

**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS
AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE INFECTÓMICA Y PATOGÉNESIS MOLECULAR

“Análisis de la dimetilación de lisinas en proteínas de *Entamoeba histolytica* en condiciones basales y en la fagocitosis”

TESIS

Que presenta

Q.B.P. Hernández Acatitla Edwin Arturo

Para obtener el grado de

Maestro en Ciencias

En

Infectómica y Patogénesis Molecular

Director

Dr. Mario Alberto Rodríguez Rodríguez

Ciudad de México, Agosto del 2017

Índice de contenido

Índice de contenido	i
Índice de tablas	iii
Índice de figuras	iv
Índice de abreviaturas	v
Resumen	vi
Abstract	vii
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Ciclo de vida de <i>E. histolytica</i>	1
1.2. Mecanismos de patogenicidad.....	4
1.2.1. Fagocitosis en <i>E. histolytica</i>	5
1.3. Epigenética	8
1.4. Modificaciones post-traduccionales.	8
1.5. Enzimas metiltransferasas de lisina	9
1.6. Funciones moleculares de la metilacion en lisina	11
1.7. Metilación en proteínas no-histonas.....	14
1.8. Características de la regulación de la cromatina en protozoarios	14
1.9. Proteínas metiltransferasas de lisina en parásitos protozoarios	17
1.10. Enzimas metiltransferasas de lisina en <i>E. histolytica</i>	18
2 JUSTIFICACIÓN.....	22
3 HIPOTESIS.....	23
4 OBJETIVOS.....	24
4.1. Objetivo general	24
4.2. Objetivos específicos	24

5. Metodología experimental	25
5.1. Cultivo de trofozoítos de <i>E. histolytica</i>	25
5.2. Obtención de glóbulos rojos.....	25
5.3. Fagocitosis de eritrocitos de <i>E. histolytica</i>	26
5.4. Análisis <i>in silico</i> del posible interactoma de EhHKMT2 y EhHKMT4.....	26
5.5. Inmunofluorescencia.....	26
5.6. Obtención de extracto proteico total de <i>E. histolytica</i>	27
5.7. Western blot del perfil de metilación de <i>Entamoeba histolytica</i>	27
5.8. Análisis estadístico.....	28
6. Resultados	29
6.1. Perfil de dimetilación de lisinas en trofozoítos de <i>E. histolytica</i> en condiciones basales y después de 20 min de fagocitosis.	29
6.2. Localización celular de proteínas con dimetil lisinas en trofozoítos durante la eritrofagocitosis.....	33
6.3. Interactoma de las metil transferasas de lisina homólogas en humano	36
7. Discusión.....	40
8. Conclusiones.....	44
9. Perspectivas.....	45
10. Referencias bibliográficas	46

Índice de tablas

Tabla	Página
1. Principales blancos proteicos de metil transferasas de lisina y su función en cada proceso.	15
2. Posibles proteínas amibianas que interactúan con HKMT	31

Índice de figuras

Figura	Página
1. Ciclo de vida de <i>Entamoeba histolytica</i> .	3
2. Proteínas involucradas en la fagocitosis de <i>E. histolytica</i> .	7
3. Residuos de lisina metilables en histonas canónicas H2A, H2B, H3 y H4.	11
4. Mecanismos moleculares de metilación en lisina.	13
5. Identificación de las enzimas metil transferasas de lisina presentes en <i>E. histolytica</i> .	19
6. Localización de la EhHKMT2 y EhHKMT4 durante el proceso de eritrofagocitosis.	21
7. Perfiles de dimetilación en extractos de <i>E. histolytica</i>	31
8. Análisis densitométricos de proteínas dimetiladas presentes en extractos de <i>E. histolytica</i> .	32
9. Localización de proteínas dimetiladas durante el proceso de eritrofagocitosis	34
10. Análisis cuantitativo de la intensidad de dimetilación	35
11. Interactoma de las HKMT de humano homólogas a EhKMT2 y EhHKMT4	38

Índice de abreviaturas

BSA	Del inglés “Bovine serum albumin”
DNA	Del inglés “Deoxyribonucleic acid”
EhHKMT	Del inglés “ <i>Entamoeba histolytica</i> histone lysine methyl transferase”
ESCRT	Del inglés “endosomal sorting complexes required for transport”
KMT	Del inglés “Lysine methyl transferase”
min	Minutos
PRMT	Del inglés “Protein arginine methyl transferase”
PTM	Del inglés “Postraduccional modifications”
RNA	Del inglés “Ribonucleic acid”
SAM	S-adenosin metionina

Resumen

Los parásitos cuentan con diversos mecanismos que les permiten adaptarse a diferentes condiciones ambientales y controlar sus factores de virulencia, uno de estos mecanismos está dado por la epigenética, en particular por las modificaciones postraduccionales de histonas. Recientemente, nuestro equipo de trabajo caracterizó cuatro enzimas metiltransferasas de lisina presentes en *Entamoeba histolytica*, un parásito protozooario que presenta una distribución mundial y que es responsable de aproximadamente 100,000 muertes al año. Esas enzimas, que llamamos EhHMKT1 a EhHKMT4, mostraron la capacidad de metilar histonas comerciales en residuos de lisina, proteínas que en otros organismos son importantes para la regulación epigenética. Además, se observó que dos de estas enzimas (EhHKMT2 y EhHKMT4) se localizan alrededor de las vesículas fagocíticas durante la ingestión de eritrocitos. Debido a lo anterior, el objetivo de este trabajo fue analizar los cambios en la metilación de lisina en proteínas de trofozoítos en condiciones normales y después de 20 minutos de eritrofagocitosis. Para ello, mediante ensayos de Western blot, utilizando anticuerpos anti-dimetil lisina, se determinó el perfil de proteínas dimetiladas en condiciones normales y después de 20 min de fagocitosis. Los resultados obtenidos sugieren que durante el proceso de eritrofagocitosis hay una disminución en la dimetilación de proteínas, pero al mismo tiempo se detectó la presencia de dos proteínas dimetiladas que no se aprecian en los trofozoítos en condiciones basales. Además, por inmunofluorescencia y microscopia confocal, se confirmó la disminución de la metilación después de 20 min de fagocitosis y se observó la presencia de proteínas metiladas alrededor de algunos eritrocitos ingeridos. Por otra parte, se realizaron análisis *in silico* para sugerir el interactoma putativo de EhHKMT's. Estos resultados sugieren que la metilación y desmetilación de lisinas pueden participar en el mecanismo de regulación de la fagocitosis en *E. histolytica*.

Abstract

Parasites have diverse mechanisms that allow them to adapt to different environmental conditions and control their virulence factors. One of these mechanisms is given by epigenetics, in particular by post-translational modifications. Recently, our laboratory characterized four lysine methyltransferases present in *Entamoeba histolytica*, a parasitic protozoan that presents a worldwide distribution and is responsible for approximately 100,000 deaths per year. These enzymes, that we called EhHKMT1 to EhHKMT4, showed the ability to methylate commercial histones in lysine residues, proteins that are important for epigenetic regulation in other organisms. In addition, it was observed that two of these enzymes (EhHKMT2 and EhHKMT4) are localized around of the phagocytic vesicles during the ingestion of erythrocytes. Due to that, the aim of this work was to analyze the changes in lysine methylation in trophozoite proteins under normal conditions and after 20 min of erythrophagocytosis. We first performed *in silico* analyzes to suggest the putative interactome of these EhHKMT's. On the other hand, by Western blot assays, using antibodies against dimethyl lysine, we determined the profile of dimethylated proteins in basal conditions and after 20 min of phagocytosis. Results suggested that during phagocytosis there is a diminishing in dimethylated proteins, but at the same time, we detected the presence of two dimethylated proteins that were not observed in the trophozoites under basal condition. In addition, by immunofluorescence and confocal microscopy we determined that the decrease in methylation after 20 min of phagocytosis and the presence of methylated proteins was observed around some ingested erythrocytes. On the other hand, *in silico* analyzes were performed to suggest the putative interactoma of EhHMMT's. These results suggest that methylation and demethylation of lysines could participate in the mechanism of regulation of phagocytosis in *E. histolytica*.

1. INTRODUCCIÓN

Entamoeba histolytica es el parásito protozoario causante de la amibiasis intestinal, caracterizado por presentar una gran capacidad invasiva. Este parásito presenta una distribución mundial, afectando a más del 10% de la población, causando aproximadamente 100,000 muertes al año, sobre todo en países en desarrollo (Karim M., 2008). Lo anterior hace que *E. histolytica* siga siendo una causa importante de morbilidad y mortalidad en diferentes países, en donde presenta una incidencia del 2.2%, sobre todo en niños menores de 6 años (Karim, 2008).

México es uno de los principales países en donde hay mayor prevalencia del parásito, siendo una de las principales causas de enfermedad, sin embargo, debido al acceso de fármacos antiamebianos, el porcentaje de muerte y complicaciones severas ha disminuido en los últimos años (González, 2012). Sin embargo, aun con el acceso a fármacos, algunos estudios han reportado que cerca del 8.4% de la población mexicana presenta anticuerpos específicos contra dicho parásito, lo cual indica que han estado en contacto con éste en algún momento de su vida (González, 2012)

1.1. Ciclo de vida de *E. histolytica*.

E. histolytica presenta dos estadios en su ciclo de vida, el quiste y el trofozoíto. El quiste es la fase infectante, ya que se puede encontrar contaminando alimentos y bebidas, además de resistir las condiciones adversas del ambiente como desecación y temperaturas arriba de los 37°C (González, 2012). Presenta una estructura redondeada de 10-15 µm, contiene una cromatina con gránulos uniformes y finos; contiene cuatro núcleos con un cariosoma pequeño central (Becerril, 2012). El trofozoítotrofozoíto es la fase móvil y causante de todos los síntomas durante la enfermedad, pues es capaz de residir en la mucosa intestinal

e invadir la mucosa; presenta un diámetro de 15-20 μm , en su morfología se distinguen dos capas, el ectoplasma encargado el movimiento del parásito debido a la presencia de miosina y actina, que al contraerse permiten su desplazamiento, y el endoplasma el cual contiene a todos los organelos de la amiba (Becerril, 2012).

El ciclo de vida de *E. histolytica* (figura 1) inicia cuando los quistes entran a la cavidad bucal mediante la ingesta de alimentos o bebidas contaminados y recorren el tubo digestivo hasta llegar al estómago, en donde, debido al pH ácido de los jugos gástricos y las enzimas hidrolíticas, la pared del quiste se elimina, de esta forma se libera la fase de trofozoíto al llegar al duodeno. Esta fase presenta cuatro núcleos, los cuales se dividen inmediatamente para dar lugar a un trofozoíto con 8 núcleos, sin embargo, debido a que esta fase es muy inestable, cada núcleo se separa y origina 8 trofozoíto denominados metaquísticos (González, 2012); estos viajan a través de la luz intestinal hasta llegar al intestino grueso y colonizarlo.

A pesar de que cerca del 90% de las infecciones cursan asintómicamente, después de días o años puede ocurrir la invasión intestinal, la cual se va a caracterizar por dolor abdominal intenso y diarrea sanguinolenta, acuosa o mucoide, acompañada de constipación y tenesmo (González, 2012). Por razones aún no determinadas, en algunos trofozoítos se induce el cambio hacia la fase quística. Los quistes son expulsados en las heces, permaneciendo viables por un largo periodo de tiempo (González, 2012; Becerril, 2012). En algunos casos, los trofozoítos son capaces de entrar al torrente sanguíneo y diseminarse a otros órganos como piel, pulmón, riñón y cerebro, a lo cual se denomina amibiasis extraintestinal (Becerril, 2012). El hígado es el órgano más comúnmente invadido debido a la diseminación vía hematogena de los trofozoítos, en específico a través de la vena porta. La invasión a este tejido está acompañada de un reclutamiento de neutrófilos, necrosis y de la formación de múltiples abscesos (González, 2012).

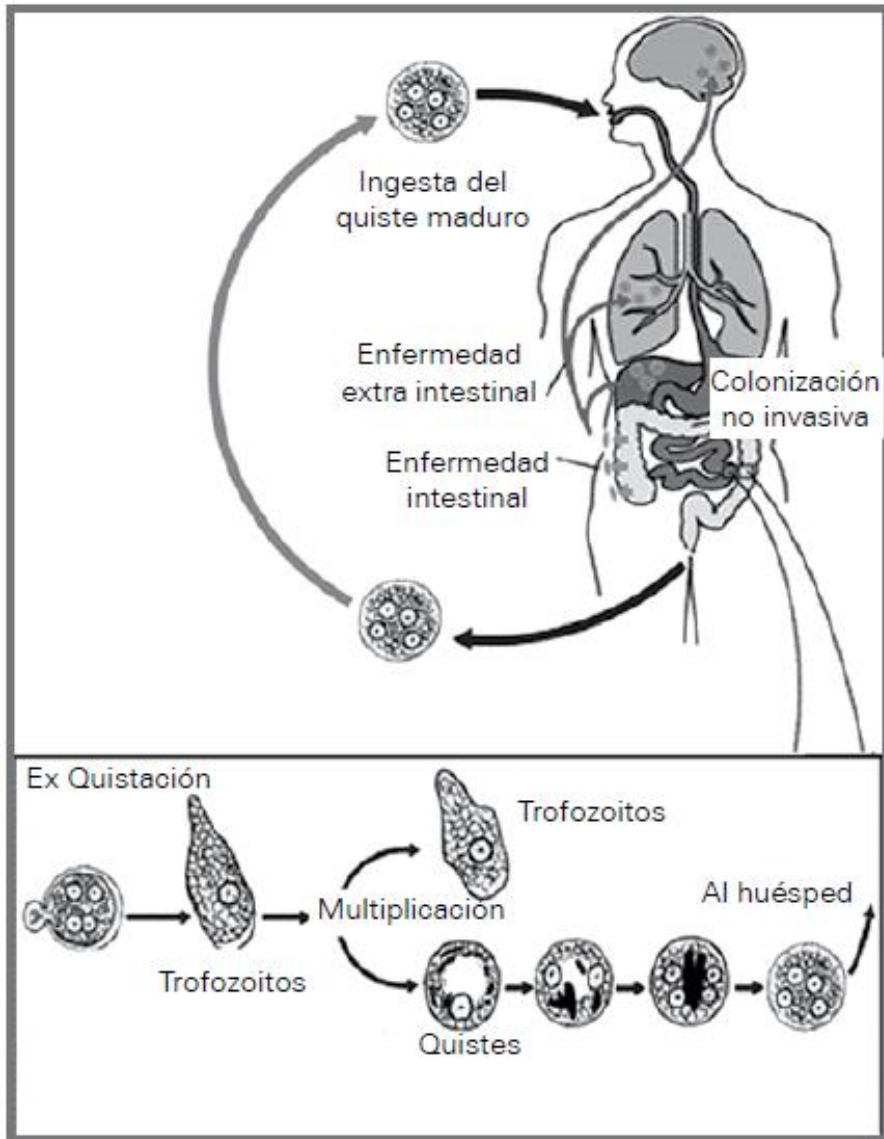


Figura 1. Ciclo de vida de *Entamoeba histolytica*. El ciclo inicia con el consumo de los quistes (fase infecciosa) que se encuentran en el medio ambiente contaminando alimentos y bebidas. Una vez en el intestino sufren un proceso de desenquistamiento dando lugar a la fase invasiva, denominada trofozoíto, el cual viaja hasta el intestino grueso para adherirse a la mucosa e iniciar el proceso de invasión. En la parte terminal del intestino grueso los trofozoítos pueden volver a enquistarse y ser liberados al medio ambiente junto con las heces, los cuales son capaces de soportar condiciones extremas hasta volver a infectar a otro humano. (Tomado de Campos-Peralta , 2011).

1.2. Mecanismos de patogenicidad

Los mecanismos por los cuales este parásito puede llegar a causar daño se dividen en adhesión, citólisis dependiente de contacto y fagocitosis (Campos-Peralta, 2011).

La adhesión es el primer paso para la invasión intestinal, el cual requiere de un mecanismo específico, en donde están involucradas diferentes proteínas de superficie denominadas adhesinas, así como sus ligandos en las células blanco (receptores). Entre las adhesinas identificadas se encuentran: las lectinas de unión a oligómeros de N-acetil-glucosamina y a residuos de galactosa/N-acetil-galactosamina (Gal/GalNac), el complejo EhCPADH, el antígeno lipofosfoglicano, las proteínas ricas en serina (SREHP) de 52 kDa, y las proteínas de 90, 70, 50 y 24 kDa (Petri *et al.*, 1987; Meza. *et al.*, 1987; Rodriguez *et al.*, 1989; Stanley *et al.*, 1990). Una de las proteínas más importantes es la lectina heterotrimérica Gal/GalNac, la cual está compuesta por una cadena pesada, una intermedia y una ligera, en donde la primera contiene en su C-terminal el dominio de reconocimiento para el carbohidrato (Campos-Peralta, 2011; Marie & Petri, 2014)

La citólisis ocurre cuando los trofozoítos de *E. histolytica* entran en contacto con la célula blanco del intestino, activando una variedad de mecanismos con la finalidad de inducir un daño citotóxico, ejemplos de estos mecanismos son el incremento de calcio intracelular, producción de especies reactivas de oxígeno, pérdida de la integridad de la membrana, fragmentación de material genético, exposición de fosfatidil serina y la activación de la caspasa 3 (Campos-Peralta, 2011). En este proceso se ven involucradas las cisteína proteasas y los ameboporos, las primeras presentan una gran importancia durante la invasión debido a su capacidad de degradar proteínas propias de la matriz extracelular, además de estar involucradas durante la evasión de la respuesta inmune por parte del parásito (Campos-Peralta, 2011). Se han descrito cerca de 50 tipos de cisteína proteasas en el parásito, de las cuales EhCP1, 2 y 5, comprenden el 90% de la actividad total de este parásito (Marie & Petri, 2014; Reyes & León, 2002).

Por otra parte, los ameboporos son polipéptidos solubles que se insertan en la membrana de la célula blanco por la unión de fosfolípidos, este proceso esta mediado por la interacción péptido-péptido, difundiendo en la membrana y formando un canal por el cual los iones y otras moléculas salen de la célula, resultando en una lisis celular debido al cambio en el medio interno (Reyes & León, 2002).

La fagocitosis es uno de los procesos más importantes, pues determina el grado de virulencia de este protozoario (Orozco *et al.*, 1983), además que, para el diagnóstico clínico, la eritrofagocitosis es el mejor indicador de la presencia de amibas invasivas en el intestino (Campos-Peralta, 2011). Este proceso puede dividirse en varios pasos tomando en cuenta criterios morfológicos y bioquímicos. Así, la fagocitosis inicia con la unión de partículas o células a los receptores de la célula fagocítica; dicha interacción entre ligandos y receptores desencadena una serie de eventos, incluyendo la formación de pseudópodos mediante la reorganización del citoesqueleto, los pseudópodos se cierran alrededor de la partícula para llevar a la formación de un fagosoma, el cual a su vez se une a los lisosomas, lo que conduce a la digestión del material internalizado (Marion, *et al.*, 2005).

1.2.1. Fagocitosis en *E. histolytica*.

La fagocitosis es un proceso indispensable para diferentes organismos, siendo responsable del crecimiento celular, defensa contra algunos patógenos en humanos, pero también es uno de los mecanismos de patogenicidad más importantes de *E. histolytica*, el cual le permite internalizar microorganismos del intestino grueso, así como células propias del hospedero durante la invasión al tejido, por ejemplo células inmunes y eritrocitos (Okada M. & Nozaki T., 2005).

Dicho proceso esta constituido por diferentes etapas, iniciando por el reconocimiento y unión a ligandos en las células blanco a través de la lectina

Gal/GalNac, activación de una vía de señalización que permite la reorganización del citoesqueleto, además de un tráfico vesicular que juega un papel importante en la fagocitosis (Okada M. & Nozaki T., 2005; Okada M., *et al.*, 2004).

Hace unos años, las moléculas que participan en el proceso de fagocitosis de la ameba eran totalmente desconocidas, sin embargo, mediante estudios de cromatografía y espectrometría de masas se lograron identificar las proteínas involucradas en la biogénesis de los fagosomas y su movilización, algunas de estas se representan en la figura 2.

Así, se han estudiado una gran variedad de proteínas que participan en los pasos tempranos de la fagocitosis, las cuales incluyen a la lectina Gal-GalNac, el complejo EhCPADH y proteínas presentes en los fagosomas tempranos, como la actina y proteínas de unión a la misma, incluyendo la miosina IB (Laurent & Guillén, 2005).

Recientemente se ha demostrado que *E. histolytica* presenta una maquinaria proteica encargada de la formación de las copas fagocíticas y que promueve la movilización de actina para llevar a cabo la fagocitosis de diferentes moléculas, este complejo proteico es el Arp 2/3, el cual está constituido por 7 proteínas con diferentes funciones a lo largo de dicho proceso, además de estar presente en diferentes células eucarióticas (Babuta *et al.*, 2015). De este complejo se ha demostrado que la proteína EhARPC1 participa durante las etapas tempranas de la fagocitosis y no durante la internalización del fagosoma (Babuta *et al.*, 2015).

También se ha demostrado el papel de la GTPasa Rab8A en la fagocitosis, esta molécula regula el transporte de los receptores de membrana del retículo endoplasmático a la membrana citoplasmática (Hanadate *et al.*, 2016). Además de ésta, se ha demostrado la participación de otras proteínas Rab como EhRabB (Hernández-Alejandro M. *et al.*, 2013), EhRab5 (Okada *et al.*, 2005), EhRab7A y EhRab7B (Okada *et al.*, 2006), en el proceso de maduración del fagosoma.

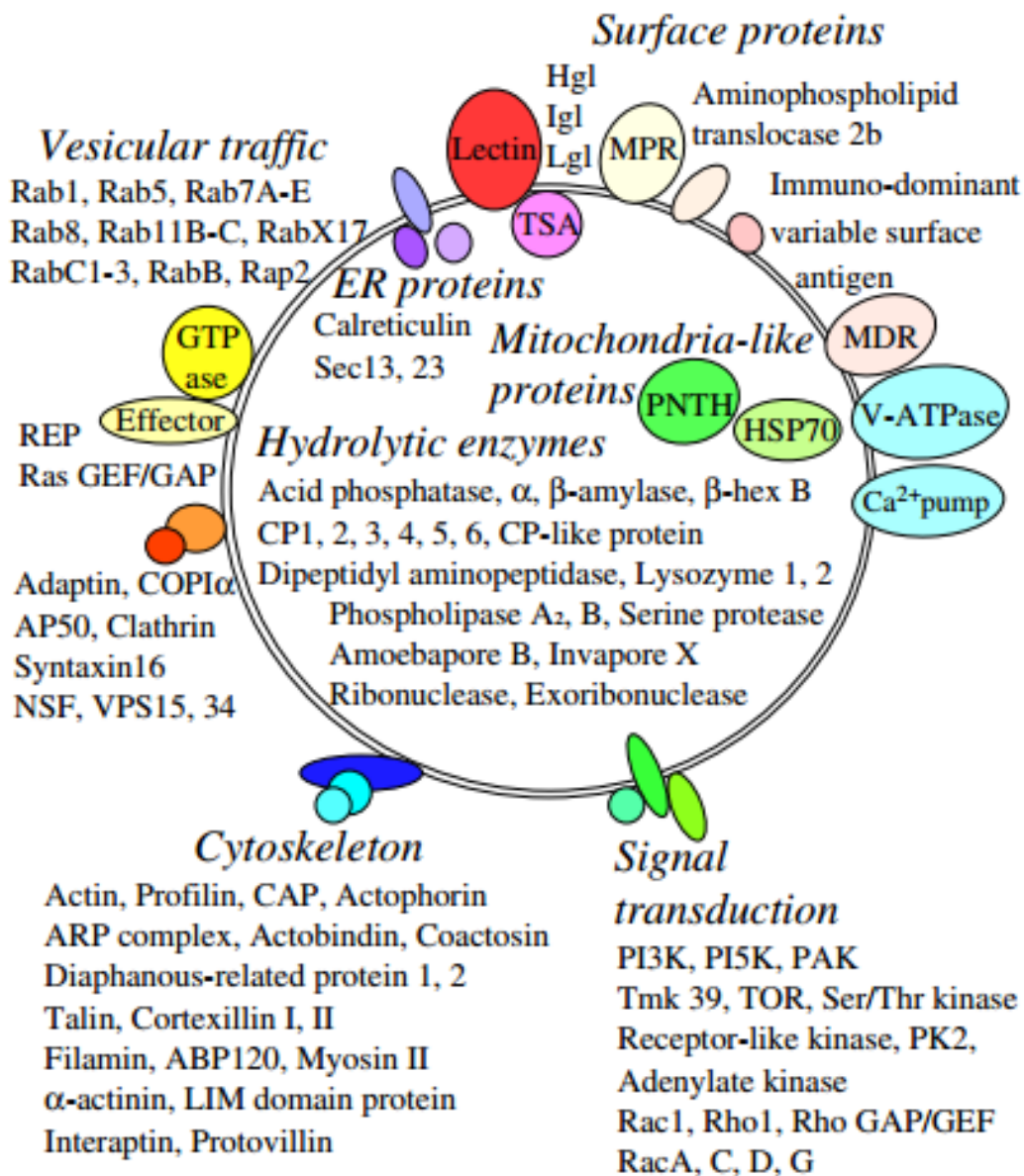


Figura 2. Proteínas involucradas en el proceso de fagocitosis de *E. histolytica*. En la figura podemos observar algunas de las proteínas involucradas en cada una de las etapas de la fagocitosis llevada a cabo por el parásito protozoario *E. histolytica* (Okada M. & Nozaki T., 2005).

Debido a la presencia de diferentes proteínas durante el proceso de fagocitosis, así como en cada una de las etapas de su ciclo de vida, es necesario que *E. histolytica* regule la expresión y la actividad de las proteínas dependiendo del ambiente que la rodee. Las modificaciones postraduccionales permiten dicha regulación y de lo cual profundizaremos a continuación.

1.3. Epigenética

La epigenética es un fenómeno que permite la regulación de la expresión genética mediante diferentes mecanismos, como la metilación del DNA, modificaciones post-traduccionales de histonas, remodelamiento de la cromatina y la expresión de micro RNA (miRNA) a diferentes genes. Así, la epigenética permite la expresión o represión de diferentes genes bajo diversas condiciones ambientales, sin llegar a alterar el material genético (Calorina-Dalmasso, 2011; Recillas & Escamilla, 2004).

La modificación post-traduccionales de histonas es uno de los mecanismos epigenéticos que controlan la expresión de genes vía transcripción, replicación y reparación (Levy E., *et al.* 2017).

1.4. Modificaciones post-traduccionales.

Las modificaciones post-traduccionales de proteínas (PTM por sus siglas en inglés) crean una red intrincada de modulación sobre el proteoma de diferentes organismos, dichas modificaciones tienen como blanco los residuos de aminoácidos de algunas proteínas (Lanouette S., *et al.*, 2014). De entre los 20 aminoácidos existentes, se ha visto que la lisina es aquella que sufre la mayor cantidad de modificaciones, entre las cuales tenemos la acetilación, hidroxilación, glicosilación, propionilación, ubiquitinación y metilación, entre otras. Se ha visto que la metilación es la PTM que presenta un gran potencial para alterar el

funcionamiento de la proteína en residuos de lisina modificadas (Lanouette S., *et al.*, 2014; Zhang Z., *et al.*, 2012).

En la actualidad la metilación en lisina está presente en proteínas nucleares y citoplasmáticas, considerándose una modificación prevalente en eucariotes, procariotes y el dominio archea (Pang., *et al.* 2010).

1.5. Enzimas metiltransferasas de lisina

La metilación es llevada a cabo por las enzimas metiltransferasas, las cuales están clasificadas en dos grupos y utilizan al S-adenosil-L-metionina (SAM) como donador de grupos metilo. El primer grupo de proteínas pertenecen a una gran familia de metiltransferasas que se ha encontrado en organismos eucariotes, procariotes y en organismos del dominio archea. La principal función de estas enzimas es la metilación de cadenas de DNA, RNA o aminoácidos como arginina, glutamina, aspartato e histidina (Schubert L., *et al.*, 2003; Brian & John, 2009).

El segundo grupo de enzimas, llamadas de clase I y que transfieren los grupos metilo a residuos de lisina (metiltransferasas de lisina o KMT's), contienen un dominio catalítico denominado SET, debido a que fue primeramente identificado en tres proteínas de *Drosophila*: SU (var), Enhancer of Zeste y Trithorax (Tschiersch *et al.*, 1994). En 1995 Klein y Hutz descubrieron que las plantas presentan una variedad de proteínas con función de metiltransferasas, las cuales contenían el dominio SET en su estructura, apoyando el hecho de que este dominio confiere dicha función. Adicionalmente, se ha descubierto que en varias metiltransferasas este dominio está flanqueado por dos regiones ricas en cisteína llamados dominios preSET y postSET, las cuales también participan en la actividad enzimática (Zhang & Reinberg, 2001; Klein & Houtz, 1995).

Basado en la similitud de sus secuencias, estas enzimas se dividen en siete diferentes familias: SUV3/9, SET1, SET2, SMYD, EZ, SUV4-20 y RIZ (Dillon C., *et al.*, 2005).

Uno de los principales blancos proteicos de estas enzimas son las histonas (Figura 3), las cuales son proteínas estructurales que compactan el genoma y regulan el acceso al DNA. Estas son clasificadas en cuatro tipos principales: H2A, H2B, H3 y H4, además de la histona de unión H1. Las histonas forman un octámero de proteínas, se encuentran organizadas en parejas, teniendo a la H3 con la H4 y la H2A con la H2B, estos dímeros se encuentran compactados y se ensamblan en la estructura básica de organización para la cromatina, el nucleosoma (Calorina-Dalmasso, 2011).

Los nucleosomas son blanco importante de modificaciones post-traduccionales, pues los extremos amino terminales de las histonas sobresalen de la estructura globular propia de los nucleosomas. Estas regiones terminales son ricas en residuos de lisina, las cuales son un blanco importante de una variedad de modificaciones además de la metilación, teniendo un efecto sobre su funcionamiento y degradación (Recillas & Escamilla, 2004).

La función de la metilación en las histonas dependerá del residuo que haya sido metilado, por ejemplo, hay una asociación de la actividad del inicio de la transcripción cuando la lisina 4 (K4) de la histona 3 (H3) es metilada; pero, hay una formación de heterocromatina cuando se metila H3K9, y por lo tanto, silenciamiento del cromosoma X; además, existe represión transcripcional cuando se metila H3K27, alargamiento transcripcional cuando está involucrada la metilación de H3K36 y respuesta al daño en el DNA debido a la metilación de H4K20 (Black JC., *et al.*, 2012; Cao R. & Zhang Y., 2004)

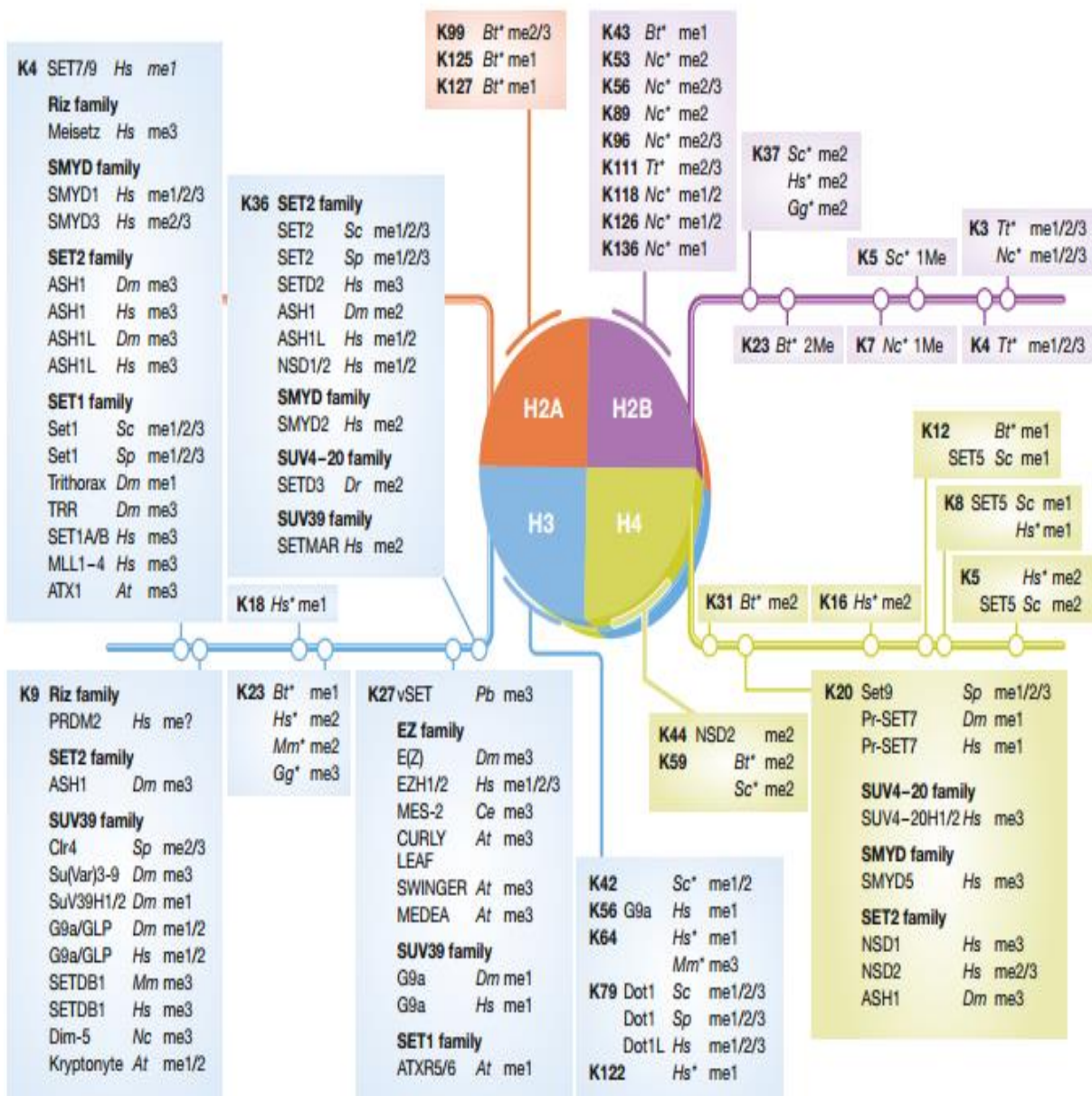


Figura 3. Residuos de lisina metilables en las histonas canónicas H2A, H2B, H3 y H4. Aquí se representan los tipos de metilación que llevan a cabo las enzimas de cada familia de metil transferasas. Los números en negritas representan los residuos de lisina metilados, las letras itálicas indican el organismo en donde se encuentra dicha modificación. *At*, *Arabidopsis thaliana*; *Bt*, *Bos taurus*; *Ce*, *Caenorhabditis elegans*; *Dm*, *Drosophila melanogaster*; *Dr*, *Danio rerio*; *Gg*, *Gallus gallus*; *Hs*, *Homo sapiens*; *Mm*, *Mus musculus*; *Nc*, *Neurospora crassa*; *Pb*, *Paramecium bursaria*; *Sc*, *Saccharomyces cerevisiae*; *Sp*, *Schizosaccharomyces pombe*; *Tt*, *Tetrahymena thermophila*. A* indica residuos de lisina modificados por una enzima aun no identificada. Tomado de Lanouette S., et al., 2014.

A comparación de otras PTM, la metilación no modifica la carga positiva de la cadena, es decir no hay diferencia de carga entre proteínas metiladas en lisina y las no metiladas, además solo provoca un pequeño cambio en la masa de la proteína, debido a que el peso molecular del grupo metilo es muy bajo en comparación a otras modificaciones.

Se ha puesto en evidencia como es que la metilación de lisinas actúa en diferentes mecanismos (Figura 4), por ejemplo, en el 2010 Pang y colaboradores observaron que de los residuos metilados en *S. cerevisiae*, 43% de ellos corresponden a sitios que pueden ser ubiquitinados, aumentando la posibilidad de que la metilación incremente la estabilidad de las proteínas por competencia con la ubiquitinación o siendo considerada una forma de regular la ubiquitinación.

También se ha visto que la metilación de un residuo de lisina en específico permite la adición de otra modificación en el mismo sitio, este tipo de mecanismo se le denomina “methyl switches” en donde el residuo metilado estimula o inhibe la modificación del residuo cercano, el ejemplo más común es el de la metilación de p53 en la lisina 372 depende de la acetilación de lisinas cercanas (Kurash K., *et al.*, 2008). Además de esta función, las lisinas metiladas son capaces de crear una superficie de unión para el reclutamiento de otras proteínas, gracias al reconocimiento de las metilaciones por proteínas con cromodominios; por ejemplo, las proteínas que forman parte de la familia Royal, las cuales fueron descritas en histonas (Bannister AJ., *et al.*, 2001).

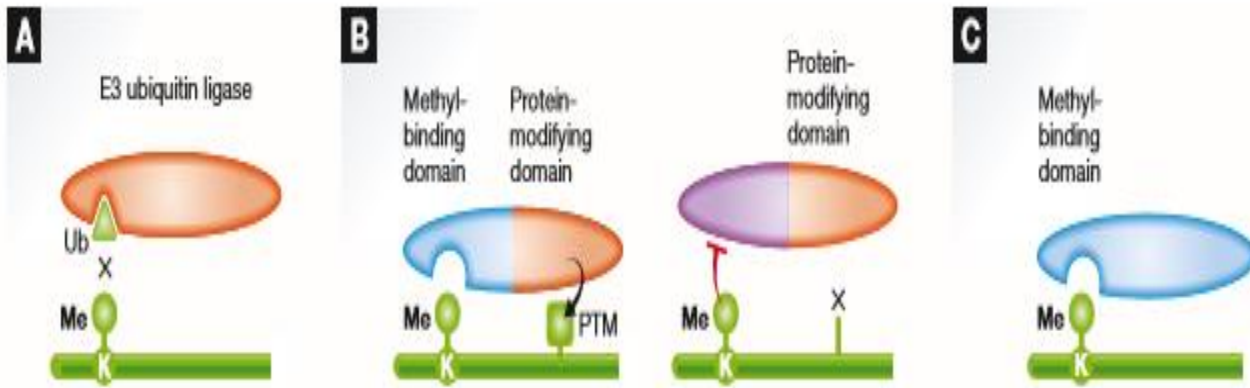


Figura 4. Mecanismos moleculares de la metilación de lisina. Aquí podemos ver cómo es que la metilación en los residuos de lisina impacta en otros mecanismos y PTM; **A)** la metilación de lisina impacta en la ubiquitinación; **B)** la metilación de lisina controla de manera indirecta la adición de otras PTM; **C)** la metilación de lisina controla la interacción proteína-proteína. Tomado de Lanouette S., *et al.*, 2014.

1.7. Metilación en proteínas no-histonas

Debido a que las metiltransferasas de clase I no solo se encuentran en el núcleo, sino también en el citoplasma; se ha observado que además de ser importantes reguladores de procesos epigenéticos, también participan en la regulación de otras funciones proteicas, pues se ha demostrado que son capaces de metilar un gran repertorio de sustratos proteicos (Mohamed *et al.*, 2011). Es importante mencionar que la metilación incrementa la hidrofobicidad y el carácter básico del residuo de lisina, lo cual permite que otras proteínas interactúen con esta lisina metilada (Hamamoto *et al.*, 2015).

En eucariotes, algunas proteínas chaperonas son reguladas mediante la metilación de lisina en donde una de las primeras proteínas no-histonas en ser descritas como sustrato de metiltransferasas de lisina es la p53, la cual juega un papel muy importante como supresor de tumores (Chuikov *et al.*, 2004). Entre otras proteínas no-histonas que son metiladas en residuos de lisina, se encuentran los factores de transcripción STAT3 y NF κ B (Sriharsa *et al.*, 2009). En la tabla 1 se muestran algunos ejemplos de las proteínas metiladas por las diferentes familias de metiltransferasas, así como el efecto que tiene dicha PTM (Chuikov *et al.*, 2004).

1.8. Características de la regulación de la cromatina en protozoarios

Todos los parásitos protozoarios presentan un ciclo de vida complejo, en el cual deben adaptarse a las diferentes condiciones que se presentan cuando están en el hospedero y en el medio ambiente, además de adaptarse a las condiciones en diferentes hospederos; es por esto que son necesarias diferentes estrategias que le permitan sobrevivir al ambiente por periodos largos de tiempo, entre las que se encuentra la regulación epigenética y por lo tanto la metilación de lisinas en histonas (Calorina-Dalmasso, 2011).

Tabla 1. Principales blancos proteicos de metil transferasas de lisina y su función en cada proceso.

Metil transferasa	Proteína	Lisina	Tipo de metilación	Efecto de la metilación
Transcripción				
SMYD2	p53	379	Mono metilación	Reprime la actividad de p53.
SET8	p53	382	Mono metilación	Suprime la actividad transcripcional de genes altamente responsivos.
SET7/9	NF- κ B	37	Mono metilación	Regula la unión del promotor de p65, necesario para algunos genes blanco.
	AR	630	Mono metilación	Promueve la transactivación de AR a través de la interacción del dominio N-C
SETD6	NF- κ B	310	Mono metilación	Regula de manera positiva la metilación de H3K9
Síntesis de proteínas				
EftM	EF-Tu	5	Tri metilación	Media la interacción con el receptor PAF y permite la invasión por <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .
Rkm1	RL23ab	106	Dimetilación	Afecta su posición en la subunidad pesada del ribosoma.

*Tomado de Lanouette S., *et al.*, 2014

Tabla 1. (Continuación)

Chaperonas				
SMYD2	HSP90	615	Mono metilación	Corrige la organización de miofilamentos.
SETD1A	HSP70	561	Dimetilación	Promueve la asociación AURKB para aumentar su actividad; promueve el crecimiento de células cancerígenas.
Metabolismo				
CaKMT	Calmodulina	115	Tri metilación	Reduce la activación de NAD cinasa; proliferación y estabilidad de calmodulina,

1.9. Proteínas metiltransferasas de lisina en parásitos protozoarios

La regulación de la expresión de genes es un proceso biológico central para diferentes procesos dentro del ciclo de vida de los parásitos, como diferenciación, desarrollo y reproducción. Como ya se ha mencionado anteriormente, uno de los mecanismos más importantes para la regulación, es la modificación de los extremos amino terminales de las histonas, lo cual puede llevar a la represión o activación de algunos genes (Recillas & Escamilla, 2004).

En el 2011, Heaslip y colaboradores demostraron la importancia de las metil transferasas en el parásito *Toxoplasma gondii*, pues se observó que una de estas enzimas se relocaliza a la periferia del mismo en respuesta a cambios en el ambiente. Además, en el mismo estudio se observó que la inhibición de la metiltransferasa de lisina provoca una disminución en la movilidad de *T. gondii*, comprometiendo a su vez su capacidad invasiva, así como el desarrollo de su ciclo lítico (Heaslip *et al.*, 2011).

Por otra parte, mediante análisis bioinformáticos se lograron identificar al menos 9 genes con el dominio SET en el parásito causante de la malaria *Plasmodium falciparum* (Cui *et al.*, 2008). Además, este parásito contiene las marcas específicas de metilación en los residuos K9, K4 y K36 de la histona H3 y en K20 de la histona H4 (Lopez-Rubio *et al.*, 2007). Estas marcas constituyen un importante mecanismo epigenético en la regulación de expresión de genes del parásito, debido a que se encuentran a lo largo del ciclo asexual eritrocítico del mismo (Cui *et al.*, 2008).

1.10. Enzimas metiltransferasas de lisina en *E. histolytica*.

La metilación de residuos de lisina ocurre también en *E. histolytica*. Al analizar el proteoma de este parásito se identificó una proteína conteniendo un dominio SET, sugiriendo que se trataba de una metiltransferasa de lisina, además de dos proteínas que unen marcas de metilación en las colas de las histonas (Bardees & Upinder, 2015; Karim, *et al.*, 2012). Además, se ha descrito que la dimetilación del residuo K27 de la histona H3 está involucrada en el silenciamiento de genes en este parásito (Bardees M. & Upinder S., 2015).

Recientemente, en nuestro grupo de trabajo se identificaron cuatro proteínas con el dominio SET en el extremo amino terminal, el cual es común en las metiltransferasas de clase I (Figura 5 A), además de una cuarta enzima que presenta el dominio SET en su extremo carboxilo terminal y un dominio TPR para interacción proteína–proteína, sugiriendo que éstas son metiltransferasas de lisina, denominándose EhHKMT 1, 2, 3 y 4 (Borbolla-Vázquez *et al.*, 2016).

Además, al realizar un árbol filogenético se percataron de que EhHKMT 1, 2, 3 están agrupadas en el mismo clado que las metiltransferasas de humano SMYD y SUV420H2 (Figura 5B), donde la primera metila la lisina 4 de la histona 3 y la lisina 5 de la histona 4, mientras que SUV420H2 dimetila la lisina 20 de la histona 4 (Hamamoto *et al.*, 2015; Borbolla-Vázquez *et al.*, 2016).

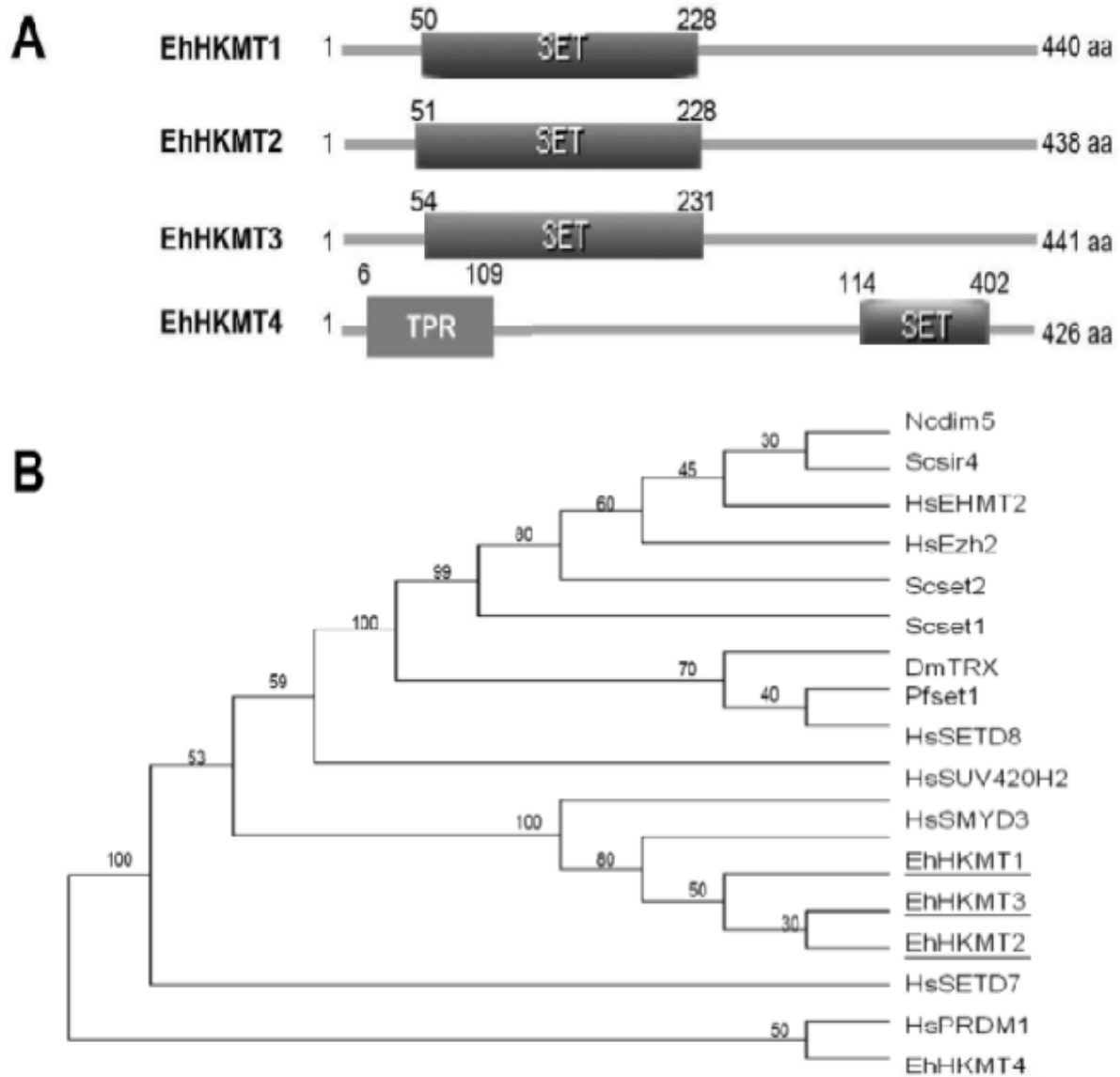


Figura 5. Identificación de las enzimas metil transferasas de lisina presentes en *Entamoeba histolytica*. A) Dominio SET presente en las enzimas metil transferasas de lisina, se puede apreciar que la HKMT lo presenta en el extremo carboxilo terminal. B) Comparación filogenética de las EhHKMT con otras HKMT (Borbolla-Vázquez *et al.*, 2016).

Al usar anticuerpos específicos contra EhHKMT1, EhHKMT2 y EhHKMT4 se identificó que estas enzimas están presentes tanto en núcleo como en el citoplasma de los trofozoítos de *E. histolytica* (Borbolla-Vázquez *et al.*, 2016), sugiriendo que sus proteínas blanco podrían ser histonas, así como proteínas no histonas.

Las 4 EhHKMT's fueron producidas de manera recombinante y para analizar su papel como metiltransferasas se realizó un ensayo de actividad enzimática *in vitro* con histonas comerciales (Roche) junto con el donador de metilos (SAM) y se encontró que todas fueron capaces de transferir grupos metilo marcados radiactivamente con tritio a las histonas (Borbolla-Vázquez *et al.*, 2016), poniendo en evidencia su actividad de metiltransferasa. Posteriormente, se realizaron los mismos ensayos enzimáticos pero esta vez, para revelar el residuo modificado, se utilizaron anticuerpos específicos contra residuos metilados en lisina en las histonas H3 y H4, encontrándose así que EhHKMT1 dimetila el residuo H3K20, EhHKMT2 trimetila el residuo H3K4 y EhHKMT4 trimetila el residuo H4K20 (Borbolla-Vázquez *et al.*, 2016). Interesantemente, las enzimas EhHKMT 2 y 4 se localizaron alrededor de vesículas fagocíticas a los 20 minutos de haber iniciado la fagocitosis de glóbulos rojos (Figura 6), sugiriendo que estas EhHKMTs podrían estar regulando algunas proteínas encargadas del proceso de fagocitosis, como EhADH, perteneciente al complejo endosomal requerido para el transporte (ESCRT por sus siglas en inglés) (Borbolla-Vázquez *et al.*, 2016). Sin embargo, hasta el momento se desconocen los blancos específicos de las EhKMTs sobre histonas y proteínas no-histonas de *E. histolytica*.

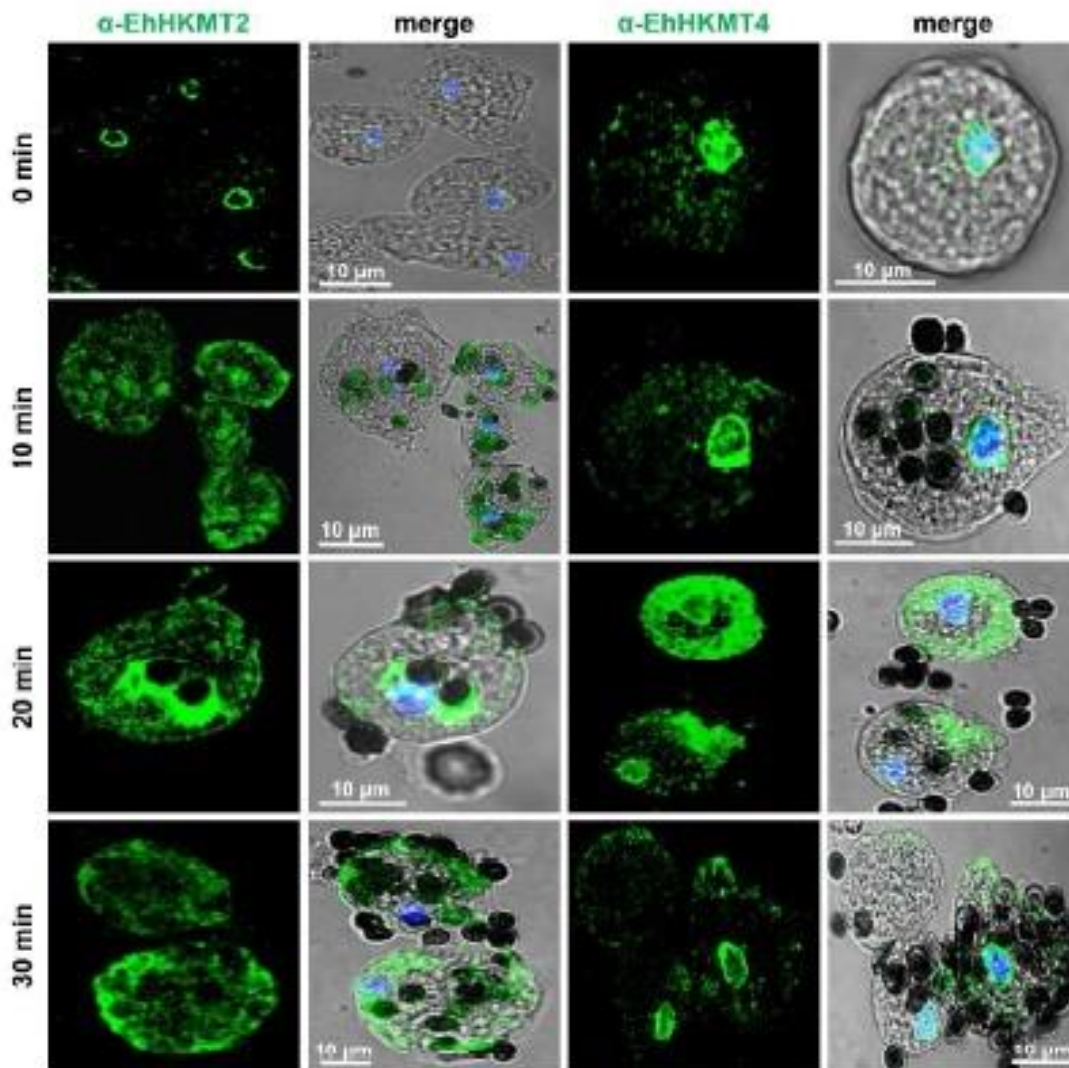


Figura 6. Localización de la EhHKMT2 y EhHKMT4 durante el proceso de eritrofagocitosis. Los trofozoítos de *E. histolytica* se incubaron con eritrocitos humanos a diferentes tiempos a una temperatura de 37 °C. Posteriormente se determinó la localización de las enzimas EhHKMT 2 y 4 mediante ensayos de inmunofluorescencia. Se puede observar un aumento en la concentración de las HKMT's a los 20 min de haber inducido la fagocitosis alrededor de las vesículas fagocíticas (Modificado de Borbolla-Vázquez J. *et al.*, 2016).

2. JUSTIFICACIÓN

Las modificaciones postraduccionales de las histonas, como la metilación son relevantes en la regulación epigenética de los organismos, influyendo en la expresión de diferentes funciones. Recientemente se ha encontrado que la metilación puede tener blancos no relacionados con las histonas, regulando funciones como apoptosis, transcripción, división celular, etc.

Investigaciones recientes han demostrado la presencia de cuatro metiltransferasas de lisina (EhHKMT) en el parásito intestinal *E. histolytica*. Todas las EhHKMT's recombinantes presentan actividad de metiltransferasa sobre histonas comerciales. Además, EhHKMT-2 y EhHKMT-4, se encuentran alrededor de las vesículas fagocíticas después de 20 min de fagocitosis, lo que sugiere la posible participación de esas enzimas en dicho proceso, que es uno de los eventos de patogenicidad de este parásito. Sin embargo, hasta el momento se desconocen las proteínas amibianas blanco de las EhHKMT's, así como la función que podría tener la metilación de lisina en ellas. Por lo tanto, resulta de interés identificar si existe metilación diferencial de proteínas en los trofozoítos de *E. histolytica* durante el proceso de eritrofagocitosis y en condiciones normales.

3. HIPÓTESIS

La metilación en residuos de lisina es una modificación post-traducciona que participa en la fagocitosis de *E. histolytica*.

4. OBJETIVOS

4.1 . Objetivo general

Comparar el patrón de dimetilación en lisinas de trofozoítos de *E. histolytica* en condiciones basales y durante la fagocitosis

4.2 Objetivos específicos

- 1) Comparar el patrón de dimetilación de lisinas entre proteínas de trofozoítos en condiciones basales y posterior a 20 min de fagocitosis.
- 2) Inmunolocalizar las proteínas con dimetilación de lisinas en trofozoítos en condiciones basales y posterior a 20 min de fagocitosis.
- 3) Sugerir el interactoma putativo de EhHKMT's.

5. Metodología experimental

5.1. Cultivo de trofozoítos de *E. histolytica*.

Los trofozoítos de la clona A (Orozco *et al.*, 1983), cepa HM1:IMSS, se cultivaron de manera axénica a 37 °C en medio TYI-S-33 suplementado con 15% de suero bovino adulto (Microlab, México) inactivado a 56 °C durante 30 min, 3% de mezcla de vitaminas de Diamon (KC Biológica), 40 UI de penicilina/mL (Lakeside) y 57 µg/mL de estreptomina (Lakeside). Los trofozoítos se cosecharon una vez que alcanzaron una confluencia aproximada de 80%, para lo cual éstos se mantuvieron a una temperatura de 4 °C durante 10 min para despegar las células de la pared de la caja de cultivo, se recolectaron en tubos y se centrifugaron a 1000 x g por 5 min. El paquete celular se resuspendió con PBS (NaCl 137 mM; KCl 2.7 mM; Na₂HPO₄ 10 mM y KH₂PO₄ 10 mM a un pH de 6.8) frío y estéril. Este procedimiento se repitió dos veces para asegurar el correcto lavado de los trofozoítos

5.2. Obtención de glóbulos rojos.

Se obtuvo una muestra de sangre humana (de cualquier tipo sanguíneo) por punción venosa, utilizando solución de Alsever (2.05% glucosa, 0.8% citrato de sodio, 0.055% ácido cítrico, 0.42% NaCl), como anticoagulante. La muestra se centrifugó a 500 x g y se lavó cuatro veces por 10 min con la misma solución. Los sobrenadantes que contenían a las células blancas se eliminaron y las pastillas con los eritrocitos se resuspendieron en medio TYI sin suero para su cuantificación con una cámara de Neubauer.

5.3. Fagocitosis de eritrocitos de *E. histolytica*.

Los trofozoítos en medio TYI sin suero se incubaron con glóbulos rojos humanos en una relación 1:25 a 37 °C durante 20 min. Después de transcurrido ese tiempo, los glóbulos rojos que no fueron ingeridos se lisaron mediante la adición de agua destilada fría, incubando durante 10 min a temperatura ambiente.

5.4. Análisis *in silico* del posible interactoma de EhHKMT2 y EhHKMT4.

Se utilizó el servidor de STRING (<https://string-db.org/>) el cual nos permite analizar secuencias de aminoácidos para detectar las proteínas que estén interactuando con nuestra proteína problema. En el servidor se analizaron las secuencias de las tres enzimas de humano homólogas de las EhHKMT2 y EhHKMT4 (SMYD3 y SUV420H2 para EhHKMT2 y PRDM1 para EhHKMT4). Posteriormente, se tomaron las secuencias blanco de cada una de las proteínas y se realizó un análisis de BLAST mediante el uso del servidor de NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) en la base de datos del genoma de *E. histolytica* (<http://amoebadb.org/amoeba/>) para identificar los posibles blancos proteicos de las metiltransferasas en la amiba.

5.5. Inmunofluorescencia.

Se colocaron aproximadamente 300 000 trofozoítos, en medio TYI-S-33, sobre un cubreobjetos limpio y se incubaron a 37 °C durante 40 min para asegurar su adhesión a la capa de vidrio. Posteriormente, los cubreobjetos se lavaron tres veces con 1 ml de PBS pH 7.2, teniendo cuidado de no despegar a los trofozoítos adheridos. Entonces, se adicionó 1 ml de paraformaldehído al 4% para fijar las células, después se lavaron tres veces con PBS y los trofozoítos se permeabilizaron con Tritón al 0.05% (en PBS) durante 10 min a temperatura

ambiente. Las muestras se lavaron nuevamente tres veces con PBS y los sitios de unión inespecífica se bloquearon con suero fetal bovino al 10% durante 40 min a temperatura ambiente. Posteriormente, se adicionó el anticuerpo primario α -Dimetil lisinas (Immunechem) (dilución 1:100) manteniendo la reacción a una temperatura de 4 °C durante toda la noche; posterior a ese tiempo, las muestras se lavaron tres veces con PBS y se adicionó el anticuerpo secundario α -conejo acoplado a Alexa 488 (Invitrogen) y se incubó a temperatura ambiente durante 40 min. Para finalizar, se añadieron 30 μ l de DABCO-PVA (2.5% DABCO, 10% polivinil alcohol, 5% glicerol y 25 mM de Tris pH 8.7) en portaobjetos limpios para montar los cubreobjetos sobre dicha solución y proseguir a su análisis mediante el uso del microscopio confocal Zeiss LSM700 con el cual se realizaron un total de 20 cortes para ver la señal de metilación.

5.5. Obtención de extracto proteico total de *E. histolytica*.

Para obtener los extractos, trofozoítos en condición basal y a los que fagocitaron durante 20 min (3×10^6 por condición) se resuspendieron en 200 μ l de solución de lisis (PHMB 100 mM, PMSF 100 mM, NEM 100 mM, E-64 0.05 mg/ml, Complete 5x (Roche), TLCK 70 mM, Tris 1M, RIPA 1X). Posteriormente, las muestras fueron sometidas a tres ciclos de congelación y descongelación, entre los cuales se mantuvieron 30 s en agitación con vórtex.

5.6. Western blot del perfil de metilación de *Entamoeba histolytica*.

A los extractos proteicos obtenidos anteriormente se le determinó la concentración de proteína mediante el método de Bradford (Bradford M., 1976). Posteriormente, 50 μ g de proteínas se separaron por electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS (SDS-PAGE) al 12% añadiendo 2 μ l de amortiguador de carga al 5x, los extractos se corrieron a 90 V por aproximadamente una hora con treinta min.

Posteriormente, los geles se tiñeron con azul de Coomassie para ver la integridad de las proteínas. Para analizar el patrón de metilación, los geles se transfirieron a papel de nitrocelulosa a un voltaje de 0.2 Amperes durante 2 h, para después realizar un ensayo de Western Blot. Para esto, la membrana se bloqueó con albumina sérica bovina (BSA) al 1% durante toda la noche a 4 °C, la membrana se lavó 5 veces con PBS Tween 0.05% durante 10 min. Se adicionó el anticuerpo anti- dimetil lisina (Immunechem) 1:1000 y se dejó incubando durante toda la noche a una temperatura de 4 °C. Al día siguiente la membrana se lavó como se mencionó anteriormente y se adicionó el anticuerpo secundario anti-conejo acoplado a peroxidasa (Jackson Immuno Research) (1:5000) y se incubó 2 h a temperatura ambiente.

5.7. Análisis estadístico

Los datos se graficaron empleando el programa GraphPad Prism V 5.01 y los valores representan la media \pm el error estándar de tres experimentos independientes. El análisis estadístico se realizó en el mismo programa empleando la prueba “t” student, donde la significancia fue de * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ y *** $p < 0.001$.

6. Resultados

6.1. Perfil de dimetilación de lisinas en trofozoítos de *E. histolytica* en condiciones basales y después de 20 min de fagocitosis.

Para analizar el patrón de proteínas dimetiladas en lisina de trofozoítos crecidos en condiciones basales y después de 20 min de fagocitosis, tiempo en el que se observó la presencia de las metiltransferasas de lisina EhHKMT2 y EhHKMT4 alrededor de las vacuolas fagocíticas (Borbolla-Vázquez, *et al.*, 2016), a partir de los extractos proteicos obtenidos de los trofozoítos en esas condiciones se realizaron ensayos de Western blot utilizando un anticuerpo dirigido contra dimetil lisinas. En geles teñidos con azul de Coomassie, los perfiles entre ambas condiciones se ven similares (Figura 7A). Por el contrario, los perfiles de dimetilación en lisina son diferentes, pues la señal de la mayoría de las proteínas disminuye después de 20 min de eritrofagocitosis en comparación con el control, además de observarse dos bandas diferenciales de aproximadamente 40 kDa en las proteínas de trofozoítos después de 20 min de fagocitosis (Figura 7B). Estas proteínas dimetiladas no se observaron en el extracto de eritrocitos, indicando que estas son proteínas amibianas que se dimetilan durante el proceso de fagocitosis.

Para determinar que realmente hubo un cambio en la metilación de las proteínas presentes en ambos grupos, se realizó una normalización con actina de algunas de las proteínas más llamativas presentes en los extractos (Figura 8); para la proteína presente en ambas condiciones que presenta un peso aproximado de 50 kDa se obtuvo que no hay cambio aparente en su metilación al realizar el análisis estadístico el cual nos dice que no existe una diferencia significativa entre ambos grupos ($p=0.3265$); sin embargo al normalizar con el doblete de proteínas de un peso aproximado de entre 150/200 kDa presentes en el grupo basal y que no se visualizan en el grupo de eritrofagocitosis, obtenemos que existe una diferencia significativa tal como se muestra en la figura 8B ($p=0.0034$). Finalmente se realizó el mismo procedimiento para las proteínas presentes en el grupo de eritrofagocitosis con un peso aproximado de 40 kDa, posterior al análisis

obtuvimos que si existe una diferencia significativa en comparación con el grupo basal ($p=0.0237$).

Estos resultados corroboran que hay una disminución en la metilación de ciertas proteínas cuando se está llevando a cabo el proceso de eritrofagocitosis, en general aquéllas que presentan un alto peso molecular, pues es en donde se observa la mayor diferencia entre ambos grupos; sin embargo también hay proteínas necesarias para el proceso de eritrofagocitosis y que necesitan ser metiladas para probablemente llevar a cabo su función y cómo podemos ver estas presentan un bajo peso molecular (40 kDa).

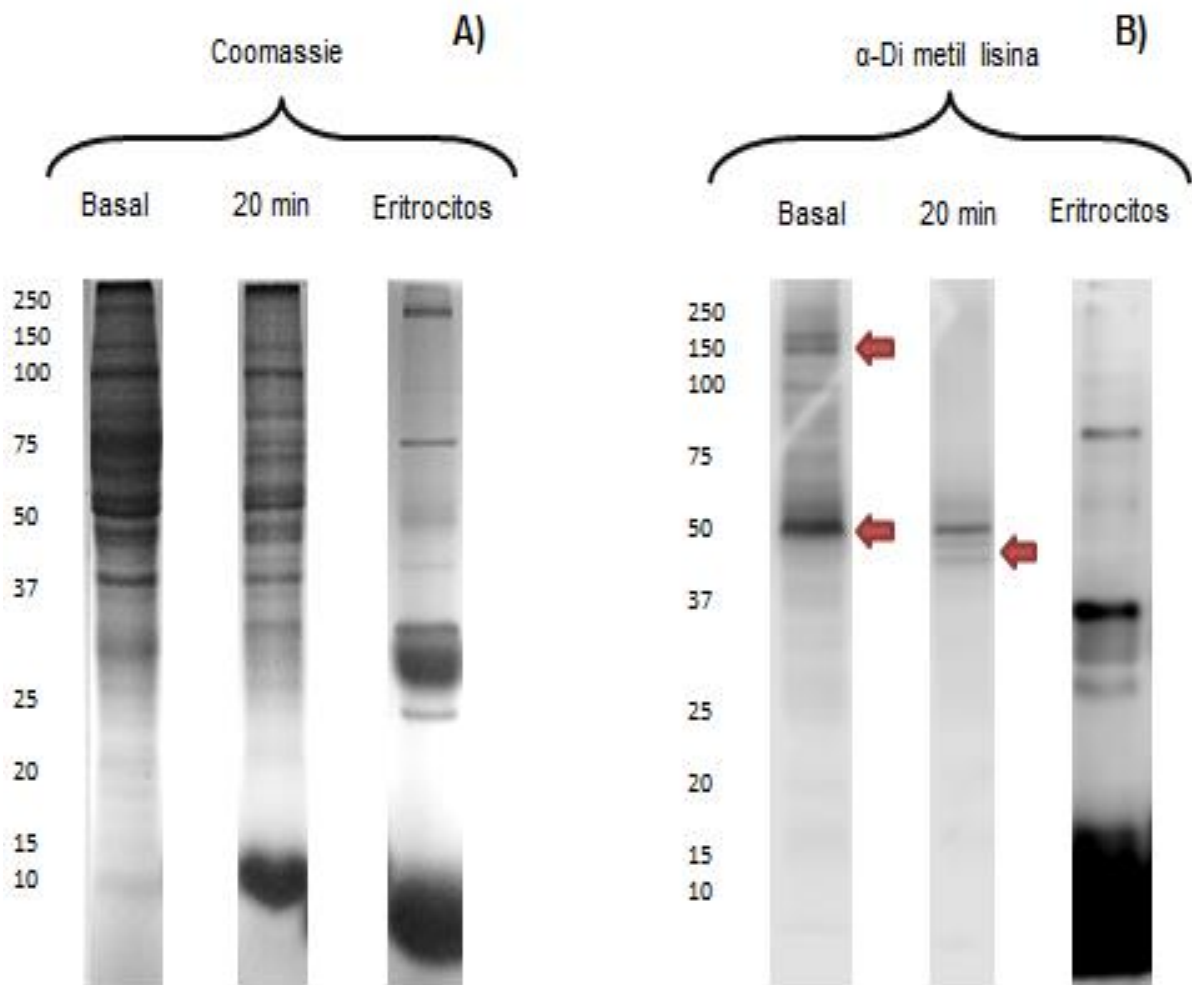


Figura 7. Perfiles de dimetilación en extractos de *E. histolytica*. Se colocaron 50 µg de proteína para cada carril. **A)** Extractos de ambos grupos de trabajo teñidos con la técnica de azul de Coomassie así como también un carril de eritrocitos. **B)** Perfiles de dimetilación de los tres grupos en donde hay una disminución de dicha marca posterior a los 20 min de haber llevado a cabo la eritrofagocitosis. Cuántas repeticiones se realizaron de este experimento?

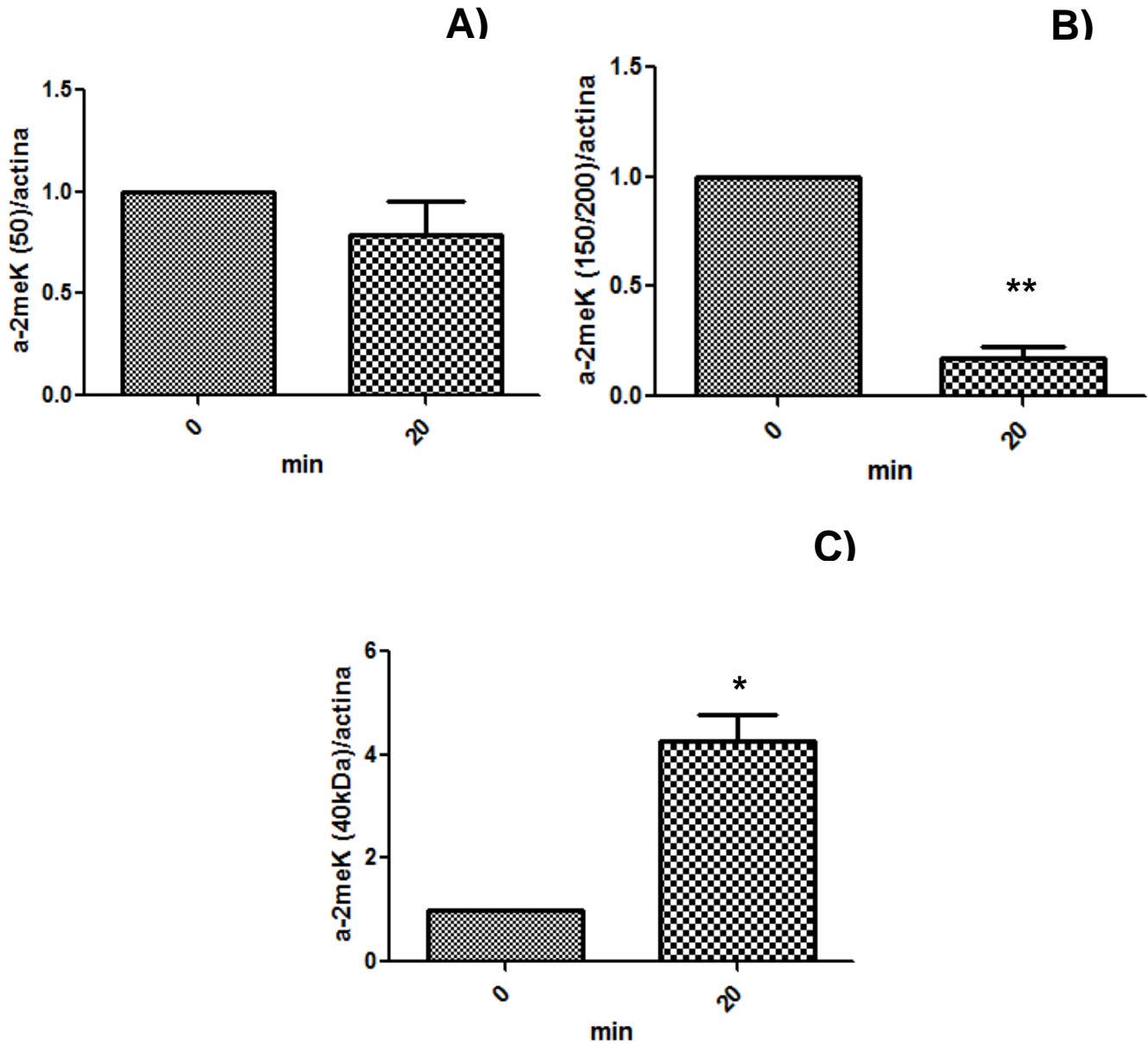


Figura 8. Análisis densitométrico de proteínas metiladas presentes en extractos de *E. histolytica*. Se eligieron 3 de las bandas más representativas y visibles de los extractos presentados anteriormente; actina se utilizó para la normalización. A) Se muestran los cambios en la proteína de 50 kDa presente en el grupo basal. B) Se muestran los cambios en el doblete proteico de 150/200 kDa presente en el grupo basal. * $p < 0.05$ ** $p < 0.01$ T de Student, prueba no pareada, p (0.0034). C) Se muestran los cambios en las proteínas de aproximadamente 40 kDa presentes en el grupo de

6.2. Localización subcelular de proteínas con dimetil lisinas en trofozoítos durante la eritrofagocitosis.

Para poner en evidencia la localización de las proteínas amibianas metiladas en lisina, se realizó un ensayo de inmunofluorescencia utilizando el anticuerpo contra dimetil lisina. En la figura 9 podemos observar que en los trofozoítos en condición basal la marca de dimetilación se detectó levemente en el núcleo y en pequeños puntos distribuidos por el citoplasma, viéndose predominantemente en la periferia del trofozoíto. Por otra parte, en concordancia con los resultados obtenidos en los ensayos de Western blot, en los trofozoítos que estuvieron en contacto con eritrocitos durante 20 min se observó que la marca de dimetilación disminuyó en comparación con el grupo basal, además de que la marca se detectó levemente alrededor de algunos de los eritrocitos ingeridos (Figura 9).

Para corroborar la disminución en el reconocimiento de la dimetilación de lisinas en los ensayos de inmunolocalización, a partir de las imágenes obtenidas se realizó un análisis de intensidad de fluorescencia en el programa ZEN 2012, el cual nos permitió comparar la marca de la dimetilación en ambos grupos de trabajo. Los resultados demostraron que el grupo incubado con eritrocitos durante 20 min presentó un menor reconocimiento por el anticuerpo, sugiriendo una menor cantidad de proteínas dimetiladas en comparación con nuestro grupo basal (Figura 9).

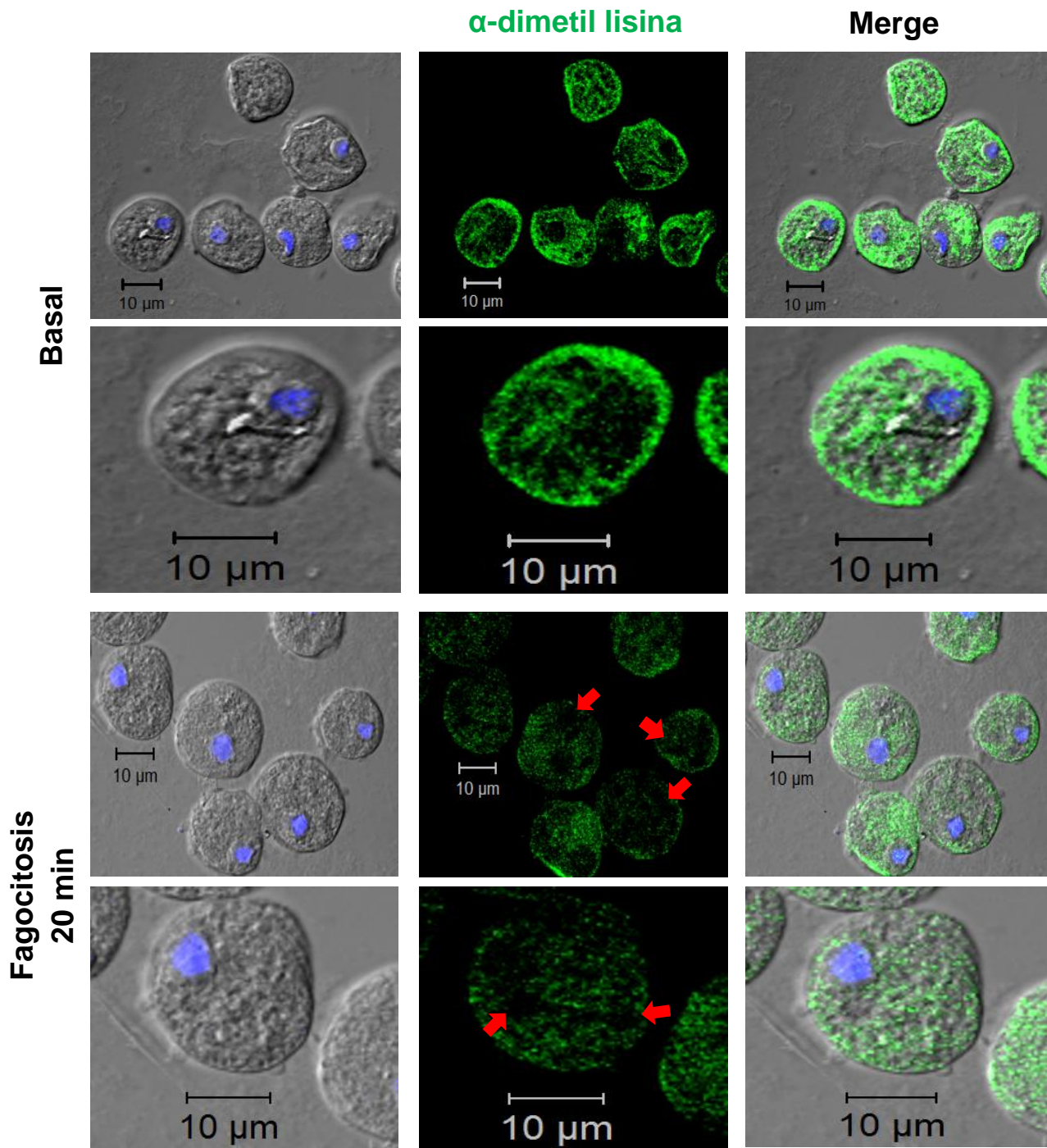


Figura 9. Localización de proteínas dimetiladas durante el proceso de eritrofagocitosis. Los trofozoitos sin fagocitar y después de 20 min de fagocitosis se incubaron con el anticuerpo α -dimetil lisina, para determinar la localización de las proteínas que son metiladas. Las flechas indican algunas señales positivas alrededor de eritrocitos ingeridos.

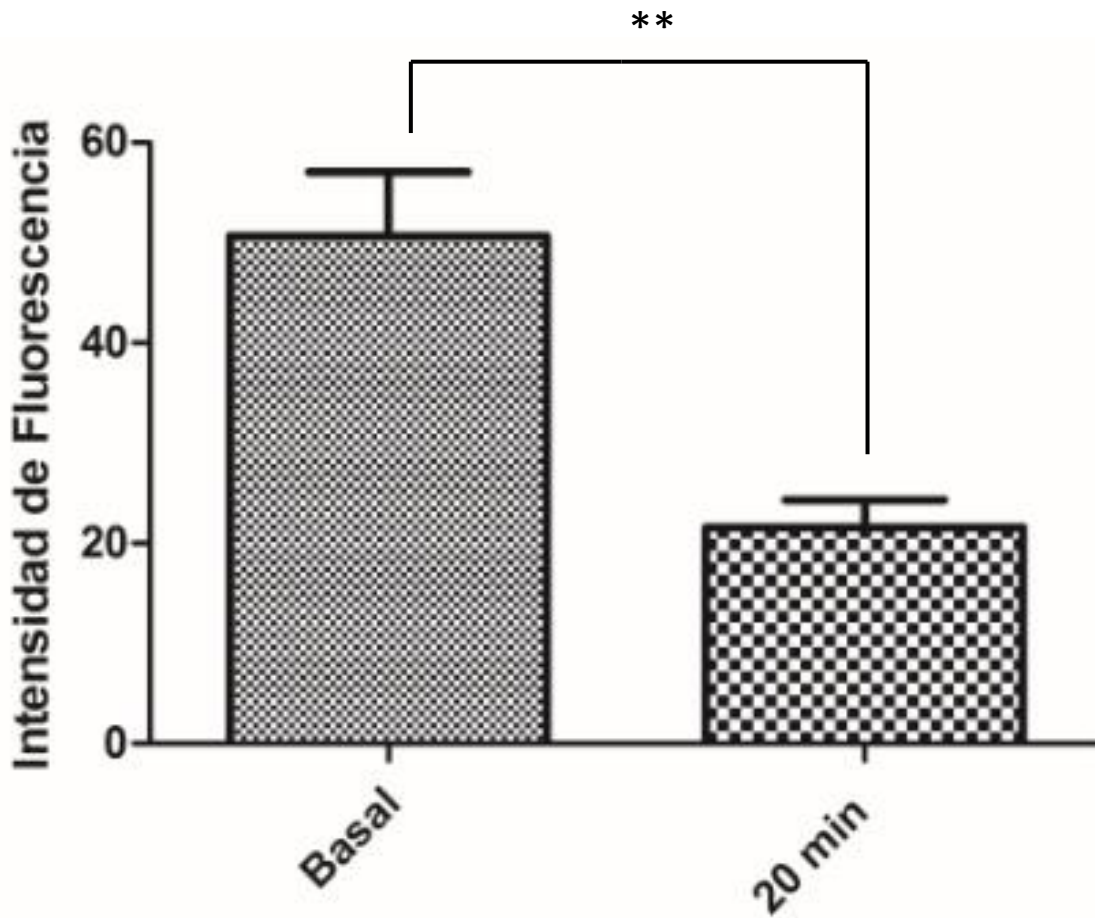


Figura 10. Análisis cuantitativo de la intensidad de dimetilación. Mediante el uso del programa Graph pad prism 5 se graficaron las medidas de intensidad de fluorescencia de 5 células en un campo y mediante un análisis estadístico pareado se observó que hay una diferencia significativa (**) en comparación con el grupo basal. (P= 0.0044)

6.3. Interactoma de las metil transferasas de lisina homólogas en humano.

Una vez que se detectaron cambios aparentes en la metilación de lisinas en las proteínas de los trofozoítos durante la fagocitosis, se decidió identificar las posibles proteínas amebianas que sufren esta modificación. Las enzimas metil transferasas de lisina de *E. histolytica* que se lograron identificar en nuestro grupo de trabajo no presentan un interactoma conocido debido a su reciente descubrimiento, por lo que se realizó un interactoma con las metil transferasas homólogas en humano mediante el uso del servidor STRING para observar si algunas de las proteínas que interaccionan con las HKMT's de humano pudieran estar presentes en la ameba. En la figura 10 podemos ver los interactomas de las tres metil transferasas de humano (SMYD3, SUV40H2, y PRMD1), las cuales presentan interacción con una gran variedad de proteínas citoplasmáticas y nucleares.

A partir de los datos obtenidos se tomaron las secuencias de aminoácidos de cada una de las proteínas en los interactomas y se buscaron las proteínas homólogas en *E. histolytica* mediante un análisis de BLAST en el servidor de NCBI. En la tabla 2 se encuentran enlistadas las proteínas de ameba homólogas a las de humano que interactúan con SMYD3, SUV420H2 y PRDM1. Entre esas proteínas encontramos a las histonas H3 y H4. Además, se detectó a un posible intercambiador de nucleótidos, una proteína con dominio WD-40, el cual es un dominio de andamiaje para formar complejos de multi-proteínas que participan en diferentes funciones celulares, como regulación de la transcripción, transducción de señales, apoptosis y autofagia, además se ha visto de que algunos miembros con este dominio son capaces de regular la actividad enzimática de algunas metil transferasas (Chao X. & Jinrong M., 2011; Shinskye A., & Cosgrove S., 2015).

También se identificó como posible blanco de metilación a una proteína que presenta un cromodominio, el cual se encuentra frecuentemente en proteínas relacionadas con el reordenamiento de la cromatina, además de participar en la represión de genes en conjunto con la metilación de residuos de lisina en histonas (Min J., Zhang Y. & Xu R. 2003).

Interesantemente, entre esas posibles blancos de las EhHKMT's se identificó una actinina (tabla 2) la cual es una proteína de unión a actina y a varias moléculas asociadas al citoesqueleto y vías de señalización, por lo que su función principal es la restructuración del citoesqueleto (Sjoblom B., Salmazo A. & Dijinovic-Carugo K. 2008).

Otro de los blancos es el coatomer la cual es una de las proteínas que sirve de cubierta para ciertas vacuolas de transporte que se ha visto se une a complejos dimetilados en el citoplasma además de que ayuda a la degradación de proteínas metiladas (www.uniprot.org).

Estos resultados sugieren que la metilación de lisinas está involucrada en la regulación de la transcripción mediante el control de la estructura de la cromatina, y posiblemente en otros procesos, como transducción de señales y procesos relacionados con la estructuración del citoesqueleto, incluyendo la fagocitosis.

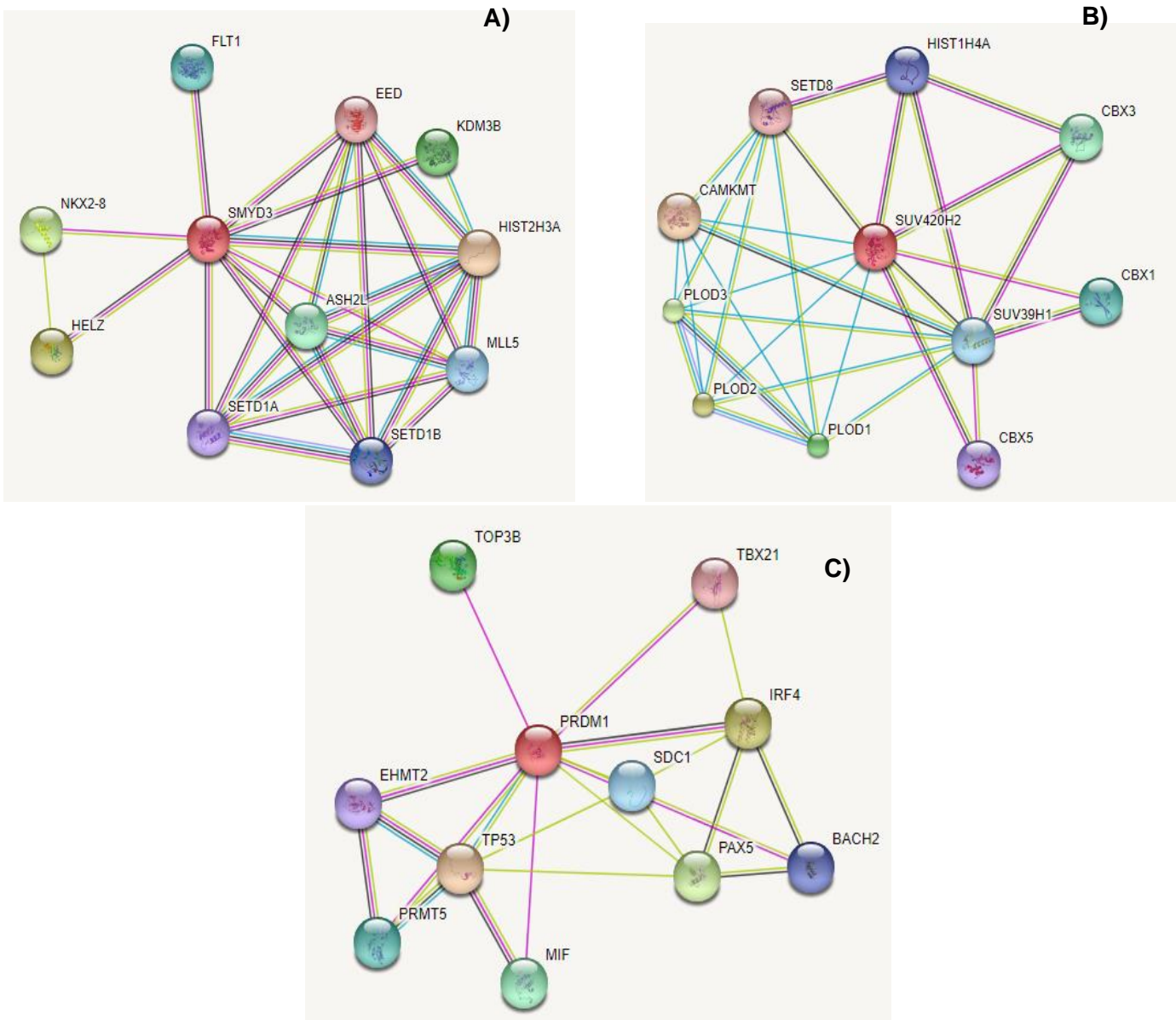


Figura 11. Interactoma de las HKMT de humano homólogos a EhKMT2 y EhHKMT4. A) proteínas que interactúan con la enzima SMYD3 presente en humanos. B) proteínas que interactúan con la enzima SUV40H2 presente en humanos. C) proteínas que interactúan con la enzima PRDM1 presente en humanos.

Tabla 2. Proteínas de *E. histolytica* homólogas a las de humano que interactúan con SMYD3, SUV420H2 y PRDM1

SMYD3		
Proteína en humano	Proteína en <i>E. histolytica</i>	Numero de acceso
EED	Proteína con dominio WD	<u>XP_001913447.1</u>
KDM3B	Proteína hipotética	<u>XP_654085.2</u>
HIST2H3A	Histona 3	<u>XP_651659.1</u>
ASH2L	Proteína hipotética	<u>XP_650388.1</u>
SETD1B	Actinina - like	<u>XP_648365.1</u>
SETD1A	Proteína hipotética	<u>XP_649359.1</u>
SUV42H20		
HIST1H4A	Histona 4	<u>XP_655649.1</u>
SUV39H1	Proteína con chromo dominio	<u>EMH75139.1</u>
CAMKMT	Factor intercambiador de nucleótidos	<u>XP_656781.1</u>
PRDM1		
BACH2	Coatomer gamma subunit	<u>XP_654004.1</u>
P53	Steroid-5-alpha-reductasa	<u>XP_653147.1</u>
PRMT5	Metil transferasa de lisina skb1	<u>XP_649709.1</u>
EHMT2	Proteína Ras GTPasa	<u>XP_653637.1</u>

7. Discusión

Las modificaciones postraduccionales (PTM) tienen una gran importancia en diferentes procesos celulares, incluyendo la regulación epigenética, donde permiten o reprimen la expresión de diferentes genes. Entre las diferentes PTM existentes, se ha visto que la metilación de proteínas ocupa una de las modificaciones más comunes, acompañada de la acetilación y la fosforilación (Kaur I., *et al.*, 2016; Khoury A., *et al.*, 2011).

La metilación ocurre principalmente en los residuos de arginina y de lisina, en donde el proceso está bien estudiado. La metilación de la lisina ocurre en el grupo ϵ - amino de dicho residuo y puede ser metilado de tres maneras distintas: monometilación, dimetilación y trimetilación (Hart-Smith G., *et al.*, 2014).

Las histonas son algunas de las proteínas en donde se ha visto que la metilación de lisinas tiene una gran importancia, jugando un papel esencial en el control transcripcional de los genes al regular la estructura de la cromatina (Lee Y., *et al.*, 2005; Ding Y., *et al.*, 2007).

La metilación de lisinas es llevada a cabo por un grupo de enzimas denominadas metil transferasas de lisinas, las cuales presentan en su estructura un dominio denominado SET que le confiere la función de transferir un grupo metilo a las lisinas; estas enzimas se han encontrado en una gran variedad de organismos, entre ellos parásitos protozoarios como *Toxoplasma gondii* y *Plasmodium sp.* (Dillon C., *et al.*, 2005; Heaslip A., *et al.*, 2011; Liwang Cui, *et al.*, 2008).

Sumado a esto, hay evidencia de que existen dos clases de metil transferasas de lisina que no tienen dominio SET, las cuales se denominan DOT1 y METTL-21D (Hart-Smith G., *et al.*, 2014).

Previamente se identificaron cuatro HKMT (EhHKMT 1, 2, 3 Y 4) en el genoma de la amiba, las cuales presentan homología con algunas familias de metil transferasas presentes en humano (Borbolla-Vázquez J., *et al.*, 2016). Además de esto, a partir de las EhHKMT recombinantes se verificó su actividad enzimática en histonas comerciales, demostrando que son capaces de metilar residuos de lisina específicos e importantes para la regulación epigenética (Borbolla-Vázquez J., *et al.*, 2016). Sumado a lo anterior, se descubrió que dos de las cuatro enzimas caracterizadas se localizan alrededor de las vacuolas fagocíticas durante el proceso de eritrofagocitosis (Borbolla-Vázquez J., *et al.*, 2016), el cual es uno de los mecanismos de virulencia más importantes en la amiba; esto permitió pensar en la posibilidad de que las EhHKMT estén interactuando de alguna manera con proteínas propias de dicho mecanismo.

Se ha demostrado que las HKMT's no solo son capaces de metilar histonas, sino que se han descubierto una variedad de proteínas no histonas con metilación en lisina, las cuales están involucradas en una variedad de procesos biológicos como: reparación de DNA, procesamiento transcripcional del RNA, localización celular y vías de señalización entre otros (Bremang M., *et al.*, 2013).

Debido a lo anterior, en este trabajo nos propusimos detectar las proteínas de *E. histolytica* metiladas en lisina en condiciones basales y después de 20 min de fagocitosis, ya que como se mencionó anteriormente en este tiempo las enzimas EhHKMT2 y EhHKMT4 se detectaron alrededor de los fagosomas (Borbolla-Vázquez J., *et al.*, 2016), sugiriendo un papel importante de la metilación de lisinas en el proceso de fagocitosis. Para ello, inicialmente realizamos ensayos de Western blot los cuales demostraron una disminución en la señal de dimetilación, lo cual se relaciona con los datos obtenidos en las imágenes de inmunofluorescencia. Sin embargo, también pudimos apreciar la aparición de dos bandas que no se detectaron en las condiciones basales, sugiriendo que la metilación de lisinas en estas proteínas sea necesaria para que éstas participen en la fagocitosis, probablemente en la estructuración del citoesqueleto.

Sin embargo, aun queda por determinar la identidad de estas proteínas y corroborar que la metilación de lisinas es importante para su participación en la fagocitosis.

La disminución en general de la metilación de lisinas durante la fagocitosis podría deberse a que es necesaria la eliminación de los grupos metilo de diversas proteínas para que éstas tengan un papel funcional durante la fagocitosis. En eucariotes se ha visto la presencia de ciertas enzimas que ayudan a regular la metilación de las colas de las histonas, éstas son llamadas desmetilasas, las cuales remueven grupos metilo de las proteínas modificadas (Hart-Smith G., *et al.*, 2014; Chen Z., *et al.*, 2006). Sin embargo, las desmetilasas no han sido descritas aun en *E. histolytica*.

Alternativamente, se sabe que la metilación de lisinas se realiza mediante un mecanismo de metilación distributivo, lo cual se refiere a que cuando una metiltransferasa metila un residuo de lisina, ésta se separa de su sustrato y por lo tanto esa lisina es propensa a volverse a metilar, ya sea por la misma enzima o por otra (Hart-Smith G., *et al.*, 2014; Hamamoto R., *et al.*, 2015), por lo que los residuos de lisina pueden ser mono, di o trimetilados. Así, la disminución de la señal de dimetilación durante la fagocitosis puede deberse a la activación de esas proteínas por la trimetilación de lisinas, la cual pudiera no ser reconocida por el anticuerpo utilizado, por lo que sería importante utilizar anticuerpos que detecten este tipo de modificación.

Finalmente, en este trabajo se buscó proponer algunas de las proteínas blanco que podrían ser modificadas por las EhKMTs. Para ello, debido a que no hay información acerca del interactoma de las EhHKMT's identificadas en nuestro grupo de trabajo se pretendió primero realizar el interactoma *in silico* de las secuencias de las enzimas homólogas en humano, donde pudimos ver que cada una de ellas interactúa con una variedad de proteínas, tanto nucleares como citoplásmicas. A partir de estos datos se buscaron secuencias proteicas similares en *E. histolytica*, de las cuales muchas son proteínas hipotéticas que presentan uno a varios dominios similares a los que se presentan en las de humano. Sin

embargo, también pudimos detectar proteínas que pudieran estar participando en la remodelación de la cromatina, en procesos de señalización y en la estructuración del citoesqueleto, tal como se explicó anteriormente; sin embargo es necesario identificar si las proteínas que están diferencialmente metiladas en los perfiles de la amiba tienen alguna similitud con las encontradas *in silico* para asegurar lo anterior.

8. Conclusiones

- *E. histolytica* presenta una gran cantidad de proteínas metiladas en condiciones basales, lo que sugiere la participación de las HKMT's en diversos procesos celulares, como regulación de la cromatina y del citoesqueleto, entre otros.
- Durante el proceso de eritrofagocitosis la metilación en lisinas disminuye, lo que sugiere un probable mecanismo de regulación de esta modificación durante este proceso.
- Durante la eritrofagocitosis se aprecia la dimetilación de dos proteínas que pueden estar participando en dicho mecanismo.

9. Perspectivas

- Identificar mediante espectrometría de masas las proteínas metiladas.
- Probar la actividad enzimática de las EhHKMT's recombinantes sobre las histonas amibianas.

10 Referencias bibliográficas

- Babuta, M., Mansuri, S., Bhattacharya, S., & Bhattacharya., A. (2015). The *Entamoeba histolytica* Arp2/3 complex is recruited to phagocytic cups through an atypical kinase EhAK1. *Plos pathogens*, 11, 1-27.
- Bannister AJ., Z. P. (2001). Selective recognition of methylated lysine 9 on histone H3 by the HP1 chromo domain. *Nature*, 410(6824), 120-124.
- Bardees M. Foda, U. S. (2015). Dimethylated H3K27 Is a Repressive Epigenetic Histone Mark in the Protist *Entamoeba histolytica* and Is Significantly Enriched in Genes Silenced via the RNAi Pathway. *J Biol Chem*, 290, 21114-21130.
- Becerril, M. A. (2012). *Parasitología médica*. Ciudad de México: Mc Graw Hill.
- Bettina Tschiersch, A. H. (1994). The protein encoded by the *Drosophila* position-effect variegation suppressor gene Su(var)3-9 combines domains of antagonistic regulators of homeotic gene complexes. *The EMBO Journal*, 13, 3822–3831.
- Black JC., R. C. (2012). Histone lysine methylation dynamics: establishment, regulation, and biological impact. *Molecular Cell*, 48(4), 491-507.
- Borbolla-Vázquez Jessica, O. E.-G.-H.-R. (2016). Identification and functional characterization of lysine methyltransferases of *Entamoeba histolytica*. *Molecular microbiology*, 101, 351-366.
- Bradford M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 7(72), 248-254.

- Bremang M., C. A. (2013). Mass spectrometry-based identification and characterisation of lysine and arginine methylation in the human proteome. *Molecular BioSystems*, 9, 2231-2247.
- Brendan Loftus, I. A. (2005). The genome of the protist parasite *Entamoeba histolytica*. *Nature*, 433, 865-868.
- Brian C. Smith, J. M. (2009). Chemical mechanisms of histone lysine and arginine modifications. *Biochimica et Biophysica acta*, 1789, 45-57.
- Campos Peralta J., S. M. (2011). *Entamoeba histolytica* y su relacion huésped-parásito. *Enfermedades infecciosas y microbiología*, 31, 63-70.
- Cao R., Z. Y. (2004). The functions of E(Z)/EZH2-mediated methylation of lysine 27 in histone H3. *ELSEVIER*, 4, 155-164.
- Chao X., J. M. (2011). Structure and function of WD40 domain protein. *Protein Cell*, 2(3), 202-214.
- Chen Z., Z. J. (2006). Structural insights into histone demethylation by JMJD2 family members. *Cell*, 125(4), 691-702.
- Chuikov Sergei, K. K. (2004). Regulation of p53 activity through lysine methylation. *Nature*, 353-360.
- Dillon C., Z. X. (2005). The SET-domain protein superfamily: protein lysine methyltransferases. *BioMed Central*, 6(8).
- Ding Y., W. X. (2007). SDG714, a Histone H3K9 Methyltransferase, Is Involved in Tos17 DNA Methylation and Transposition in Rice. *The Plant Cell*, 19, 9-22.
- Felix Recillas-Targa, M. E. (2004). Participación de la estructura de la cromatina en la regulación de la expresión génica. *Mensaje bioquímico*, 28, 173-201.
- Fingerman M., H.-N. D. (2008). *In Vitro* Histone Methyltransferase Assay. *SCH Protocols*.

- González Vázquez M., C. L. (2012). De amibas y amebiasis. *Elementos*, 19, 13-18.
- Hamamoto Ryuji, S. V. (2015). Critical roles of non-histone protein lysine methylation in human tumorigenesis. *Nature*, 15, 110-124.
- Hanadate, Y., Saito-Nakano, Y., Nakada-Tsukui, K., & Nozaki, T. (2016). Endoplasmic reticulum-resident Rab8A GTPase is involved in phagocytosis in the protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. *Cellular Microbiology*, 10, 1462-5822.
- Hart-Smith G., C. Z. (2014). Stoichiometry of *Saccharomyces cerevisiae* Lysine Methylation: Insights into Non-histone Protein Lysine Methyltransferase Activity. *Journal of proteome*, 13, 1744-1756.
- Heaslip Aoife, N. M. (2011). The Motility of a human parasite, *Toxoplasma gondii*, is regulated by a novel lysine methyltransferase. *PLOS pathogens*, 7, 1-21.
- Ibne Karim M. Ali, R. H. (2012). Proteomic Analysis of the Cyst Stage of *Entamoeba histolytica*. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 6, e1643.
- Karim Ibne M., C. G. (2008). Molecular epidemiology of amebiasis. *Infection, Genetics and Evolution*, 8, 698-707.
- Kaur I., Z. M. (2016). Widespread occurrence of lysine methylation in *Plasmodium falciparum* proteins at asexual blood stages. *Scientific Reports*.
- Khoury A., B. C. (2011). Proteome-wide post-translational modifications statistics: frequency analysis and curation of the swiss-prot database. *Scientific Reports*, 1(90).
- Klein RR, H. R. (1995). Cloning and developmental expression of pea ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit N-methyltransferase. *Plant Mol Biol.*, 27, 249-261.

- Kurash K., L. H. (2008). Methylation of p53 by Set7/9 mediates p53 acetylation and activity *in vivo*. *Molecular Cell*, 29, 392-400.
- Lanouette S., M. V. (2014). The functional diversity of protein lysine methylation. *Molecular Systems Biology*, 10(724), 1-26.
- Lee Y., T. C. (2005). Role of Protein Methylation in Regulation of Transcription. *Endocrine Review*, 26(2), 147-170.
- Levy E., S. S.-M. (2017). The Epigenetic Machinery in Vascular Dysfunction and Hypertension. *Curr Hypertens Rep*, 19(52).
- Liwang Cui, Q. F. (2008). Histone lysine methyltransferases and demethylases in *Plasmodium falciparum*. *Int Journal of parasitology*, 38, 1083-1097.
- Lopez-Rubio J., G. m.-R. (2007). 5' flanking region of var genes nucleate histone modification patterns linked to phenotypic inheritance of virulence traits in malaria parasites. *Molecular Microbiology*, 66, 1296–1305.
- Maria Calorina-Dalmasso, W. J.-S.-A. (2011). Canonical and variant histones of protozoan parasites. *Frontiers in bioscience*, 16, 2086-2105.
- Marie Chelsea, P. W. (2014). Regulation of virulence of *Entamoeba histolytica* . *Microbiology*, 68, 493-520.
- Mario Hernández-Alejandro, M. C.-G.-R.-C.-À. (2013). The small GTPase EhRabB of *Entamoeba histolytica* is differentially expressed during phagocytosis. *Parasiyology Research*, 112, 1631-1640.
- Marion, S., Laurent, C., & Guillèn, N. (2005). Signalization and cytoskeleton activity through myosin IB during the early steps of phagocytosis in *Entamoeba histolytica*: a proteomic approach. *Cellular microbiology*, 7, 1504-1518.
- Meza I., C. F.-E.-R. (1987). Use of Antibodies to Characterize a 220-Kilodalton Surface Protein from *Entamoeba histolytica*. *The Journal of Infectious Diseases*, 156, 798-805.

- Min J., Z. Y. (2003). Structural basis for specific binding of Polycomb chromodomain to histone H3 methylated at Lys 27. *Genes & development*, 17(15), 1823-1828.
- Mohamed Abu-Farha, S. L. (2011). Proteomic analyses of the SMYD family interactomes identify HSP90 as a novel target for SMYD2. *Journal of Molecular Cell Biology*, 3, 301-308.
- Okada M., H. C. (2004). Proteomic analysis of phagocytosis in the enteric protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. *Eukaryot Cell*, 4, 827-831.
- Okada M., H. C. (2006). Kinetics and strain variations of phagosome proteins of *Entamoeba histolytica* by proteomic analysis. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 145, 171-183.
- Okada M., N. T. (2005). New Insights into Molecular Mechanisms of Phagocytosis in *Entamoeba histolytica* by Proteomic Analysis. *Journal of Parasitology*, 37, 244-252.
- Orozco Esther, G. G.-P. (1983). *Entamoeba histolytica*: Phagocytosis as a virulence factor. *J Exp Med*, 158, 1511-1521.
- Pang Chi I., G. E. (2010). Identification of arginine- and lysine-methylation in the proteome of *Saccharomyces cerevisiae* and its functional implications. *BioMed Central*, 11(92).
- Reyes L., L. R. (2002). Diferenciación de *Entamoeba histolytica* / *Entamoeba dispar* y los nuevos hallazgos en la patogénesis de la amibiasis intestinal. *Revista Costarricense de Ciencias Médicas*, 23, 161- 173.
- Samuel L. Stanley, A. B.-J. (1990). Cloning and expression of a membrane antigen of *Entamoeba histolytica* possessing multiple tandem repeats. *Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America*, 87, 4976–4980.

- Schubert L., B. M. (2003). Many paths to methyltransfer: a chronicle of convergence. *Trends in biochemical science*, 28(6), 329-335.
- Shinskye A., C. S. (2015). Unique Role of the WD-40 Repeat Protein 5 (WDR5) Subunit within the Mixed Lineage Leukemia 3 (MLL3) Histone Methyltransferase Complex. *The journal of biological chemistry*, 290(43), 25819-25833.
- Sihui Li, P. Y. (2013). Arginine Methylation Modulates Autophagic Degradation of PGL Granules in *C. elegans*. *Molecular Cell*, 52, 421-433.
- Sjoblom B., S. A.-C. (2008). α -Actinin structure and regulation. *Cellular and Molecular Life Science*, 65(17), 2688-2701.
- Sriharsa Pradhan, H. G.-O. (2009). SET7/9 mediated methylation of non-histone proteins in mammalian cells. *Epigenetics*, 4, 383-387.
- William A. Petri, R. D. (1987). Isolation of the galactose-binding lectin that mediates the *in vitro* adherence of *Entamoeba histolytica*. *The Journal of Clinical Investigation*, 80, 1238-1244.
- Yi Zhang, D. R. (2001). Transcription regulation by histone methylation: interplay between different covalent modifications of the core histone tails. *Genes & Development*, 15, 2343-2360.
- Zhang Z., T. M. (2012). Identification of lysine succinylation as a new post-translational modification. *Nature Chemical Biology*, 7(1), 58-63.