuestros resultados mostraron que la proteína EhMRE11 se encuentra en regiones nucleares, co-localizando con EhPCNA y lámina B1 en la periferia nuclear; así como con H4K20me3, sugiriendo que la proteína EhMRE11 se asocia con DNA telomérico en posibles cuerpos APB y por ende, esto podría sugerir la presencia de mecanismos de mantenimiento telomérico a través de la vía ALT. Por otra parte, se sabe que MRE11 y Rad50 son proteínas involucradas en la recombinación homóloga y son necesarias para la vía ALT. En el caso de *E. histolytica*, para evidenciar la formación del complejo MRN, se analizó la localización de EhMRE11 y EhRad50 para saber si co-localizaban en algunos *foci* nucleares. Nuestros resultados indicaron la formación de agregados en el núcleo donde co-localizaron EhMRE11 y EhRad50, sugiriendo la presencia del complejo MRN en *E. histolytica*. Además, en este trabajo se analizó la co-localización de EhMRE11 con EhTRF-like I y EhTRF-like III, ya que estas proteínas forman parte del complejo *Shelterin* (Rendón Gandarilla, F., *et al.*, 2018). La co-localización de estas 3 proteínas en agregados nucleares, sugiere fuertemente que EhMRE11 se encuentra en regiones teloméricas, donde posiblemente participa en el mantenimiento telomérico.

Debido a que *E. histolytica* no contiene el gen que codifica para la telomerasa, cabe la posibilidad de que para mantener a sus telómeros emplee la vía ALT. En trabajos recientes para estudiar la vía ALT se ha empleado el inhibidor VE-821, el cuál es un inhibidor competitivo selectivo de ATP de la proteína ATR. Además, este compuesto presenta actividad anticancerígena, induce fragmentación cromosómica, apoptosis, muerte celular *in vitro*, disminuye la fosforilación de Chk1, inhibe la fosforilación de H2AX y limita de manera reversible la progresión del ciclo celular en las células normales, con muerte mínima o efectos perjudiciales a largo plazo (Deeg, K., *et al.*, 2016). Por lo tanto, en nuestro trabajo empleamos este inhibidor para demostrar la presencia de la vía ALT en *E. histolytica*. En primer lugar se utilizaron como control a las líneas tumorales HeLa y Saos-2, ya que se ha reportado ampliamente que presentan un mantenimiento telomérico por telomerasa y la vía ALT, respectivamente. En las células Saos-2 se obtuvo una IC<sub>50</sub> de 0.5µM después del tratamiento con VE-821, a diferencia de las células HeLa, donde se encontró una IC<sub>50</sub> de 6.5µM, demostrando que las líneas negativas a esta vía necesitan una mayor concentración del inhibidor. Esto nos llevó a pensar que los trofozoítos de *E. histolytica* presentarían una IC<sub>50</sub> parecida a la mostrada por las células Saos-2; sin embargo, encontramos una IC<sub>50</sub> de 9.7µM. Estos hallazgos quizá se deben a diversos factores que producen una menor sensibilidad al inhibidor de ATR, como el número inicial de células sembradas en relación con la tasa de proliferación, así como las diferencias en el fondo genético entre las células tumorales y los trofozoítos de *E. histolytica* (Deeg, K., *et al.*, 2016). Además, de manera relevante se encontraron alteraciones morfológicas importantes en los trofozoítos tratados con el inhibidor VE-821 a la concentración IC<sub>50</sub>, así como un efecto en la co-localización de las proteínas EhMRE11, EhTRF-like I y EhTRF-like III. En la concentración IC<sub>50</sub> 9.7 µM, así como en una dosis menor (5 µM), se observó un cambio drástico en la co-localización de estas proteínas, ya que dejaron su localización nuclear y emigraron al citoplasma donde formaron agregados, este comportamiento incrementó con la concentración de 9.7µM. Estos hallazgos sugieren que el inhibidor afecta la interacción en el núcleo entre EhMRE11, EhTRF-like I y EhTRF-like III, evitando la formación de los posibles cuerpos APB.

Por lo tanto para confirmar posibles interacciones entre estas proteínas, se realizaron ensayos de inmunoprecipitación, empleando el anticuerpo α-MRE11 para inmunoprecipitar y el

---

anticuerpo  $\alpha$ -EhTRF-like III para realizar los ensayos de inmunodetección. A partir de estos ensayos se pudo corroborar la interacción entre EhMRE11 y EhTRF-like III. Esta interacción coincide con lo observado en *H. sapiens*, en donde se ha determinado que MRE11 SUMOilada interactúa con TRF2 y juntas se localizan en los telómeros durante todo el ciclo celular (Deng, Y., *et al.*, 2009). Falta por estudiar la posible interacción de EhMRE11 con EhTRF-like I y como estas asociaciones se alteran después del tratamiento con el inhibidor; sin embargo, todo esto será objeto de futuros estudios.

Hablando de otras amibas como *Dictyostelium discoideum*, que comparte algunas características con *E. histolytica*, tampoco se ha identificado una secuencia telomérica canónica. Sin embargo, al secuenciar su genoma se encontró que los extremos de los cromosomas tienen arreglos de rDNA y secuencias repetidas palindrómicas, las cuales se han propuesto como secuencias teloméricas y sirven como sustrato para la recombinación homóloga (Rodríguez-Centeno, J., *et al.*, 2019). En esta amiba también se han identificados genes que codifican para proteínas con el dominio Myb, que podrían estar relacionadas con la protección telomérica. Entre ellas, las proteínas MybAA y MybL presentan la mayor similitud con las proteínas humanas TRF1 y TRF2. La proteína MybAA presenta un 35% de identidad con el dominio de unión al DNA de Telobox de TRF1 y un 44% con el de TRF2; y MybL presenta el 39% de identidad a TRF1 y 34% con los dominios Telobox de TRF2 (Rodríguez-Centeno, J., *et al.*, 2019). En el genoma de *D. discoideum* contiene el gen que codifica para la telomerasa (TERTHP); sin embargo, se le considera inactiva debido a la presencia de una gran inserción que codifica para un segmento de poli-asparagina, en el dominio de transcriptasa inversa. Esta amiba también expresa los genes que codifican para MRE11 y Rad50, indicando la presencia de la recombinación homóloga en este organismo (Rodríguez-Centeno, J., *et al.*, 2019). Todos estos hallazgos permiten proponer que *D. discoideum* presenta un mecanismo alternativo de mantenimiento telomérico como la vía ALT, en ausencia de actividad de la telomerasa (Rodríguez-Centeno, J., *et al.*, 2019).

En general, los resultados de este trabajo brindan las primeras evidencias de la expresión de la proteína EhMRE11 en *E. histolytica*, así como su interacción con **Rad50**, **EhTRF-like I** y **EhTRF-like III** en agregados nucleares que podrían corresponder a **cuerpos APB**. Así mismo permiten evidenciar que *E. histolytica* presenta algunas características exclusivas de la vía ALT; por ejemplo, gran heterogeneidad en el tamaño de los cromosomas, presencia de repetidos STR



## 11. CONCLUSIONES

- Mediante el análisis *in silico* se identificaron genes que codifican para proteínas involucradas en la Vía ALT, sugiriendo la presencia de esta vía ALT en *E. histolytica*.
- *E. histolytica* expresa EhMRE11 (68 kDa) y EhMRE11-like (25 kDa) principalmente en el núcleo.
- EhMRE11, co-localiza con EhPCNA, lámina B1, la marca de heterocromatina telomérica H4K20me3, EhTRF-like I, EhTRF-like III y Rad50, en agregados tipo cuerpos APB, sugiriendo en su participación en la función telomérica.
- El inhibidor VE-821 causó una disminución en la presencia de EhMRE11 en el núcleo y cambios en la co-localización con las proteínas EhTRF-like I y EhTRF-like III, sugiriendo que se afectó la función telomérica.
- EhMRE11 co-precipita con EhTRF-like III, lo cual demuestra su interacción con esta proteína.
- En general nuestros hallazgos proponen por primera vez la presencia de la vía ALT en *E. histolytica*, y su posible participación en el mantenimiento telomérico.

## 12. BIBLIOGRAFÍA

1. Abhyankar, M., Hochreiter, A., Hershey, J., Evans, C., Zhang, Y., Crasta, O., Sobral, B., Mann, B., Petri, W., Gilchrist, C., (2008). Characterization of an *Entamoeba histolytica* high-mobility-group box protein induced during intestinal infection. *Eukaryot Cell*. Vol. 7(9)
2. Abhyankar, M., Shrimal, S., Gilchrist, CA, Bhattacharya, A., Petri, WA Jr., (2012). The *Entamoeba histolytica* serum-inducible transmembrane kinase EhTMKB1-9 is involved in intestinal amebiasis. *Int J Parasitol Drugs Drug Resist*. 2012 Dec; 2:243-248.
3. Álvarez, V., (2018). Interacción de la proteína EhTRF-like I con proteínas relacionadas con la función telomérica en *Entamoeba histolytica*. Tesis de Maestría
4. Arnoult, N., Saintome, C., Ourliac-Garnier, I., Riou, J. F. & Londono-Vallejo, A. (2009) Human POT1 is required for efficient telomere C-rich strand replication in the absence of WRN. *Genes Dev*. Vol 23 (24), 2915–2924
5. Bhattacharyya, S., Keirse, J., Russell, B., (2009). Telomerase-associated protein 1, HSP90, and topoisomerase IIalpha associate directly with the BLM helicase in immortalized cells using ALT and modulate its helicase activity using telomeric DNA substrates, *Journal Biol. Chem*. Vol 284
6. Blasco, M. A. (2007) The epigenetic regulation of mammalian telomeres. *Nature Rev. Genet*. 8 (4), 299–309.
7. Brandon, J., Orazio, N., Weitzman, M., (2010). The MRN complex in Double- Strand Break Repair and Telomere Maintenance. *FEBS Lett*. Author manuscript. 584 (17). 3682-3695

8. Bressan, DA., Olivares, H., Nelms, B., Petrini, J., (1998). Alteration of N-terminal phosphoesterase signature motifs inactivates *Saccharomyces cerevisiae* Mre11. *Genetics* 150, 591–600
  
9. Bryan, T.M., Englezou, A., Dalla-Pozza, L., Dunham, M.A., Reddel, R.R. (1997). Evidence for an alternative mechanism for maintaining telomere length in human tumors and tumor-derived cell lines. *Nature Medicine* 3, 1271-4.
  
10. Boeck, G., Forsyth, R., Praet, M., Hogendoorn, P., (2009). Telomere-associated proteins: cross-talk between telomere maintenance and telomere-lengthening mechanisms. *Journal of Pathology*. Vol 217: 327-344.
  
11. 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.
  
12. Bouttou, E., Vlachodimitropoulos, D., Pappa, V., Stürzbecher, H., Vorgias, C., (2013). DNA Repair and Telomeres – An Intriguing Relationship. (New Research Directions in DNA repair), pp. 339-359
  
13. Burgess, S., Saleh, M., Cowardin, C., Buonomo, E., Noor, Z., Watanabe, K., (2016). Role of Serum Amyloid A, Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor, and Bone Marrow Granulocyte-Monocyte Precursor Expansion in Segmented Filamentous Bacterium-Mediated Protection from *Entamoeba histolytica*. *Infection and Immunity*. Vol. 84 (10): 2824-2832
  
14. Casari, E., Rinaldi, C., Marsella, A., Gnugnoli, M., Colombo, C., Bonetti, D., Longhese, M., (2019). Processing of DNA Double-Strand Breaks by the MRX Complex in a Chromatin Context. *Frontiers in Molecular Biosciences*. Vol 6:43

15. Cesare, A. J., Kaul., Z., Cohen, SB., Pickett, H., Reddel, R., (2009) Spontaneous occurrence of telomeric DNA damage response in the absence of chromosome fusions. *Nature Struct. Mol. Biol.* Vol. 16 (12), 1244–1251
  
16. Cesare, A., & Reddel, R., (2010). Alternative lengthening of telomeres: models, mechanisms and implications. *Genetics.* Vol. 11 (1). 319-330.
  
17. Chang, E., Tsai, S., Aristizabal, M., Wells, J., Coulombe, Y., Kumar, A., Hieter, P., Bussatto, F., Chan, Y., Zhu, Y., Wang, A., Stirling, P., (2019). MRE11-RAD50-NBS1 promotes Fanconi Anemia R-loop suppression at transcription-replication conflicts. *Nat Commun.* Vol. 10: 4265
  
18. Chang, H., Munkhjargal, A., Kim, M., Park, S., Jung, E., Ryu, J., Yang, Y., Lim, J., Kim, Y., (2017). The functional roles of PML nuclear bodies in genome maintenance. *ELSEVIER.* Vol. 809: 99-107
  
19. Chan, H., Wang, Y., Feigon, J., (2018). Progress in Human and *Tetrahymena* Telomerase Structure. *Annu Rev Biophys.* Vol 46: 199-225
  
20. 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.
  
21. Chung, I., Leonhardt, H. and Rippe, K., (2011). De novo assembly of a PML nuclear subcompartment occurs through multiple pathways and induces telomere elongation. *Journal Cell Science.* Vol. 124 (21), 3603-3618.
  
22. Chung, I., Osterwald, S., Deeg, K., Rippe, K., (2012) PML body meets telomere: the beginning of an ALternative ending?. *Nucleus.* 3 (3): 263-75.

23. Clark, C., Karim. I., Zaki, M., Loftus, B., Hall, N., (2006). Unique organization of tRNA genes in *Entamoeba histolytica*. *Molecular & Biochemical Parasitology*. Vol. 146. 24-29.
24. Cook, B.D., Dynek, J.N., Chang, W., Shostak, G., y Smith, S. (2002). Role for the related poly (ADP-ribose) polymerases tankyrase 1 and 2 at human telomeres. *Molecular And Cellular Biology* 22, 332- 42.
25. Coluzzi, E., Leone, S., Sgura. A., (2019) Oxidative Stress Induces Telomere Dysfunction and Senescence by Replication Fork Arrest. *Cells* 8(1):19, 1-23
26. Conomos, D., Stutz, M., Hills, M., Neuman, A., Bryan, T., Reddel, R., Pickett, H., (2012). Variant repeats are interspersed throughout the telomeres and recruit nuclear receptors in ALT cells. *Journal of Cell Biology*. 199 (6): 893-906.
27. Deeg, K., Chung, I., Bauerc, C., Rippe, K., (2016). Cancer Cells with Alternative Lengthening of Telomeres Do Not Display a General Hypersensitivity to ATR Inhibition. *Front. Oncol.* 23 (6): 186.
28. Deng, Y., Guo, X., Ferguson, D.O., y Chang, S. (2009). Multiple roles for MRE11 at uncapped telomeres. *Nature* 460, 914-8.
29. De Lange, T. (2005) Shelterin: the protein complex that shapes and safeguards human telomeres. *Genes & Dev.* 19 (18): 2100-2110.
30. De Lange, T., (2010). How Telomeres Solve the End-Protection Problem. *Science*. 326 (5955): 948.

- 31.** Draskovic, I., Arnoult, N., Steiner, V., Bacchetti, S., Lomonte, P., Londoño-Vallejo, A., (2009). Probing PML body function in ALT cells reveals spatiotemporal requirements for telomere recombination. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. Vol: 106 (37): 15726-15731.
- 32.** Desai-Mehta, A., Cerosaletti, K., Concannon, P., (2001). Distinct functional domains of nibrin mediate Mre11 binding, focus formation, and nuclear localization. *Mol. Cell. Biol.* 21, 2184–2191
- 33.** Dey, A., Chakrabarti, K., (2018). Current Perspectives of Telomerase Structure and Function in Eukaryotes with Emerging Views on Telomerase in Human Parasites. *Int. Journal of Mol Sci.* Vol. 19 (2): 333.
- 34.** Diotti, R., Loayza, D. (2011). Shelterin complex and associated factors at human telomeres. *Nucleus*. Vol 2 (2): 119-135
- 35.** Florence, R., Angus, H., Walker, J., Xu – Dong, Z., (2016). Cdk-dependent phosphorylation regulates TRF1 recruitment to PML bodies and promotes C-circle production in ALT cells. *Journal Cell Science*. Vol. 129, 2559-2572;
- 36.** Flynn, R., Cox, K., Jeitany, M., Wakimoto, H., Bryll, A., Ganem, N., Bersani, F., Pineda, J., Suvá, M., Benes, C., Haber, D., Boussin, F., Zou, L., (2015). Alternative Lengthening of Telomeres Renders Cancer Cells Hypersensitive to ATR Inhibitors. *Science*. Vol: 347 (6219): 273-277.
- 37.** Gandarilla-Rendón, F., Álvarez, V., Castañeda, E., Cárdenas, H., Cárdenas, R., Valdés, J., Betanzos, A., Chávez, B., Lagunes, A., Orozco, E., López, C., Azuara, E., (2018). Telomeric Repeat-Binding Factor Homologs in *Entamoeba histolytica*: New Clues for Telomeric Research. *Fron Cell Infect Microbiology*. Vol 8 (341) 1-19

- 38.** Hendriks, C., Hartkmap, J., Wiezorek, S., Steinkamp, A., Rossetti, G., Lüscher, B., Bolm, C., (2017). Sulfoximines as ATR inhibitors: Analogs of VE-821. *ELSEVIER. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. Vol. 27: 2659-2662
- 39.** Henson, JD., Neumann, AA., Yeager, TR., Reddel, RR., (2002). Alternative lengthening of telomeres in mammalian cells. *Oncogene*. Vol. 21 (4). 598-610.
- 40.** Jiang, WQ., Cesare, A., (2007). Disruption of telomere maintenance by depletion of the MRE11/RAD50/NBS1 complex in cells that use alternative lengthening of telomeres. *Journal Biol. Chem*. Vol 282
- 41.** Jiang, WQ, Zhong ZH, Henson JD, Neumann AA, Chang AC, Reddel RR. (2005) Suppression of alternative lengthening of telomeres by Sp100-mediated sequestration of the MRE11/RAD50/NBS1 complex, *Mol. Cell Biol*, 2005, vol. 25 (pg. 2708-2721)
- 42.** Jossé, R., Martin, S., Guha, R., Ormanoglu, P., Pfister, T., Reaper, P., Barnes, C., Jones, J., Charlton, P., Pollard, J., Morris, J., Doroshov, J., Pommier, Y., (2014). ATR inhibitors VE-821 and VX-970 sensitize cancer cells to topoisomerase I inhibitors by disabling DNA replication initiation and fork elongation responses. *Cancer Res*. Vol 74 (23): 6969-6979.
- 43.** Kantor, M., Abrantes, A., Estevez, A., Schiller, A., Torrent, J., Gascon, J., Hernandez, R., Ochner C., (2018). *Entamoeba histolytica*: Updates in Clinical Manifestation, Pathogenesis, and Vaccine Development. *Canadian Journal of Gastroenterology and Hepatology*. Vol 2018 1-6
- 44.** Kelso, A., Waldvogel, S., Luthman, A., Sehorn, M., (2017). Homologous Recombination in Protozoan Parasites and Recombinase Inhibitors. *Front Microbiol*. Vol. 8: 1716: 1-11

45. Kijas, A., Lim, Y., Bolderson, E., Cerosaletti, K., Gatei, M., Jakob, B., Tobias, F., Lavin, M., (2015). ATM-dependent phosphorylation of MRE11 controls extent of resection during homology directed repair by signalling through Exonuclease 1. *Nucleic Acids Research*. Vol. 43 (17): 8352-8367.
46. Lafrance-Vanasse, J., Williams, G., Tainer, J., (2015). Envisioning the dynamics and flexibility of Mre11-Rad50-Nbs1 complex to decipher its roles in DNA replication and repair. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* Vol. 117 (0); 182-193.
47. Lamarche, B., Orazio, N., Weitzman, M., (2010). The MRN complex in double-strand break repair and telomere maintenance. *FEBS Lett.* Vol: 584: 3682-3695
48. Lee, M., Teber, E., Holmes, O., Nones, K., Waddell, N., Pickett, H., Pearson, J., (2018). Telomere sequence content can be used to determine ALT activity in tumours. *Nucleic Acids Research*. Vol. 46 (10). 4903–4918.
49. Loftus, B., Davies R., Samuelson J., Barell, B., (2005). The genome of the protist parasite *Entamoeba histolytica*. *Nature*. 24;433 (7028):865-8.
50. 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*, Vol. 4(6)
51. Lopez-Casamichana, M., Orozco, E., Marchat, L., López, C., (2008). Transcriptional profile of the homologous recombination machinery and characterization of the EhRAD51 recombinase in response to DNA damage in *Entamoeba histolytica*. *BMC Mol Biol.* 9 (35).

- 52.** López-Camarillo C, Lopez-Casamichana M, Weber C, Guillen N, Orozco E, Marchat LA. DNA repair mechanisms in eukaryotes: Special focus in *Entamoeba histolytica* and related protozoan parasites. *Infect Genet Evol.* 2009 Dec;9(6):1051-6. doi: 10.1016/j.meegid.2009.06.024. Epub 2009 Jul 8. Review.
- 53.** Lozano-Amado, D., Herrera-Solorio, A., Valdés, J., Alemán-Lazarini, L., Almaraz-Barrera, M., Luna-Rivera, E., Vargas, M., Hernández-Rivas, R., (2016) Identification of repressive and active epigenetic marks and nuclear bodies in *Entamoeba histolytica*. *Parasit Vectors.* Vol 9:19
- 54.** Lloyd, J., Chapman, R., Clapperton, J., (2009). A super-modular FHA/BRCT-repeat architecture mediates Nbs1 adaptor function in response to DNA-damage. *Journal of Cell Science.* Vol. 139 (1).
- 55.** Minasi, S., Baldi, C., Pietsch, T., Donofrio V., Pollo, B., Antonelli, M., Massimino, F., Buttarelli, R., (2019). Telomere elongation via alternative lengthening of telomeres (ALT) and telomerase activation in primary metastatic medulloblastoma of childhood. *Journal of Neuro-Oncology.* Vol (142):3. 435-444
- 56.** Nabetani, A., Ishikawa, F., (2010). Alternative lengthening of telomeres pathway: Recombination-mediated telomere maintenance mechanism in human cells. *The Journal of Biochemistry.* Vol. 149 (1).
- 57.** Nadarlinger, E., Holzmann, K., (2017). Epigenetic Regulation of Telomere Maintenance for Therapeutic Interventions in Gliomas. *Genes.* Vol 8 (5). 145
- 58.** Nakada-Tsukui, K., & Nozaki, T. (2016). Immune response of amebiasis and immune evasion by *Entamoeba histolytica*. *Frontiers in immunology*, 7.

- 59.** Nittis, T., Guittat, L., Stewart, S., (2007). Alternative lengthening of telomeres (ALT) and chromatin: Is there a connection? *Biochimie*. Vol. 90 (1). 5-12.
- 60.** Oganessian, L., Karlseder, J., (2009). Telomeric armor: the layers of end protection. *Journal of Cell Science*. Vol. 122 (22). 4013–4025.
- 61.** Opresko, P.L., Kobbe, von, C., Laine, J., Harrigan, J., Hickson, I.D., Bohr, V.A. (2002). Telomere-binding protein TRF2 binds to and stimulates the Werner and Bloom syndrome helicases. *The Journal Of Biological Chemistry* 277, 41110-9.
- 62.** Palm, W. & de Lange, T. (2008) How shelterin protects mammalian telomeres. *Annu. Rev. Genet.* Vol. 42 (1). 301–334
- 63.** Patel, T., Vasan, R., Gupta, D., Patel, J., Trivedi, M., (2015). Shelterin proteins and cancer. *Asian Pac J Cancer Prev.* 16 (8): 3085-90.
- 64.** Pineda, E., Perdormo, D., (2017). Entamoeba histolytica under Oxidative Stress: What Countermeasure Mechanisms Are in Place?. *Cells*, 6(4), 44.
- 65.** Potts, P., & Yo, H. The SMC5/6 complex maintains telomere length in ALT cancer cells through SUMOylation of telomere-binding proteins. *Nature Structural & Molecular Biology*. Vol 14 (7): 581-590
- 66.** Rodríguez-Centeno, J., Mangúan-García, C., Perona, R., Sastre, L., (2019). Structure of Dictyostelium discoideum telomeres. Analysis of possible replication mechanisms. *PLOS ONE*. Vol. 14 (9)
- 67.** Royle, N., Foxon, J., Mendez-Bermudez, A., Novo, C., Williams, J., Cotton, V., (2008). Telomere length maintenance – an ALTerNative mechanism. *Cytogenetic and Genome Research*. Vol. 122 (3-4). 281–291.

- 68.** Saharia, A., Teasley, D.C., Duxin, J.P., Dao, B., Chiappinelli, K.B., Stewart, S.A. (2010). FEN1 ensures telomere stability by facilitating replication fork re-initiation. *The Journal Of Biological Chemistry* 285, 27057-66.
- 69.** Singh, N., Bhattacharya, A., Bhattacharya, S., (2013). Homologous Recombination Occurs in *Entamoeba* and Is Enhanced during Growth Stress and Stage Conversion. *PLoS One*. Vol (8):9. 1-9.
- 70.** Singh, P., Mirdha, B., Ahuja, V., Singh, S., (2013). Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay for rapid detection of *Entamoeba histolytica* in amoebic liver abscess. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. Vol. 29 (1) 27-32.
- 71.** Song, N., Jing, W., Li, C., Bai, M., Cheng, Y., Li, H., Hou, K., Li, Y., Wang, K., Li, Z., Liu, Y., Qu, X., Che, X., (2018). ZEB1 inhibition sensitizes cells to the ATR inhibitor VE-821 by abrogating epithelial–mesenchymal transition and enhancing DNA damage. *Cell Cycle*. Vol (17)5: 595-604.
- 72.** Sung, S., Li, F., Bong Park, Y., Seok Kim, J., Kim, J., Che, J., Lee, S., Cho, Y., (2014). DNA end recognition by the Mre11 nuclease dimer: insights into resection and repair of damaged DNA. *The EMBO Journal*. Vol. 33 (20) 2422-2445.
- 73.** Syed, A., Tainer, J., (2018). The MRE11–RAD50–NBS1 Complex Conducts the Orchestration of Damage Signaling and Outcomes to Stress in DNA Replication and Repair. *Annu Rev Biochem*. 20; 87: 263-294.
- 74.** Tan, K., Leal, S., Cross, G., (2002). *Trypanosoma brucei* MRE11 is non-essential but influences growth, homologous recombination and DNA double-strand break repair. *Molecular and Biochemical Parasitology*. Vol: 125 (1): 11-21

- 75.** Tawari, B., Ibne, K., Scott, C., Quail, M., Berriman, M., (2008). Patterns of Evolution in the Unique tRNA Gene Arrays of the Genus *Entamoeba*. *Mol. Biol. Evol.* 25 (1): 187-198.
- 76.** Trupti, N., Vasan, R., Gupta, D., Patel, J., Manjari, T., (2015). Shelterin Proteins and Cancer. *Asian Pac. J. Cancer, Prev.* 16 (8).
- 77.** Venteicher, A., Meng, Z., Mason, P., Veenstra, T., Artandi, S., (2008) Identification of ATPases and reptin as telomerase components essential of holoenzyme assembly. *Cell*, Vol. 132 (6): 945-957
- 78.** Verdun, R., Crabbe, L., Hagglblom, C., Karlseder, J., (2005). Functional Human Telomeres Are Recognized as DNA Damage in G2 of the Cell Cycle. *Molecular Cell*. Vol. 20 (4) 551-561
- 79.** Vitis, M., Berardinelli, F., Sgura, A., (2018). Telomere Length Maintenance in Cancer: At the Crossroad between Telomerase and Alternative Lengthening of Telomeres (ALT). *International Journal of Molecular Sciences*. Vol. 19 (2). 606.
- 80.** Walker, J., Zhu, X., (2012). Post-translational modifications of TRF1 and TRF2 and their roles in telomere maintenance. *Mechanisms of Ageing and Development*. Vol 133 (6). 421-434.
- 81.** Williams, R., Moncalian, G., Williams, J., Yamada, Y., Limbo, O., Shin, D., Grocock, L., Cahill, D., Hitomi, C., Guenther, G., Moiani, D., Carner, J., Rusell, P., Tainer, J., (2008). Mre11 dimers coordinate DNA end binding and nuclease processing in double-strand-break repair. *Cell*. Vol 135: 97-109.
- 82.** Williamson, C., Miller, R., Pemberton, H., Jones, S., Campbell, J., Konde, A., Badham, N., Rafiq, R., Brough, R., Gulati, A., Ryan, C., Francis, J., Vermulen, P., Reynolds, A.,

- Reaper, P., Pollard, J., Ashworth, A., Lord, C., (2016). ATR inhibitors as a synthetic lethal therapy for tumours deficient in ARID1A. *Nature* (7): 13837: 1-10
- 83.** Willhoeft, U., & Tannich, E. (1999). The electrophoretic karyotype of *Entamoeba histolytica*. *Molecular and biochemical parasitology*, 99(1), 41-53.
- 84.** Wilson, F., Ho, A., Walker, J., Zhu, X., (2016). Cdk-dependent phosphorylation regulates TRF1 recruitment to PML bodies and promotes C-circle production in ALT cells. *J. Cell. Sci.* 129 ( 13): 2559-72.
- 85.** Wood, A., Danielsen, R., Lucas, C., Rice, E., Scalzo, D., Shimi, T., Goldman, R., (2014). TRF2 and lamin A/C interact to facilitate the functional organization of chromosome ends. *Nature Communications*. 5 (5467).
- 86.** Xin, H., Liu, D., Songyang, Z., (2008). The telosome/shelterin complex and its functions. *Genome Boil.* Vol (9): 9: 232. 1-7
- 87.** Zhang, Q., Kim, N., Feigon, J., (2011). Architecture of human telomerase RNA. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Vol 108(51): 20325-20332
- 88.** Zhu, XD., Küster, B., Mann, M., Petrini, JH., de Lange, T, (2000). Cell-cycle-regulated association of RAD50/MRE11/NBS1 with TRF2 and human telomeres. *Nature Genetics*. Vol 25(3). 347–52.