



CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS  
AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE INFECTOMICA Y PATOGENESIS MOLECULAR

**“Caracterización de las proteínas metil-transferasas de arginina  
PRMT5 y PRMT-A de *Entamoeba histolytica*”**

T E S I S

Que presenta

I.B.T. Christian Medina Gómez

Para obtener el grado de

MAESTRO EN CIENCIAS

Director de la Tesis:

Dr. Mario Alberto Rodríguez Rodríguez

México, Distrito Federal

Julio, 2015

# Índice

I. Lista de tablas.....	v
II. Lista de figuras.....	v
III. Abreviaturas.....	vii
IV. Resumen .....	viii
V. Abstract .....	ix
1. Introducción .....	1
1.1 <i>Entamoeba histolytica</i> .....	1
1.2 Mecanismos de patogenicidad .....	6
1.3 Características del genoma de <i>E. histolytica</i> .....	8
1.4 Características de la transcripción y cromatina en eucariotas superiores .....	10
1.5 Regulación epigenética de la cromatina .....	12
1.6 Proteínas metil-transferasas de Arginina (PRMT's).....	15
2. ANTECEDENTES.....	21
2.1 Epigenética en parásitos .....	21
2.2 Regulación transcripcional y epigenética en <i>Entamoeba histolytica</i> ....	23
3. Justificación .....	26
4. Hipótesis .....	27
5. Objetivo.....	27
5.1 Objetivos particulares .....	27
6. Materiales y métodos.....	28
6.1 Cultivo de trofozoítos de <i>E. histolytica</i> .....	28
6.2 Extracción y cuantificación de DNA genómico .....	28
6.3 Electroforesis en geles de agarosa.....	28

6.4	Diseño de iniciadores para las PRMT's.....	29
6.5	Reacción en cadena de la polimerasa.....	29
6.6	Aislamiento del plásmido <i>pGEX-6P-1</i> .....	30
6.7	Digestión de los fragmentos de PCR y del plásmido <i>pGEX-6P-1</i> .....	31
6.8	Purificación del DNA a partir de geles de agarosa.....	31
6.9	Ligación.....	33
6.10	Preparación de bacterias competentes de <i>E. coli DH5α</i> y <i>BL21</i> .....	33
6.11	Transformación de células competentes.....	33
6.12	Inducción de las proteínas EhPRMT's recombinantes.....	34
6.13	Análisis de la solubilidad de las proteínas recombinantes.....	35
6.14	Purificación de las proteínas recombinantes EhPRMT's por perlas de glutatión-sefarosa.....	35
6.15	Obtención de anticuerpos contra EhPRMT5 y EhPRMT-A.....	36
6.16	Extracción de proteínas totales de <i>E. histolytica</i> .....	37
6.17	Electroforesis de proteínas.....	37
6.18	Western blot.....	37
6.19	Ensayo de actividad enzimática de las EhPRMT's.....	38
6.20	Ensayos de inmunofluorescencia y microscopía confocal.....	39
7.	Resultados.....	40
7.1	ANÁLISIS <i>in silico</i> .....	40
7.1.1	Alineamiento de las histonas de humano y <i>E. histolytica</i> .....	40
7.1.2	Análisis de identidad de EhPRMT5 y EhPRMT-A.....	40
7.1.3	Análisis de la presencia de sitios fosforilación conservados en enzimas de tipo I en las EhPRMT's.....	41
7.2	CLONACIÓN DE LOS GENES <i>Ehprmt5</i> y <i>Ehprmt-A</i> .....	44
7.2.1	Extracción de DNA genómico.....	44

7.2.2 Amplificación de los genes <i>Ehprmt5</i> y <i>Ehprmt-A</i> .....	44
7.2.3 Digestión del vector de expresión <i>pGEX-6P-1</i> y de los amplificados .....	47
7.2.4 Clonación en el vector de expresión <i>pGEX-6P-1</i> .....	47
7.3 INDUCCION Y PURIFICACIÓN DE LAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES .....	50
7.3.1 Inducción de las proteínas recombinantes .....	50
7.3.2 Purificación de las proteínas recombinantes .....	53
7.4 OBTENCIÓN DE ANTICUERPOS CONTRA LAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES .....	57
7.4.1 Obtención de anticuerpos contra EhPRMT-A y EhPRMT5 .....	57
7.5 ACTIVIDAD ENZIMATICA DE LAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES	60
7.5.1 Actividad enzimática de las proteínas EhPRMT5 y EhPRMT-A sobre histonas comerciales .....	60
7.6 INMUNOLocalización DE EhPRMT5 Y EhPRMT-A .....	63
8. Discusión .....	68
9. Perspectivas .....	76
10. Bibliografía .....	77

## I. Lista de tablas

**Tabla 1.** Porcentaje de homología de EhPRMT-A con las PRMT's de humano.

**Tabla 2.** Esquema de inmunización utilizado para la obtención de anticuerpos en contra de las proteínas EhPRMT5 y EhPRMT-A.

## II. Lista de figuras

**Figura 1.** Ciclo de vida y estadios del parásito *Entamoeba histolytica*

**Figura 2.** Mecanismo de invasión a la mucosa epitelial y lesiones provocadas por los trofozoítos de *E. histolytica*

**Figura 3.** Esquema de la formación del complejo de inicio de la transcripción en células eucariotas

**Figura 4.** Conversión de la cromatina a heterocromatina y eucromatina por modificaciones al DNA o a proteínas histonas

**Figura 5.** Tipos de metilación de los residuos de arginina y tipos de proteínas metil-transferasas de arginina (PRMT's)

**Figura 6.** Estructura general de las proteínas metil-transferasas de arginina

**Figura 7.** Vector pGEX-6P-1

**Figura 8.** Alineamiento de las histonas de amiba y humano

**Figura 9.** Búsqueda de residuos conservados de enzimas de tipo I en PRMT's de *Entamoeba histolytica*

**Figura 10.** Aislamiento de DNA genómico de *E. histolytica*

**Figura 11.** Amplificación de los genes *Ehprmt5* y *Ehprmt-A*

**Figura 12.** Análisis de la digestión del vector y de los amplificados con las enzimas BamH1 y Xho1

**Figura 13.** Clonación de los genes *Ehprmt5* y *Ehprmt-A*

**Figura 14.** Inducción de la proteína recombinante EhPRMT5

**Figura 15.** Inducción de la proteína recombinante EhPRMT-A

**Figura 16.** Western blot de las proteínas recombinantes EhPRMT-A y EhPRMT5

**Figura 17.** Purificación de las proteínas recombinantes

**Figura 18.** Western blot de las proteínas purificadas

**Figura 19.** Reconocimiento de las proteínas recombinantes por los anticuerpos obtenidos

**Figura 20.** Western blot en extractos de *E. histolytica*

**Figura 21.** Actividad de metiltransferasa de histonas de las proteínas recombinantes

**Figura 22.** Western blot con el anticuerpo anti-H3R4me2

**Figura 23.** Inmunolocalización de la proteína EhPRMT5

**Figura 24.** Amplificación de la imagen de la inmunolocalización de la proteína EhPRMT5

**Figura 25.** Inmunolocalización de la proteína EhPRMT-A

**Figura 26.** Amplificación de la imagen de la inmunolocalización de la proteína EhPRMT-A

### III. Abreviaturas

<b>[<sup>3</sup>H]Adomet</b>	S-Adenosil-Metionina acoplada a tritio
<b>Adomet</b>	S-Adenosil-Metionina
<b>ADMA</b>	Dimetil-arginina Asimétrica
<b>CPM</b>	Cuentas por minuto
<b>EhPRMT</b>	Proteína metil-transferasa de arginina de <i>Entamoeba histolytica</i>
<b>GAR</b>	Motivo rico en glicina-arginina
<b>GST</b>	Glutación-S-transferasa
<b>HKMT</b>	Metil-transferasa de lisina de histonas
<b>HMT</b>	Metil-transferasa de histonas
<b>HsPRMT</b>	Proteína metil-transferasa de arginina de <i>Homo sapiens</i>
<b>IPTG</b>	Isopropil-β-D-1-tio-galactopiranosido
<b>MMA</b>	Monometil-arginina
<b>PRMT</b>	Proteína metil-transferasa de arginina
<b>SDMA</b>	Dimetil-arginina Simétrica
<b>SDS-PAGE</b>	Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico

## IV. Resumen

*Entamoeba histolytica* es el parásito causante de la amibiasis en humanos, siendo una de las principales parasitosis en países en vías de desarrollo. El mecanismo por el cual éste organismo causa la enfermedad se divide en tres fases principales: adhesión, citólisis y fagocitosis. Sin embargo, los mecanismos de regulación genética que permiten modular estos y otros procesos en la vida del parásito no son completamente conocidos. En eucariotas superiores, la regulación de la expresión genética se realiza mediante modificaciones en la estructura de la cromatina, directamente al DNA o por modificaciones post-traduccionales, como metilación, en las histonas. Ésta última es realizada por enzimas metil-transferasas y se conocen dos grupos principales: las metilasas de lisina (HKMT's) y las de arginina (PRMT's). Se han identificado 5 genes que codifican para PRMT's putativas en *E. histolytica* y en nuestro grupo se ha caracterizado la actividad de metil-transferasa en una de ellas (EhPRMT1a). Sin embargo, no se conoce si los otros dos genes, *Ehprmt5* y *Ehprmt-A*, codifican para PRMT's funcionales ni su histona blanco. En este trabajo, ambas proteínas fueron obtenidas de manera recombinante y purificadas, con lo que se obtuvieron anticuerpos contra cada una de ellas. Las proteínas recombinantes fueron sometidas a ensayos *in vitro* con histonas comerciales, obteniéndose una actividad similar usando el sustrato [<sup>3</sup>H]AdoMet. Utilizando un anticuerpo específico, se encontró que EhPRMT5 metila a H4 en R8, demostrando su homología a PRMT5 de otros organismos que realizan la misma metilación simétrica. La inmunolocalización de las proteínas utilizando los anticuerpos generados en este trabajo mostró que EhPRMT5 se polariza hacia pseudópodos y posiblemente a los sitios donde ocurre la citocinesis, mientras que EhPRMT-A se encontró distribuida en todo el citoplasma, además de haberse localizado de manera minoritaria en el núcleo de los trofozoítos. Se propone que mediante estímulos de diversa índole, las proteínas puedan relocalizarse como sus homólogos de otros organismos, contribuyendo a diversas funciones en la biología de *E. histolytica*.



## V. Abstract

*Entamoeba histolytica* is the protozoa responsible of human amoebiasis, one of the main parasite-caused diseases in developing countries. The pathogenic mechanism used by this organism is divided in three phases: adhesion, cytolysis and phagocytosis. However, the mechanisms involved in gene expression regulation of proteins participating in these processes are not fully understood. In higher eukaryotes this regulation is performed through modifications in chromatin structure, either on DNA or by post-translational modifications, such as methylation on histone proteins. The latter is catalyzed by a group of enzymes called protein methyltransferases, and two kinds are known: histone lysine methyltransferases (HKMT's) and protein arginine methyltransferases (PRMT's). It has been reported that *E. histolytica* contains 5 genes coding for putative PRMT's, where one of them, EhPRMT1a, has been already characterized by our work group. Still, it is unknown whether the other two genes code for active methyltransferases and their target proteins, including histones. In this study, we obtained both EhPRMT5 and EhPRMT-A by recombinant expression in bacteria: Both proteins were purified to obtain specific antibodies against each one. Then, recombinant proteins were used in *in vitro* assays to determine their enzymatic activity using [<sup>3</sup>H]AdoMet. In these, we found that both proteins have PRMT activity. By the use of a specific antibody, we found that EhPRMT5 is able to methylate H4 in R8, showing its homology with other simetric dimethylation-producing PRMT's. Proteins were localized through immunofluorescence assays using the antibodies generated in this work. In these assays, EhPRMT5 was found to be polarized towards structures that seems to be parasite pseudopodia and in sites of apparent cytokinesis, while EhPRMT-A was localized both in nuclei and cytoplasm, but it was more abundant in cytoplasm. We propose that under unidentified stimuli both proteins could be relocalized throughout the cell, just as PRMT's of other organisms do, participating in several functions of the parasite biology.

# 1. Introducción

## 1.1 *Entamoeba histolytica*

El parásito *Entamoeba histolytica* es un protozoo microaerófilo perteneciente a la familia *Entamoebidae*, del orden *Amoebida*, clase *Lobosea* y al phylum *Sarcomastigophora*. Es una amiba patogénica causante de la amibiasis en humanos, siendo una de las parasitosis más importantes en el mundo, junto con las infecciones causadas por otros protozoarios como el paludismo, la enfermedad de Chagas y la leishmaniasis (Gómez *et al.* 2007). Esta infección se localiza de manera particular en países en vías de desarrollo, donde puede encontrarse de manera endémica en áreas como México, América Central, América del Sur, Asia, África y algunas islas del Pacífico. La transmisión del parásito se da por ingestión de alimentos y agua que contienen quistes amibianos (Ali y Clark, 2008), es decir por vía fecal-oral, siendo el humano el único hospedero conocido del parásito. Los quistes amibianos ingeridos viajan al intestino, donde se diferencian en trofozoítos que invaden la mucosa y causan distintos grados de enfermedad. Aproximadamente de 10-20% de las infecciones resultan en una sintomatología que puede variar desde una colitis autolimitante a una colitis invasiva, hasta infecciones extraintestinales (Haque, 2003).

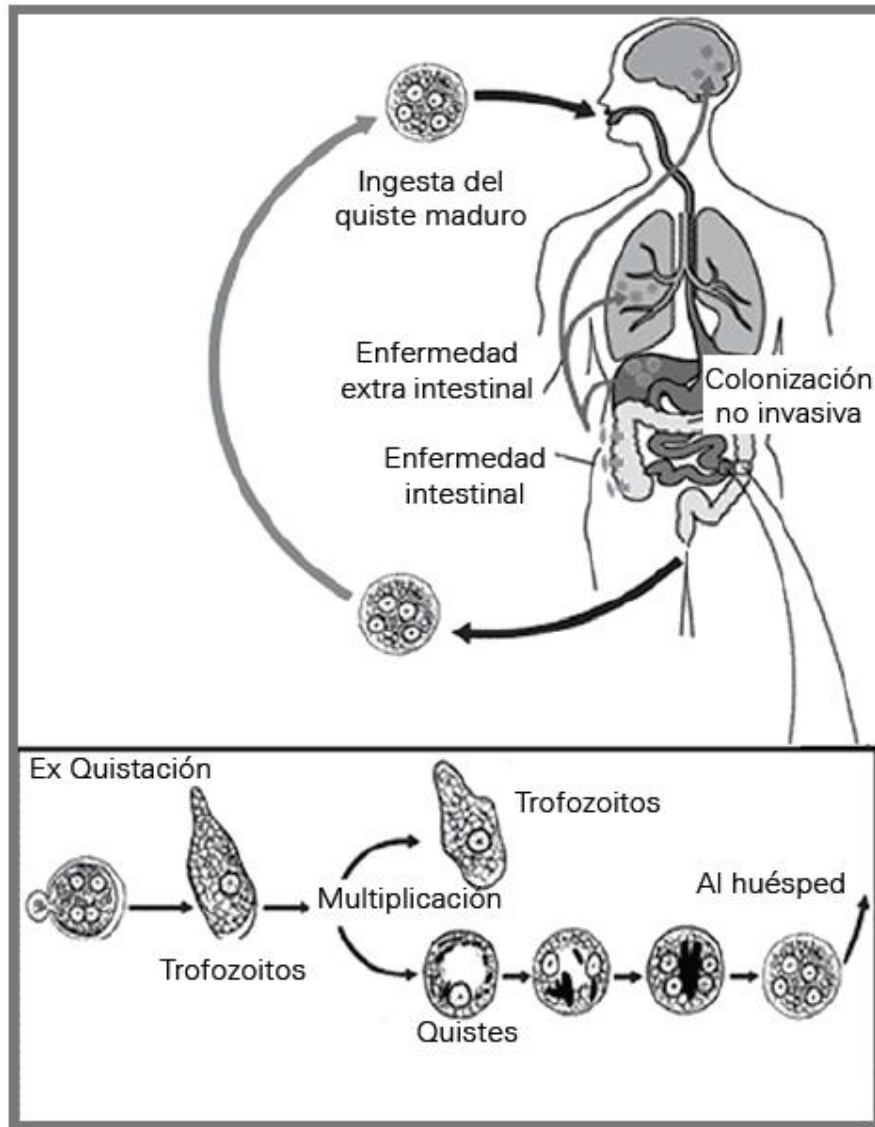
Se calcula que existen aproximadamente de 48 a 50 millones de casos de amibiasis en todo el mundo (12% de la población mundial), siendo el trópico la región con mayor incidencia de amibiasis, donde la mayoría de los casos clínicos presentan síntomas relacionados con la vía intestinal (Tovy *et al.*, 2010). En México, *E. histolytica* es una de las principales causas de enfermedad entérica, sin embargo, la mortalidad ha ido disminuyendo por el acceso a medicamentos anti-amibianos en las últimas décadas, y por la mejora en los servicios públicos como drenaje, agua potable disponible y disminución de espacios insalubres (Fernández *et al.* 2007). No obstante, la población sigue estando en contacto de manera constante con el parásito, como lo revela un estudio seroepidemiológico, donde se reportó que hasta

un 8.41% de la población tiene anticuerpos circulantes contra la amiba (González *et al.* 2012). Se considera también que el 10% de la población en el país está infectada, siendo la población más afectada los individuos menores de 15 años, y con un incremento marcado en niños de 5 a 9 años de edad (Ximénez *et al.*, 2009).

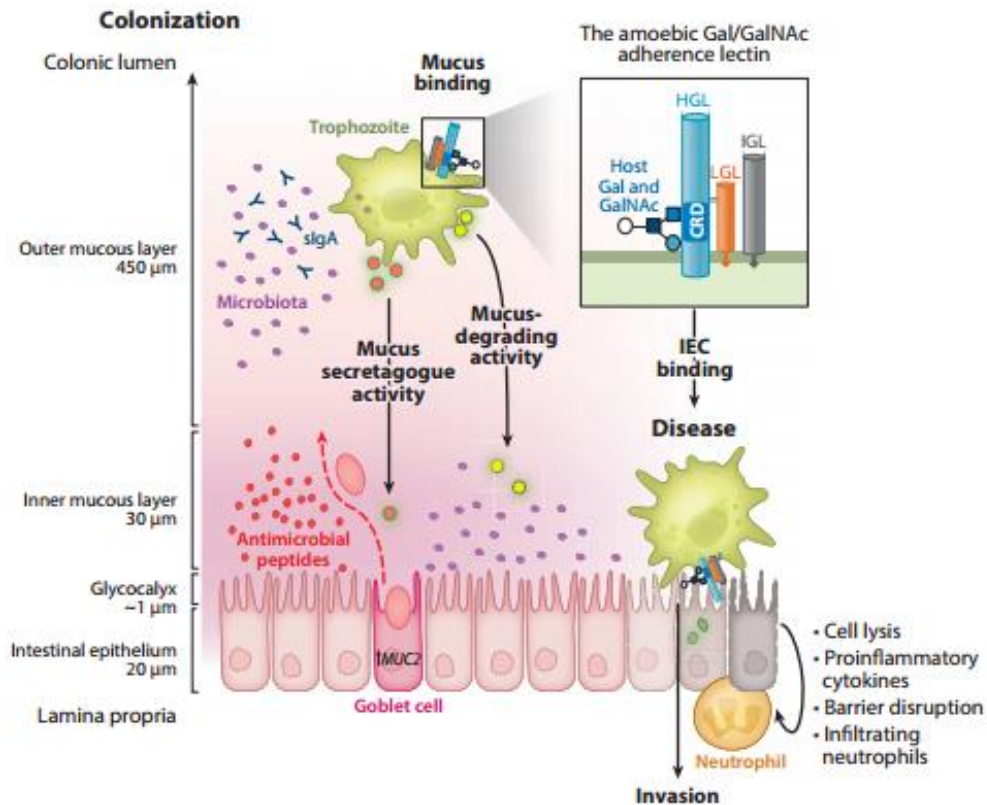
La amibiasis se caracteriza de manera principal por disentería y dolor abdominal, donde puede existir diarrea acuosa con moco abundante (Chacín-Bonilla, 2013). La región del intestino que sufre más afectaciones es el colon ascendente del intestino grueso durante la colitis grave, donde puede haber disentería severa y pueden presentarse cuadros febriles y dolor abdominal (Tanyuksel *et al.*, 2003). La manifestación más frecuente de amibiasis extraintestinal es el absceso hepático por diseminación vía sanguínea a través de la vena porta desde el intestino. En estas lesiones se observa una mayor afección en lóbulo derecho del hígado, donde estudios en modelos animales han revelado que el daño tisular mayoritario es causado por la propia respuesta inflamatoria del hospedero y que puede resultar en la ruptura del absceso hacia otras cavidades, choque séptico y finalmente la muerte (Chacín Bonilla, 2013). El diagnóstico de amibiasis se sugiere por el cuadro clínico y puede confirmarse por la presencia de quistes en heces fecales y de manera histológica por la presencia de las amibas en pared intestinal (Salles, 2003; Fotedar, 2007).

El parásito tiene un ciclo de vida simple que consiste en dos fases de desarrollo, la infectiva o quiste y la invasiva o trofozoíto (González *et al.* 2012) (Fig. 1). La parasitosis se adquiere por ingestión de quistes, los cuales una vez que alcanzan el intestino, se adhieren al lumen y sufren un desenquistamiento para dar lugar a 8 trofozoítos que se alimentan de las bacterias de la flora y se multiplican por fisión binaria (González *et al.*, 2012). Después de muchas rondas de multiplicación y una vez que alcanzan cierta densidad, los trofozoítos pueden agregarse, lo cual se cree puede desencadenar tanto el enquistamiento como la virulencia del parásito, dado que en esta fase de agregación las células liberan proteínas y activadores celulares que podrían fungir como auto-activadores de virulencia (Zaki *et al.*, 2006). Los trofozoítos en esta fase tienen un tamaño entre 20 y 40  $\mu\text{m}$ , y el único organelo

típico identificable es el núcleo (Ximénez *et al.* 2007). Los trofozoítos pueden volverse invasivos y empezar a destruir la barrera epitelial del intestino (Fig. 2), donde matan células del hospedero, inducen la sobreproducción de moco y de inflamación, provocando en última instancia disentería. La ruptura de la barrera epitelial del lumen intestinal provoca la pérdida de agua y sangre que se manifiestan en las heces (diarrea mucoide y sanguinolenta). A partir de este momento los trofozoítos pueden diseminarse hacia otros órganos (Faust, Guillen, *et al* 2012), o sufrir enquistamiento y ser liberados en las heces (Fig. 1). Los quistes tienen la característica de ser redondos u ovals y tienen un tamaño de 10 – 20  $\mu\text{m}$  de diámetro, son inmóviles y presentan una pared rígida de quitina que ayuda al quiste a sobrevivir fuera del huésped (González *et al.* 2012; Campos-Peralta *et al.*, 2011). Puede sobrevivir en tierra durante un tiempo aproximado de ocho días y si se mantienen en un rango de temperatura que oscile los 10 °C pueden sobrevivir por un periodo de hasta un mes (Ximénez *et al.*, 2007). En los quistes se pueden observar de uno a cuatro núcleos correspondientes a los trofozoítos que surgirán de los mismos una vez que vuelvan a colonizar el intestino de otro hospedero.



**Fig. 1 Ciclo de vida y estadios del parásito *Entamoeba histolytica*:** Los parásitos se adquieren al consumir quistes (forma infectiva) a través de alimentos contaminados. Una vez en el aparato digestivo, viajan hasta el íleon, donde sufre el proceso de desenquistamiento, resultando de un solo quiste hasta 8 trofozoítos que viajarán hasta el intestino grueso y se adherirán a la mucosa. En el intestino, los trofozoítos pueden volver a enquistarse, ser liberados en las heces, donde gracias a su resistente pared, pueden sobrevivir por varios días hasta llegar a otros individuos a través de agua contaminada o alimentos, completándose su ciclo de vida (Tomado de *Entamoeba histolytica* y su relación huésped-parásito; Campos –Peralta *et al*, 2011, modificada).



**Fig. 2 Mecanismo de invasión a la mucosa epitelial y lesiones provocadas por los trofozoítos de *E. histolytica*:** Los trofozoítos de *E. histolytica* pueden degradar las mucinas liberadas por las células intestinales para poder tener acceso a las células del lumen, lo que provoca el aplanamiento de las células, la infiltración de neutrófilos (que junto con reacciones inflamatorias dañan el epitelio), así como también pueden degradar las uniones estrechas, alterando el transporte iónico, provocando diarrea. Las lesiones amibianas pueden transformarse en úlceras, por donde los trofozoítos pueden invadir la lámina propia, alcanzar el torrente sanguíneo y diseminarse a otros órganos, de manera más común hacia el hígado. CRD: dominio de reconocimiento de carbohidratos; HGL: subunidad pesada de la lectina Gal/GalNAc; IGL: subunidad intermedia de la lectina Gal/GalNAc; LGL: subunidad ligera de la lectina Gal/GalNAc; IEC's: células epiteliales intestinales (Tomada de Regulation of virulence of *Entamoeba histolytica*, Marie and Petri, 2014; modificada).

## 1.2 Mecanismos de patogenicidad

El proceso mediante el cual los trofozoítos de *E. histolytica* causan la enfermedad puede dividirse en tres etapas: adhesión, citólisis y fagocitosis (Espinosa-Cantellano y Martínez-Palomo, 2000).

Adhesión: es el primer paso en el proceso invasivo y está controlado por moléculas de superficie que modulan la adherencia, la señalización, la ingestión de metabolitos e incluso la modulación del sistema inmune del hospedero en la interfase hospedero-parásito. Algunas de las moléculas implicadas presentan diversas funciones en el proceso adhesivo. La lectina heterotrimérica que reconoce residuos de galactosa y N-acetil-D-galactosamina (lectina Gal/GalNac) está compuesta por una subunidad pesada, una intermedia y una ligera (Marie and Petri. 2014). La cadena pesada contiene un dominio de reconocimiento de carbohidratos presentes en el moco y en las células epiteliales (Petri *et al.* 2002). Además, se sabe que ésta bloquea la formación del complejo de ataque a membrana inducido por el complemento (Campos-Peralta *et al.* 2011) y contiene además un dominio intracelular con homología a  $\beta$ -integrina, que podría participar en la señalización después de la unión de los carbohidratos (Petri *et al.* 2002; Stanley y Reed, 2001; Reyes, 2002).

Citólisis: una vez establecido el contacto con la célula blanco, el parásito induce diversos mecanismos citotóxicos para matar a las células del lumen intestinal. Algunos de ellos incluyen el aumento de  $\text{Ca}^{+2}$  intracelular (Marie y Petri, 2014), la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) (Ralston *et al.* 2011) y la pérdida de integridad de la membrana celular (Chacín Bonilla, 2013; Marie y Petri, 2014), proceso que *E. histolytica* lleva a cabo mediante dos grupos de proteínas: las cisteína proteasas (CP) y los amebaporos (Campos Peralta *et al.*, 2011; Marie y Petri, 2014). Estos últimos pertenecen a una familia de péptidos que comprenden distintas isoformas, las cuales han sido denominadas A, B y C (Campos-Peralta *et al.* 2011). Los amebaporos se encuentran contenidos en vesículas y contienen un dominio de proteína tipo saposina (encontrado en la saposina B) (Zhang *et al.*, 2004). Éstos se insertan en la membrana con el objetivo de crear canales, modificando

completamente el equilibrio iónico de la célula epitelial y provocando la muerte (Reyes y León, 2002). Se cree que los trofozoítos de *E. histolytica* son resistentes a la actividad de los amebaporos principalmente por la presencia de fosfolípidos neutros en su membrana, incapaces de unir a los amebaporos (Reyes y León, 2002). Las cisteína proteasas (CP's) son proteasas de secreción que son críticas en el proceso invasivo por su capacidad de degradar componentes de la matriz extracelular, así como se ha demostrado la capacidad de estas proteínas de inactivar precursores de moléculas del sistema inmune, como IL-18, además de hidrolizar moléculas como C3, IgA, IgG y componentes del complemento (Que *et al.* 2003; Kelsall *et al.* 1993). A partir del genoma de *E. histolytica* se ha deducido que existen aproximadamente 50 genes que codifican para CP's, las cuales son sintetizadas como precursores que contienen tres segmentos: un péptido-señal de 12 a 14 aminoácidos, un pro-dominio de 78 a 82 aminoácidos y el dominio catalítico de 216 hasta 225 aminoácidos. Los precursores son procesados para dar lugar a enzimas maduras que pueden ser a partir de ese momento liberadas para participar en el proceso de invasión al epitelio (Que y Reed, 2000). Entre las CP's más estudiadas se encuentran la ACP1-3 y la EhCP5, que degradan proteínas de matriz como laminina, fibronectina, colágeno y elastina, además de participar en otros procesos como ciclo celular (Stanley y Reed, 2001; Campos-Peralta, 2010). Otra CP importante del parásito es EhCP112 (también conocida como EhCPB-9), que forma parte del complejo EhCPADH junto con una adhesina (EhADH112), y que también podría participar en la virulencia del parásito (Que *et al.* 2000; Ocádiz *et al.* 2005; Ocádiz-Ruiz *et al.*, 2013).

**Fagocitosis:** Este evento consiste en la ingestión por parte del parásito tanto de moléculas inertes como de fragmentos celulares y células vivas. Cuando los trofozoítos ingieren partículas cuyo contacto se realiza a través de fuerzas electrostáticas se denomina fagocitosis inespecífica (Bailey *et al.* 1990), mientras que la fagocitosis específica depende del contacto directo, es decir de los trofozoítos con las células blanco, ingiriéndolas vivas o lisadas (Arroyo y Orozco, 1987). En este proceso pueden participar moléculas de superficie, componentes del citoesqueleto y elementos que contribuyen a su estructuración, así como GTPasas



pequeñas de la familia Rab, que participan en la formación del fagolisosoma, donde los materiales ingeridos son degradados por la acción de proteasas, lizosimas, glicosidasas, amebaporos y fosfolipasas (Okada, 2006).

### **1.3 Características del genoma de *E. histolytica***

El genoma de *E. histolytica* tiene un tamaño aproximado de 23.7 Mb, el cual está constituido por un aproximado de 10,000 genes de 1.17 kb de longitud promedio, y que comprenden el 49% del genoma del parásito (Loftus *et al.*, 2005). Se ha predicho también que un 25% de los genes contienen al menos un intrón y que hasta un 6% contienen múltiples intrones (Loftus *et al.*, 2005). El genoma de este organismo contiene un bajo contenido de G+C (22.4%) y un alto contenido de A+T (77.6%) (Bhattacharya *et al.*, 2000). Además, el 31.8% de las proteínas predichas no tienen homólogos en otros organismos, encontrándose cierto nivel de redundancia en los genes que codifican para factores de virulencia (Loftus *et al.*, 2005). En cuanto a sus cromosomas, debido a que éstos no se condensan y a la variabilidad obtenida en la homología de cromosomas de distintos aislados, hacen que tanto el número como el tamaño exacto de los cromosomas sean parámetros difíciles de determinar (Riverón *et al.*, 2000; Loftus *et al.*, 2005). La variación del tamaño de los cromosomas podría estar determinada por la expansión y contracción de repetidos subteloméricos, como se ha observado en otros protozoarios (Melville *et al.*, 1999; Loftus *et al.*, 2005). Gracias a la técnica de electroforesis en geles de campos pulsados (PFGE), la cual permite separar moléculas de DNA de alto peso molecular, se ha podido determinar de manera parcial la topología del genoma del parásito (Riverón *et al.*, 2000). Se ha utilizado esa técnica ya que permite que los cromosomas se mantengan intactos y que cada banda que resulta pueda interpretarse como un cromosoma. Sin embargo, se han obtenido patrones de bandas difusas, que ha dificultado establecer el número exacto de cromosomas. Este patrón se ha adjudicado a diversas razones, una de ellas la baja condensación del DNA del parásito durante la mitosis, así como también a la presencia de círculos de DNA de distintos tamaños, tanto en el núcleo como en organelos citoplásmicos denominados EhKO's (Riverón *et al.*, 2000), que provocan que las bandas presenten

barridos, dificultando la observación de los cromosomas amibianos. Sin embargo, después de diversos estudios se ha aceptado que el genoma de *E. histolytica* consiste en 14 cromosomas haploides (Willhoeft y Tannich, 1999).

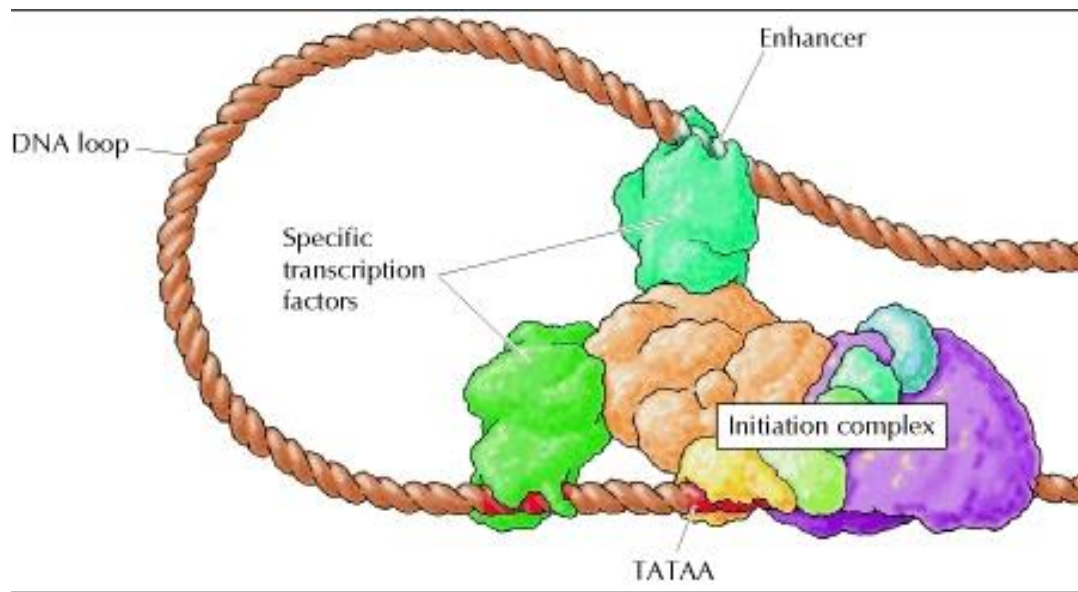
La comparación de los genes que codifican para enzimas del metabolismo secundario amibianos con los de otros organismos ha mostrado a través de la evolución ha ocurrido pérdida secundaria de genes, así como también transferencia horizontal de genes desde organismos como las bacterias (López *et al.* 2010). Debido a que el parásito ha evolucionado para sobrevivir en un ambiente pobre en oxígeno como el intestino, éste ha evolucionado para ser un fermentador estricto, que utiliza enzimas similares a las de las bacterias para obtener energía de su principal fuente, la glucosa, por lo que carece también de enzimas pertenecientes a un metabolismo aeróbico, como las del ciclo de Krebs y de la cadena respiratoria (Loftus *et al.* 2005). Además, se ha identificado un organelo atrófico derivado de la mitocondria con ausencia de genoma (Loftus *et al.* 2005). A pesar de que el parásito tiene a la glucosa como su principal fuente energética, éste no presenta los transportadores correspondientes a las células eucariotas, por el contrario, los del parásito están más relacionados a los transportadores procariotas de glucosa/ribosa (Loftus *et al.* 2005).

Debido también a que *E. histolytica* es un parásito que reside en un ambiente microaerófilico, se piensa que la presencia de bacterias y de metabolitos orgánicos preformados disponibles en el intestino ha sido otra de las razones de la eliminación de vías metabólicas, como la síntesis de aminoácidos, excepto la serina y la cisteína, así como la de síntesis de ácidos grasos, pero conservando la habilidad de sintetizar fosfolípidos (Loftus *et al.* 2005; Marie y Petri, 2014). Este parásito también carece de la capacidad de sintetizar purinas, pirimidinas y timidilatos, los cuales debe obtener a través de rutas de salvamento (Abrahamsen *et al.* 2004).

#### **1.4 Características de la transcripción y cromatina en eucariotas superiores**

La expresión génica en eucariotas está controlada a diferentes niveles desde el inicio de la transcripción hasta modificaciones postraduccionales que activan o reprimen a las proteínas. La regulación al inicio de la transcripción puede así mismo dividirse en tres niveles: a) a nivel de las secuencias de nucleótidos que fungen como reguladores; b) a nivel de la estructura de la cromatina, ya que ésta misma determinará junto con elementos de la regulación epigenética la expresión de un gen determinado; y c) a nivel de la organización espacial del genoma en el núcleo (Recillas y Escamilla, 2004).

Los genes transcritos por la RNA polimerasa II, que corresponden a los RNA mensajeros, tienen dos tipos de elementos promotores principales, la caja TATA y las secuencias Inr que sirven como sitio de unión para factores de transcripción (Fig. 3). En el caso de las células de mamíferos, existen además secuencias reguladoras de la transcripción que pueden encontrarse a una distancia muy grande del sitio de inicio de la transcripción (10 kb), y son denominadas “enhancers” o potenciadores. Estos elementos son accesibles a la maquinaria transcripcional una vez que la cromatina es desplegada, con el objetivo de sintetizar el RNA mensajero para codificar las proteínas de cada tipo celular (Recillas y Escamilla, 2004). La transcripción se inicia una vez que se forma el complejo de pre-inicio, que comienza su ensamblaje con la proteína de unión a la caja TATA (denominada TBP) en el promotor de los genes (Cooper, 2000; Lewin, 2008). Le sigue la unión del factor TIIFA para estabilizar la unión entre la caja TATA y TBP; a continuación y como paso crítico se une el factor TFIIB que a su vez reclutará al factor TFIIF que llevará consigo a la RNA pol II, para finalmente recibir a los factores TFIIE y TFIIH que complementarán el proceso con su actividad ATPasa. Una vez completadas estas uniones la RNA pol II será fosforilada en su extremo C-terminal para iniciar la síntesis del nuevo transcrito (Lewin et al. 2008).



**Fig. 3 Esquema de la formación del complejo de inicio de la transcripción en células eucariotas:** Formación de un bucle en el DNA para la unión de factores de transcripción y de los “enhancers” distales al sitio de inicio (Geoffrey M. Cooper, 2000. Tomada de *The Cell: A Molecular Approach*. 2nd edition).

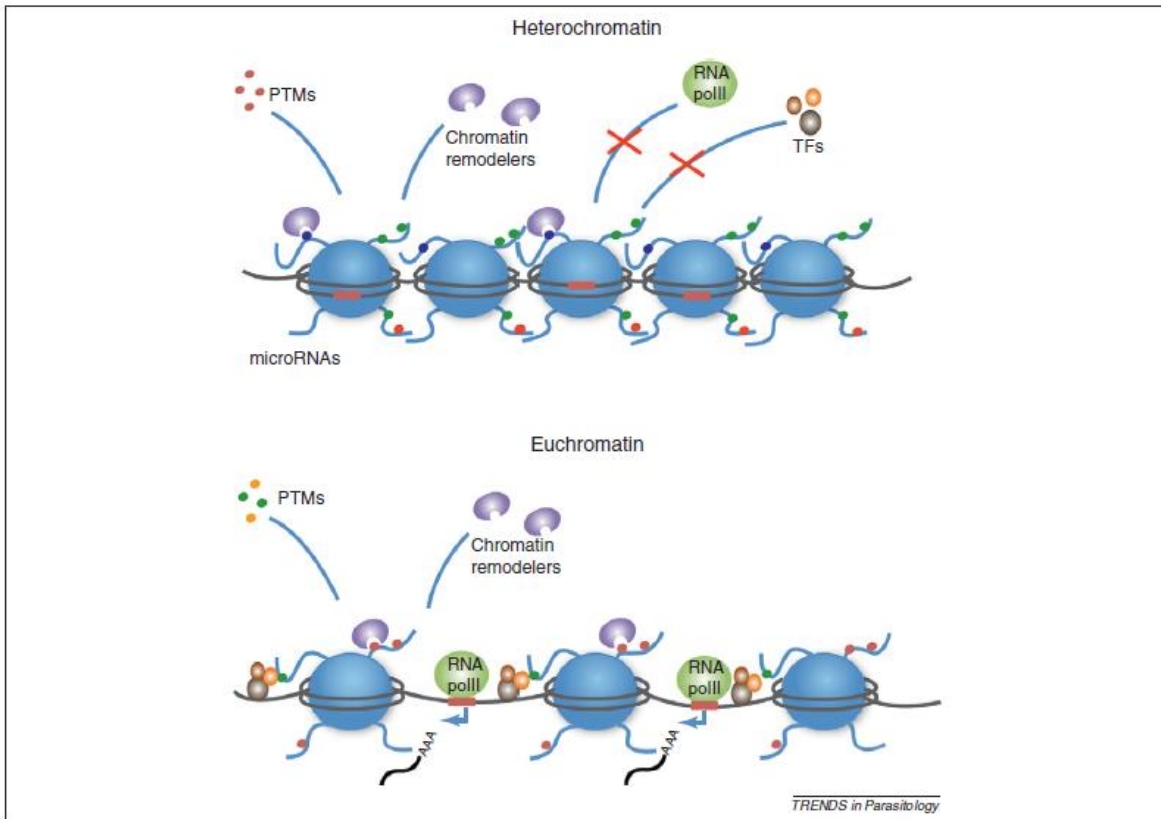
Aunado a lo anterior, otros procesos necesitan realizarse para que los genes se encuentren disponibles a la maquinarias de transcripción, ya que el DNA en las células eucariotas se encuentra compartamentalizado en el núcleo celular unido estrechamente a proteínas, como las histonas, formando el complejo denominado cromatina (Zhang y Reinberg, 2001). Ésta tiene como unidad básica estructural el nucleosoma, compuesto por 146 pares de bases alrededor de un octámero de proteínas formado por dos moléculas de cada una de las histonas H2A, H2B, H3 y H4 (Zhang y Reinberg, 2001), y una molécula de la histona H1 unida para condensar los nucleosomas a una fibra de 10 nm denominada solenoide (Lewin *et al.* 2008). El empaquetamiento de la cromatina es importantes ya que influye en cuanto a su viabilidad para ser molde para la transcripción y por tanto, para la expresión genética. La cromatina en su forma más empaquetada tiene efectos represores ya que las secuencias reguladoras anteriormente mencionadas deben estar expuestas para ser blanco de los factores de transcripción y que los genes puedan expresarse. (Recillas y Escamilla, 2004).

### **1.5 Regulación epigenética de la cromatina**

La regulación epigenética se refiere a la inducción de cambios en la estructura de la cromatina, y éstos pueden tener efecto en la regulación de la expresión de genes (Croken *et al.* 2012). Los cambios epigenéticos pueden definirse como cualquier cambio heredable en la expresión de los genes sin que se modifique la secuencia de DNA, de manera que la información contenida puede transmitirse a la siguiente generación (Croken *et al.* 2012). Estos cambios pueden darse por modificación de la estructura de la cromatina (Croken *et al.* 2012), la cual resulta en cambios que permiten el acceso al DNA de complejos transcripcionales y a las polimerasas, produciendo DNA accesible o eucromatina, o DNA compacto o heterocromatina (Lewin, 2008; Mirelman et al, 2008; Croken *et al.* 2012) (Fig. 4). Esta transición se lleva por los siguientes mecanismos: metilación del DNA, modificaciones post-traduccionales en las histonas, complejos remodeladores dependientes de ATP, acción de los complejos Polycomb y Trithorax (descritos originalmente en

*Drosophila melanogaster*) y por la presencia de variantes de histonas (Recillas y Escamilla, 2004).

La metilación del DNA es una de las modificaciones más estudiadas, se lleva a cabo por proteínas metil-transferasas de DNA y es responsable de heredar la información epigenética. Estas enzimas tienen como blanco la posición 5' de la citosina, donde un grupo metilo es incorporado siempre que el nucleótido se encuentre en una región CpG (Cooper, 2000; Lizuka y Smith, 2003). La metilación del DNA participa en la represión genética por la formación de cromatina compacta, que contribuye a la estabilidad del genoma evitando los saltos de transposones (Rice y Allis, 2001).



**Fig. 4 Conversi3n de la cromatina a heterocromatina y eucromatina por modificaciones al DNA o a prote3nas histonas:** La heterocromatina es un estado compacto con modificaciones post-traduccionales que previenen el acceso a la RNA polimerasa II (RNA pol II) y factores transcripcionales (Tfs). La eucromatina es un estado de cromatina abierta mantenida por complejos moleculares para permitir el acceso a los complejos antes mencionados. (Tomada de Crocken *et al.* 2012).

**Modificaciones post-traduccionales de histonas:** la estructura de los nucleosomas se ve relajada cuando los extremos N-terminal de las histonas sobresalen de la estructura globular de los mismos. Los extremos N-terminal de las histonas son regiones ricas en residuos que pueden ser blanco de modificaciones como acetilaciones, metilaciones, y fosforilaciones, entre otras, las cuales en diversas combinaciones pueden afectar positiva o negativamente el nivel de compactación de la cromatina (Recillas y Escamilla, 2004). Por ejemplo, las regiones donde las histonas se encuentran hiperacetiladas indican una estructura abierta y lista para poder iniciar la transcripción, mientras que las regiones desacetiladas permanecerán compactas y por lo tanto la expresión de genes se verá reprimida (Recillas y Escamilla, 2004).

Las modificaciones post-traduccionales de las histonas son llevadas a cabo por enzimas modificadoras, que como ya se mencionó es un paso fundamental para la regulación de la accesibilidad del DNA en procesos como la transcripción o la reparación del DNA. Las histonas sufren una variedad de modificaciones post-traduccionales en sus dominios globulares y en sus extremos N-terminales, siendo las más estudiadas la acetilación y la metilación, dándose ésta última de manera principal en las histonas H3 y H4 (Rice, Allis, 2001; Karkhanis *et al.* 2011).

### **1.6 Proteínas metil-transferasas de Arginina (PRMT's)**

A diferencia de la acetilación y la fosforilación, las histonas metiladas no cambian en cuanto su carga, lo que ha dificultado la identificación de las enzimas responsables de este proceso (Strahl y Allis, 2000). Durante los últimos años se esclareció que las enzimas que se encargan de adicionar los grupos metilo a las histonas (desde 1 hasta 3 grupos) son las metil-transferasas de histonas. Estas enzimas transfieren los metilos hacia residuos de arginina (R) o lisina (K) situados en los extremos N-terminales de las histonas (Zhang *et al.* 2012). Las metil-transferasas de histonas (HMT's) se dividen en dos grupos principales: las metil-transferasas de lisina (HKMT's) y las metil-transferasas de arginina (PRMT's), involucradas en el silenciamiento o activación génica (Zhang y Reinberg, 2001). Estas enzimas

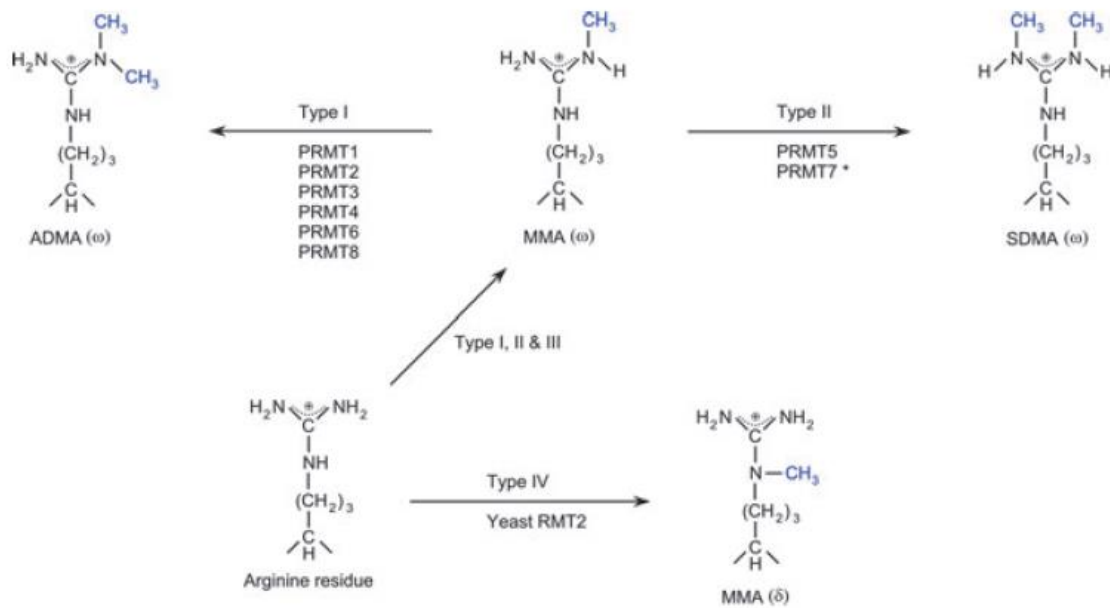


transfieren los grupos metilo a partir del sustrato S-adenosil-L-metionina (Adomet) a las R y K en las proteínas, formando los productos S-adenosil-L-homocisteína y metilargininas o metil-lisinas (Volkel y Angrand, 2006; Lakowski *et al.* 2009).

En el humano se han descubierto hasta el momento 10 isoformas de PRMTs: PRMT1-PRMT10. Todas tienen motivos conservados en sus dominios catalíticos, aunque no se ha demostrado actividad de metil-transferasa para PRMT10 (Hirouchi *et al.* 2013, Wei *et al.* 2014). Estas proteínas se han clasificado de acuerdo a la naturaleza del producto metilado que resulta de la reacción: las enzimas de tipo I, monometilan y dimetilan asimétricamente (ADMA) residuos de arginina ( $\omega$ -N<sup>G</sup>-monometil y  $\omega$ -N<sup>G</sup>,N<sup>G</sup>-dimetil arginina respectivamente); las enzimas tipo II monometilan y dimetilan simétricamente (SDMA) a los residuos de arginina ( $\omega$ -N<sup>G</sup>-monometil y  $\omega$ -N<sup>G</sup>,N<sup>G</sup>-dimetil arginina respectivamente) (Lee *et al.* 2005; Wang *et al.* 2012; Hirouchi *et al.* 2013) (Fig. 5). La monometilación por parte de las PRMT's se ha clasificado como un tipo III, dando como resultado  $\omega$ -N<sup>G</sup>-monometil arginina (MMA), mientras que la formación de  $\delta$ -N<sup>G</sup>-metilarginina (actividad catalítica de tipo IV) se ha reportado únicamente en la levadura RMT2 (Bedford y Clarke, 2009; Wang y Lee, 2012).

Las PRMT's tienen como sustrato proteínas que contienen motivos ricos en glicina y arginina (GAR) en secuencia RGG, RG o RXG (Fan *et al.* 2009; Wang y Lee, 2012). Entre los sustratos identificados de estas enzimas se incluyen proteínas de unión a RNA heterogéneas como la fibrilarina, nucleolina y PABPII (Poly-A Binding Protein II), que están involucradas en el procesamiento y transporte del RNA (Fan *et al.* 2009). Algunas proteínas relacionadas con la cromatina también son sustratos de las PRMT's, como proteínas de alta movilidad, p300 e histonas (Lakowski *et al.* 2009). Estas enzimas pueden interactuar y a su vez, ser modificadas por otras proteínas, afectando su especificidad y actividad (Lakowski *et al.* 2009). La metilación de argininas por las PRMT's está involucrada en diversos procesos bioquímicos y biológicos, como la transducción de señales, la proliferación celular, la regulación de la transcripción y el "splicing" de RNA (Hirouchi *et al.* 2013).

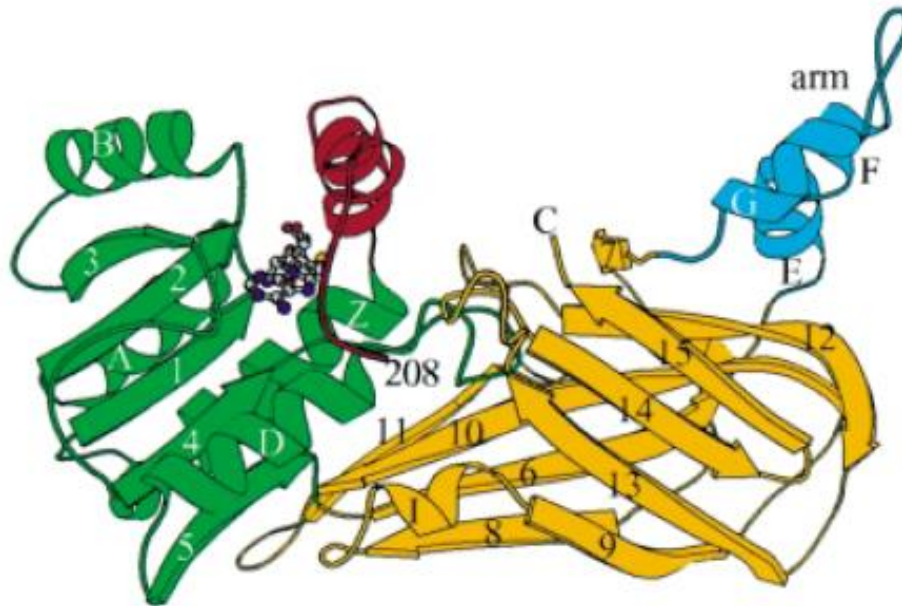
Recientemente, la metilación de histonas por las PRMT's se ha reconocido como un medio importante de regulación de la transcripción de genes, causando tanto represión o activación, ya que las histonas metiladas tienen la capacidad de unirse a factores de transcripción o a proteínas efectoras (Bedford y Clarke, 2009). Se ha identificado la actividad metil-transferasa en las PRMT1 y PRMT4 (también conocida como CARM1) ambas de tipo I y en la PRMT5 de tipo II. La enzima PRMT1 metila a la histona 4 en el residuo R3 (H4R3), acción que potencia la acetilación de H4 por p300 (Lakowski *et al.* 2009). PRMT1 metila en menor proporción a la H2A en R3 (H2AR3) (Fan *et al.* 2009). PRMT4 o CARM1 (Coactivator-associated arginine methyltransferase 1) metila R2, 17, 26 (H3R2, H3R17 y H3R26, respectivamente) y varias argininas en el extremo C-terminal de la histona 3, y es reclutada junto con p300 y PRMT1 cuando p53 está unido a regiones promotoras para el reclutamiento de factores transcripcionales adicionales que facilitan la transcripción (Lakowski *et al.* 2009). PRMT5 metila R8 en H3 y R3 en H4 (H4R8 y H4R3, respectivamente), y se ha observado su asociación con complejos remodeladores de cromatina, como SWI/SNF (Karkhanis *et al.* 2011).



**Fig. 5 Tipos de metilación de los residuos de arginina y tipos de proteínas metil-transferasas de arginina (PRMT's):** Los distintos autores postulan a las PRMT's que realizan monometilación como un tipo III, y como un tipo IV a la formación de  $\delta$ -N<sup>G</sup>-metilarginina, hasta ahora solamente reportado para la levadura RMT2. ADMA: dimetil-arginina asimétrica; SDMA: dimetil-arginina simétrica; MMA: monometil-arginina (Tomada de Wang *et al.* 2012).

En mamíferos, la actividad de dimetilación asimétrica de las enzimas PRMT1 y 4 se ha asociado con activación de genes, mientras que la actividad de dimetilación simétrica por parte de la PRMT5 se ha asociado con represión de la transcripción (Lakowski *et al.* 2009; Fan *et al.* 2009). Por otra parte, se ha descubierto que la enzima PRMT7 tiene actividad de únicamente monometil-transferasa, y está involucrada junto con PRMT5 en la metilación de H3R2 y H4R3, involucradas en la activación y represión de la transcripción genética, respectivamente (Cura *et al.* 2013).

Las PRMT's son enzimas modulares que pueden variar desde los 320 a los 970 aminoácidos y comparten un dominio catalítico de metil-transferasa, que pertenece a la clase I de metil-transferasas dependientes de Adomet, el cual tiene una estructura de 6 hojas  $\beta$  plegadas y dos pares de  $\alpha$  hélices (Fisk y Read, 2011; Cura *et al.* 2013). A su vez poseen 2  $\alpha$  hélices en el extremo N-terminal que tienen la capacidad de interactuar con S-adenosil-homocisteína (Zhang *et al.* 2001). El segundo dominio de las proteínas tiene forma de barril. El sitio activo de la enzima es conservado, localizado entre los dos dominios, es decir en la parte central de la proteína y consta de 12 residuos que conforman los bucles THW y E, los cuales permiten la unión del sustrato Adomet (Bedford y Clarke, 2009) (Fig. 6). En el estado inactivo de las PRMT's, el dominio de unión a Adomet une cinco moléculas de agua para evitar una posible transmetilación (Fisk y Read, 2011; Cura *et al.* 2013).



**Fig. 6 Estructura general de las proteínas metil-transferasas de arginina:** Las enzimas PRMT's se componen de dos hélices en N-terminal (rojo), el dominio de unión a AdoMet (verde), la estructura de barril (amarillo) y el brazo de tres hélices (azul). El sitio activo se encuentra justo en la parte central (posición 208). El brazo (azul) es la parte que sufre la pentahidratación como control regulador de la actividad de la enzima (Tomada de Zhang *et al.* 2001).

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1 Epigenética en parásitos

Los genomas de los parásitos se han examinado en la búsqueda de los componentes clásicos transcripcionales y de regulación epigenética considerados clásicos, por estar presentes en mamíferos y que están presentes en protozoarios, sin embargo no todas se han encontrado. Por otra parte, la caracterización de complejos remodeladores de cromatina en estos organismos ha revelado la presencia de proteínas únicas y específicas de cada especie (Croken *et al.* 2012). A pesar de que las modificaciones en las histonas están conservadas en parásitos, sin embargo, existe diversidad entre las marcas epigenéticas y los responsables moleculares de las modificaciones post-traduccionales, aún en especies relacionadas (Croken *et al.* 2012). Las variaciones especie-específicas entre las maquinarias epigenéticas de los parásitos sugiere que éstas juegan un papel importante en la regulación de sus ciclos de vida, dado que algunos organismos, como *Toxoplasma gondii*, *Trypanosoma sp.* o *Plasmodium sp.* tienen varias fases morfológicas que requieren un control, sobre todo al momento de activar o silenciar genes, para la diferenciación entre estadios celulares (Hakimi y Deitsch, 2007). La epigenética también debe tener un papel importante en la expresión de factores de virulencia de los parásitos que les permiten la colonización de su hospedero u hospederos, así como también en controlar la variación antigénica como método de protección, evitando el sistema inmunológico (Hakimi y Deitsch, 2007; Croken *et al.* 2012).

En *Plasmodium sp.* se han identificado dos grandes familias de acetil-transferasas de histonas (HAT), las MYST y las GCN5 (acetil-transferasas de lisina) (Croken *et al.* 2012). Al inducir la sobreexpresión de MYST se ha encontrado que el ciclo celular resulta alterado, produciéndose menor cantidad de merozoítos por célula infectada, como resultado de una esquizogonia acelerada (Miao *et al.* 2010). Por otra parte, al tratar las células con un inhibidor de GCN5, las células pueden sobrevivir, pero expresan una gran cantidad de genes regulados negativamente (Croken *et al.*

2012). Este parásito también codifica cuatro variantes de histonas (H2A.Z, H2Bv, H3.3 y CenH3) además de las cuatro canónicas (Trelle *et al.* 2009; Dalmaso *et al.* 2011), aunque no se ha identificado la histona 1, lo que explicaría la falta de compactación del material genético en el compartimento nuclear (Cui y Miao, 2010). Estas variantes, así como las modificaciones que éstas puedan sufrir, influyen en la estabilidad de los nucleosomas, estructura de la cromatina y expresión de genes, por lo que podría inferirse que participan en la transición de estadios en el parásito (Cui y Miao, 2010; Croken *et al.* 2012).

En *Toxoplasma gondii*, a través de múltiples análisis bioinformáticos se ha encontrado que tiene una maquinaria epigenética similar a *Plasmodium sp.* (Croken *et al.* 2012), y se han identificado marcas de activación génica como la acetilación de la lisina 16 de H4 (H4K16ac), la acetilación de la lisinas 9 de H3 (H3K9ac) y la trimetilación de la lisina 4 de H3 (H3K4me3) (Gissot *et al.* 2007). Sin embargo, estas marcas epigenéticas no se encuentran en los promotores de bradizoítos ni de esporozoítos, por lo que las modificaciones de histonas jugarían un papel importante en la transición entre estadios de este organismo. *T. gondii* también tiene HAT's del tipo MYST así como ortólogos de GCN5 y desacetilasas de histonas (HDAC's) (Jeffers *et al.* 2012; Croken *et al.* 2012). En este parásito también se identificaron cinco PRMT's, de las cuales se han caracterizado las PRMT1 y PRMT4 (CARM1), que metilan H4R3 y H3R17, respectivamente (Saksouk *et al.* 2005). CARM1 parece ser esencial en la inducción de formación de bradizoítos, mientras que PRMT1 se encuentra asociada a la expresión de genes durante las fases de taquizoítos y bradizoítos, así como también parece participar en la regulación de la división celular (Gissot *et al.* 2007). *T. brucei* posee también dos homólogos de las enzimas DOT1 con actividad metil-transferasa (TbDOT1A y TbDOT1B), las cuales se expresan y parecen ser esenciales en el estadio del torrente sanguíneo (tripomastigotes) y en la transición de tripomastigotes a la forma procíclica que se desarrolla en su hospedero invertebrado (Janzen *et al.* 2006).

*Trypanosoma brucei* organiza sus genes en policistrones, en donde sus antígenos variables de superficie (VSG) y la prociclina de superficie se encuentran transcritos por la RNA pol I, mientras que sus mRNA policistrónicos son transcritos por la RNA pol II, los cuales mediante trans-splicing son madurados a mRNA individuales para la traducción a proteínas (Rudenko, 2010). Este microorganismo posee tres variantes de histonas específicas, H3V, H4V y H2Bv (Rudenko, 2010) y tres integrantes de la familia MYST con actividad acetil-transferasa, de las cuales dos son esenciales, debido a que su eliminación con iRNA interrumpe el ciclo celular y el crecimiento de los parásitos (Croken *et al.* 2012). A su vez regula la expresión de sus VSG a través de HDAC's que controlan la expresión de sus genes mediante silenciamiento telomérico, evitando que se exprese más de un gen VSG a la vez (Wang *et al.* 2010).

## **2.2 Regulación transcripcional y epigenética en *Entamoeba histolytica***

*E. histolytica* tiene características muy particulares con respecto a la organización de la cromatina, como la condensación parcial o nula de la misma durante la mitosis, así como la variabilidad en los extremos N-terminal de las histonas 3 y 4 con respecto a las histonas de otros organismos (Torres-Guerrero *et al.* 1991; Binder *et al.* 1995). Además también tiene variaciones respecto a las secuencias que regulan el inicio de la transcripción, como presentar una caja TATA atípica río arriba de las regiones iniciadoras, así como elementos adicionales de regulación, como el motivo GAAC, que puede determinar el sitio de inicio de la transcripción independiente de TATA y los elementos INR (Purdy *et al.* 1996). Se han identificado también secuencias regulatorias río arriba llamadas URE1 a URE5 (Upstream Regulatory Element) (Purdy *et al.* 1996; Pearson y Singh, 2010).

La cromatina de *E. histolytica* se encuentra organizada en estructuras similares a los nucleosomas, pero con una distribución irregular (Torres-Guerrero *et al.* 1991; Meza, 2000). Además, se han identificado numerosos genes que codifican para las cuatro histonas canónicas: dos genes para H2A, dos para H2B, seis para H3 y uno para H4 (Dalmaso *et al.* 2011). Con el uso de anticuerpos específicos contra



residuos de lisina acetilados se confirmó que principalmente las histonas H3 y H4 de *E. histolytica* pueden sufrir acetilación (Ramakrishnan *et al.* 2004). Las enzimas responsables de esta modificación postraduccional fueron identificadas mediante PCR y RT-PCR demostrándose su expresión *in vivo*, y su actividad sobre H4 (Ramakrishnan *et al.* 2004).

Mediante análisis de interacción DNA-proteínas se analizó el estado de la cromatina de *E. histolytica* para observar la condición de las regiones promotoras, con lo que se ha observado que cuando existe heterocromatina restrictiva, ésta es marcada por la metilación de las lisinas 9 y 27 de la H3, así como la metilación de la lisina 20 en la H4 (Kouzarides, 2007). Por el contrario, cuando se detecta una eucromatina más permisiva, las marcas epigenéticas que se observan son la metilación de las lisinas 4, 36 y 79 de la H3, junto con la acetilación de la lisina 9 (Kouzarides, 2007). Para observar la regulación epigenética ejercida por estas modificaciones en la expresión de genes se han realizado estudios inhibiendo las metil o acetil-transferasas (Ali *et al.* 2007). Se ha visto que la metilación promueve el silenciamiento de genes mediante el bloqueo del reclutamiento de factores de transcripción o por el reclutamiento de proteínas de unión a grupos metilo, que reclutan factores que potencian el estado restrictivo de la cromatina (Ali *et al.* 2007). Además, utilizando inhibidores contra metil-transferasas se observó que la virulencia de los trofozoítos se ve disminuida *in vivo* (Fisher *et al.* 2004). También se ha identificado un gen que codifica para una metil-transferasa de DNA, denominada EhMETH, que se localiza tanto en el citoplasma como en el núcleo (Fisher *et al.* 2004).

En células de mamífero las regiones de DNA conocidas como las islas CpG metiladas son reconocidas por proteínas llamadas MBD (methyl-binding domain proteins), las cuales son responsables del silenciamiento transcripcional al interferir con la unión del complejo de inicio con el promotor del gen en cuestión, además de reclutar proteínas que se encargan de la eliminación de modificaciones como la acetilación, o con proteínas que implican la compactación de la cromatina (Lavy *et al.* 2006). En la amiba la metilación del DNA no está restringida a las islas CpG, y

mediante ensayos de inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP) con anticuerpos anti-CpG metilados se encontró una proteína que tiene afinidad a LINEs (Long interspersed elements) metilados. Esta proteína, denominada EhMLBP, fue posteriormente localizada en las regiones perinucleares y en el núcleo, por lo que la proteína podría participar en la regulación transcripcional del parásito (Lavy *et al.* 2006).

Por otra parte, mediante análisis *in silico* se identificó la presencia de cinco PRMT's en *E. histolytica* (Fisk y Read, 2011). Borbolla-Vázquez *et al.* (2015) reportaron una relación filogenética de tres de estas PRMTs de *E. histolytica* (EhPRMTs) con la PRMT1 de humano, llamándolas EhPRMT1a, EhPRMT1b y EhPRMT1c. Otra de las EhPRMTs mostró relación filogenética con la PRMT5, por lo que se le denominó EhPRMT5, mientras que la molécula restante no mostró homología significativa con alguna otra PRMT, por lo que se consideró como una PRMT atípica (EhPRMT-A) (Borbolla-Vázquez *et al.*, 2015). Mediante ensayos de RT-PCR se demostró la expresión de las cinco EhPRMTs y utilizando un anticuerpo contra la PRMT1 de humano se identificaron dos a tres bandas de 37 a 38 kDa en extractos totales de amiba, sugiriendo la expresión de las tres EhPRMT1 (Borbolla-Vázquez *et al.*, 2015). Además, mediante inmunofluorescencia, éstas PRMT se localizaron tanto en el núcleo como en el citoplasma de los trofozoítos (Borbolla-Vázquez *et al.*, 2015). Adicionalmente, la proteína recombinante EhPRMT1a mostró actividad de metil-transferasa sobre histonas comerciales de pollo y específicamente se detectó la dimetilación de H4R3 (Borbolla-Vázquez *et al.*, 2015). Esos resultados sugieren que la enzima amibiana es un ortólogo de PRMT1 y posiblemente EhPRMT1b y EhPRMT1c, debido a su alta homología a EhPRMT1a y pudieran tener una actividad redundante, y queda por determinar la actividad de EhPRMT5 y EhPRMT-A.

### 3. Justificación

La organización de la cromatina y la forma en que ésta cambia de manera constante tanto en distintos tipos y poblaciones celulares, como en la diferenciación de estadios diferenciales y como respuesta a estímulos del ambiente es una prueba de que la regulación epigenética contribuye a la expresión de genes en cada uno de esos estadios.

Los mecanismos de regulación epigenética no están totalmente conocidos en *E. histolytica*. En nuestro grupo de trabajo se identificaron cinco genes que codifican PRMTs putativas y se caracterizaron las homólogas a PRMT1 (Borbolla-Vázquez *et al.*, 2015). Sin embargo, hasta el momento no se han caracterizado la otras dos PRMT putativas (PRMT5 y PRMT-A). Por lo tanto, es necesario conocer si estas proteínas hipotéticas tienen actividad enzimática y cómo ésta actividad influye en el desarrollo del parásito y en su patogenicidad, para comprender mejor la biología del mismo y poder combatir la enfermedad que causa.

## **4. Hipótesis**

Las proteínas PRMT5 y PRMT-A de *E. histolytica* presentan actividad de metil-transferasa hacia residuos de arginina en histonas.

## **5. Objetivo**

Caracterizar las enzimas metil-transferasas de arginina PRMT5 y PRMT-A de *Entamoeba histolytica*.

### **5.1 Objetivos particulares**

- 1) Producir las proteínas recombinantes EhPRMT5 y EhPRMT-A y anticuerpos específicos para cada una de ellas.
- 2) Demostrar la actividad enzimática de metil-transferasa de arginina de las proteínas EhPRMT5 y EhPRMT-A y determinar su histona blanco.
- 3) Determinar la localización subcelular de las proteínas PRMT5 y PRMT-A en trofozoítos de *E. histolytica*.

## **6. Materiales y métodos**

### **6.1 Cultivo de trofozoítos de *E. histolytica***

Trofozoítos de la clona A, cepa HM1: IMSS (Orozco *et al*, 1983), se cultivaron axénicamente a 37°C en medio TYI-S-33 suplementado con suero bovino al 15% e inactivado por calentamiento a 56°C durante 30 minutos, 3% de mezcla de vitaminas de Diamon (KC Biologica), 40 UI de penicilina/ml (Lakeside) y 57 µg/ml de estreptomicina (Lakeside) (Diamond *et al*, 1978). Los trofozoítos se cosecharon una vez que los cultivos alcanzaron la confluencia. Para ello, los cultivos se enfriaron por 10 minutos a 4°C para despegar las células de la pared de la caja de cultivo, se colectaron en tubos y se centrifugaron a 1000 x g por 5 min. El medio de cultivo se desechó y el paquete celular se resuspendió en el mismo volumen con PBS (NaCl 137 mM; KCl 2.7 mM; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 10 mM y KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 10 mM, pH de 6.8) frío y estéril. Este paso se repitió dos veces más para lavar los trofozoítos.

### **6.2 Extracción y cuantificación de DNA genómico**

La obtención del DNA genómico de *E. histolytica* se realizó con el kit *Wizard Genomic DNA Purification* (Promega), donde el cultivo de amibas se centrifugó a 13000 x g para empaquetar las células, se agregó el amortiguador “Cell Lysis Solution”, posteriormente se añadió el amortiguador “Nuclei Lysis solution” y finalmente el DNA se precipitó con isopropanol y se lavó con etanol al 70%. El DNA obtenido se resuspendió en agua estéril de ampolleta y se cuantificó por espectrofotometría a 260/280 nm.

### **6.3 Electroforesis en geles de agarosa**

El análisis del DNA se realizó mediante electroforesis en geles de agarosa al 1% preparados con amortiguador TAE (40 mM tris acetato y 1mM EDTA). Las muestras se cargaron con amortiguador de carga (azul de bromofenol al 0.25%, xilencianol 0.25% y glicerol) y la electroforesis se llevó a cabo manteniendo un voltaje constante de 80-90 volts por 40 minutos. Los geles se prepararon con una solución de bromuro

de etidio (10 mg/ml) y las bandas de DNA se visualizaron utilizando un transiluminador de luz UV.

#### 6.4 Diseño de iniciadores para las PRMT's

Para la amplificación y clonación los genes *Ehprmt5* (EHI\_158560; 1761 pb) y *Ehprmt-A* (EHI\_159180; 1104 pb) de *E. histolytica* se diseñaron cebadores con la ayuda del sitio de internet <http://www.idtdna.com/Home/Home.aspx> y del programa Oligo Explore:

Los iniciadores se diseñaron con las siguientes características:

- 1) El cebador sentido contiene el codón de inicio de la traducción, la secuencia de corte reconocida por la enzima *Bam H1* (GGATCC) y cuatro bases más para que se posicione la endonucleasa. Así, los iniciadores sentido son los siguientes: para *Ehprmt5* 5'-CCC CGG ATC CAT GAC CGA ACG AAA TA-3' y para *Ehprmt-A* es 5'- CCC CGG ATC CAT GAA AGA AAT-3'.
- 2) El cebador anti-sentido corresponde a la secuencia complementaria reversa de cada gen, incluyendo el codón de paro del gen, el sitio de reconocimiento para la enzima de restricción *Xho I* (CTCGAG) y cuatro bases más para el posicionamiento de la enzima. Así, los iniciadores anti-sentido son los siguientes: para *Ehprmt5* es 5'-CCC CCT CGA GTA ATG AGA ACG TTG AA-3' y para *Ehprmt-A* es 5'-CCC CCT CGA GTT AAA ATT CAT-3'.

#### 6.5 Reacción en cadena de la polimerasa

La amplificación por PCR de los genes de interés se llevó a cabo a partir de DNA genómico. Para la reacción se mezclaron 200 ng de DNA, 10 µM de los oligonucleótidos sentido y anti-sentido, 10 mM de dNTP's (dATP, dTTP, dGTP y dCTP), 50 mM MgCl<sub>2</sub> (Invitrogen), 5µl de solución amortiguadora 10X (Invitrogen), 1.25 U de enzima Kapa HiFi Hot Start polimerasa recombinante de alta fidelidad (KAPA BIOSYSTEMS, Boston Mass USA) y agua suficiente para alcanzar un

volumen final de 50 µl. Como control negativo se utilizó la misma mezcla de reacción, pero sin DNA molde.

La amplificación se realizó en un termociclador Veriti (Applied Biosystems) de 96 pozos, con las siguientes condiciones:

- Desnaturalización inicial: 95 °C por 4 minutos
- 35 ciclos de desnaturalización a 95 °C por 20 segundos, alineamiento a 55 °C (*Ehprmt5*) y 52 °C (*Ehprmt-A*) por 15 segundos y extensión a 72°C por 30 segundos.
- Extensión final a 72 °C por 5 minutos.

### **6.6 Aislamiento del plásmido *pGEX-6P-1***

El vector de clonación *pGEX-6P-1* (Fig. 7, Amersham), se obtuvo mediante el método de midipreparación de plásmidos (Qiagen). La cepa *DH5 α* de *Escherichia coli* transformada con el plásmido vector se sembró en 5 ml de medio Luria-Bertani (LB) más ampicilina (50 µg/ml) y se incubó a 37°C durante 16-18 horas en agitación constante a 170-180 rpm. Posteriormente, las bacterias se cosecharon por centrifugación a 6000 x g por 20 min a 4 °C, el paquete celular obtenido se resuspendió en 4 ml del amortiguador PI (Tris-HCl 50 mM pH 6.8, EDTA 10 mM y 100 µg/ml de RNasa) y se agregaron 4 ml de amortiguador de lisis P2 (NaOH 200 mM y SDS 1%). La mezcla se agitó suavemente por inversión y se dejó a temperatura ambiente por 5 minutos. Después se agregaron 4 ml de amortiguador de neutralización P3 (acetato de potasio 3 M pH 5.5), se dejó por 15 minutos a 4 °C y se centrifugó a 3800 x g durante 30 minutos a 4 °C. El sobrenadante se colocó en la columna de afinidad a DNA. Posteriormente, se realizaron dos lavados con 10 ml de amortiguador QC (NaCl 1 M, MOPS 50 mM e isopropanol 15%), para eliminar partículas no asociadas a la columna. El DNA plasmídico se eluyó con 5 ml de amortiguador QF (NaCl 1.25 M, Tris 50 mM pH 8.5 e isopropanol 15%) y se precipitó con 3.5 ml de isopropanol. La muestra se centrifugó a 15000 x g por 30 min, a 4 °C. El sobrenadante se desechó, la pastilla se lavó en 10 ml de etanol al 70% y se centrifugó a 15000 x g por 20 minutos a 4 °C. La pastilla se secó y se resuspendió

en 300 µl de agua estéril. El plásmido obtenido se distribuyó en alícuotas y se guardó a -20°C hasta su uso.

### **6.7 Digestión de los fragmentos de PCR y del plásmido *pGEX-6P-1***

Los fragmentos de PCR purificados correspondientes a los genes *Ehprmt5* y *Ehprmt-A* y el plásmido *pGEX-6P-1* se sometieron a una doble digestión con las enzimas *BamHI* y *XhoI*. La doble digestión se realizó en un volumen de 50 µl, utilizando 10 µl de DNA (0.5 mg), 1 µl (10 unidades) de cada una de las enzimas (*BamHI* y *Xho I*) (Invitrogen), 5 µl de amortiguador “Fast Digest” y 33 µl de agua estéril. La mezcla se incubó por 2 horas a 37 °C y el volumen total de la digestión se analizó por electroforesis en geles de agarosa al 1 %.

### **6.8 Purificación del DNA a partir de geles de agarosa**

Las bandas correspondientes a los fragmentos ya digeridos se purificaron por el método de *Qiaquick Gel Extraction Kit* (Qiagen). Los fragmentos de DNA se cortaron del gel de agarosa y se pesaron dentro de un tubo eppendorf de 1.5 ml. Posteriormente, se agregaron tres volúmenes de amortiguador QG (5.5 M tiocianato de guanidina, 20 mM Tris-HCl, pH 6.6) por cada volumen de gel y las muestras se incubaron a 50°C por 10 min para disolver la agarosa. Después, se agregó un volumen igual de isopropanol frío, se mezcló y se pasó a una columna *Qiaquick spin column* (Qiagen), para inmediatamente centrifugar durante 60 segundos a 18000 x g. La columna se lavó con 0.5 ml de amortiguador QG, se centrifugó en las mismas condiciones, se agregaron 0.75 ml de amortiguador PE (20 mM NaCl, 2 mM Tris-HCl, pH 7.5, etanol 80%) para lavar la columna y se repitió la centrifugación una vez más para remover el excedente de etanol y amortiguador PE. Finalmente, el DNA se eluyó con 50 µl de agua estéril mediante centrifugación a 18000 x g, se cuantificó por espectrometría a 260/280 nm y se almacenó a -20°C hasta su uso.

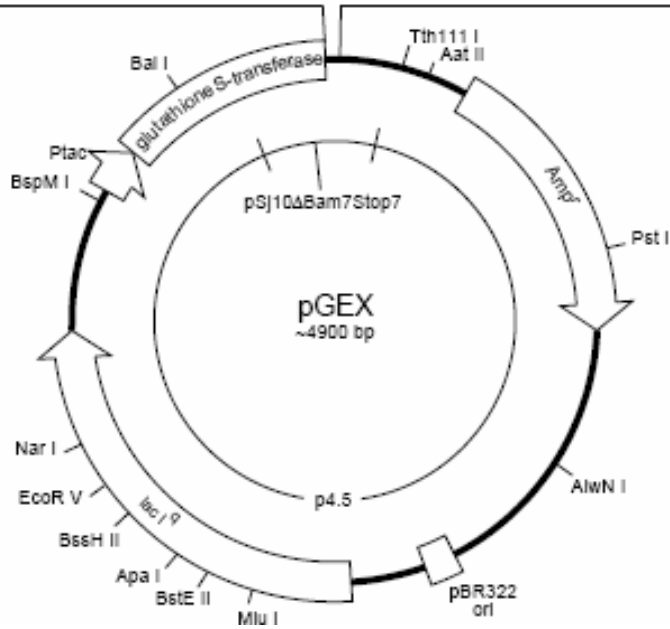


**pGEX-6P-1 (27-4597-01)**

PreScission™ Protease

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

BamH I      EcoR I      Sma I      Sal I      Xho I      Not I



**Fig. 7 Vector pGEX-6P-1.** Mapa del vector utilizado para la clonación de las EhPRMT's seleccionadas. Los sitios de restricción utilizados para insertar los productos de interés fueron los de las enzimas *BamH1* y *Xho1*. (Addgene Vector Database).

## 6.9 Ligación

Los fragmentos de DNA digeridos y purificados, tanto de los fragmentos, como del plásmido *pGEX-6P-1*, se ligaron en una proporción de 1:3 (vector: inserto). Las mezclas de ligación se llevaron a un volumen final de 10 - 15  $\mu$ l, conteniendo 50 ng del plásmido *pGEX-6P-1-BamH I/Xho I*, la cantidad necesaria del inserto para tener la relación molar adecuada, 1  $\mu$ l (100 unidades) de la enzima T4 DNA ligasa (Invitrogen), 2  $\mu$ l de amortiguador para T4 DNA Ligasa 5X (Invitrogen) y H<sub>2</sub>O para completar el volumen de reacción. La mezcla se incubó 18 horas a 16°C. Como control positivo de ligación se incluyeron al plásmido digerido con una sola enzima de restricción sin inserto y como control negativo al plásmido digerido con las dos enzimas sin inserto.

## 6.10 Preparación de bacterias competentes de *E. coli DH5 $\alpha$* y *BL21*

Una colonia de bacterias *DH5 $\alpha$*  o *BL21* se creció en 5 ml de medio LB a 37° C, con agitación constante durante 16-18 horas. Posteriormente 500  $\mu$ l de ese cultivo se inocularon en 40 ml de medio LB y se incubaron a 37° C con agitación de 180 rpm, hasta que las células alcanzaban una densidad óptica (DO) de 0.4 a 0.5, a 600 nm. El cultivo se colectó en tubos y se mantuvo en hielo por 10-15 minutos. Posteriormente, las células se cosecharon por centrifugación a 800 x g por 5 min a 4°C, y la pastilla se resuspendió en 20 ml de CaCl<sub>2</sub> 50 mM frío y se dejó por 20 minutos a 4°C. Posteriormente, la mezcla se centrifugó nuevamente a 800 x g por 5 min a 4 °C y se resuspendió en 4 ml de CaCl<sub>2</sub> 50 mM frío. Las células se almacenaron a 4°C hasta por una semana, o en alícuotas conteniendo 15% de glicerol a -70°C hasta su uso.

## 6.11 Transformación de células competentes

Para la transformación se utilizaron 200  $\mu$ l de células competentes, se añadió 5  $\mu$ l de la reacción de ligación y se dejó la mezcla en hielo por 30 minutos. Posteriormente, se sometieron a choque térmico a 42°C durante 90 segundos e inmediatamente se incubaron de nuevo en hielo por 3 minutos. Al término de este

tiempo, se agregaron 500 µl de medio LB y las células se incubaron en agitación constante (250 rpm), durante 1 hora a 37 °C para su recuperación. Después de la incubación, las células se sembraron en cajas de Petri con medio LB-agar adicionado con ampicilina (100 µg/ml) y se incubaron durante toda la noche a 37 °C. Para comprobar la clonación de los genes, las bacterias candidato se crecieron en medio LB adicionado con ampicilina, de ellas se extrajo el DNA plasmídico mediante mini Prep, el cual se sometió a digestión con las enzimas BamH1 y Xho1 y finalmente los productos de digestión se analizaron mediante electroforesis en geles de agarosa.

### **6.12 Inducción de las proteínas EhPRMT's recombinantes**

Una vez clonados los genes de las EhPRMT's en el vector de expresión *pGEX-6P-1*, se procedió a expresar las proteínas recombinantes. Esta expresión está bajo el control del promotor *tac*, que es inducido por isopropil-β-D-1-tio-galactopiranosido (IPTG). Para la expresión de las proteínas recombinantes se utilizó la cepa *E. coli BL21*. La inducción de las proteínas recombinantes se realizó siguiendo las instrucciones del fabricante para el vector *pGEX-6P-1* (Amersham Biosciences). Para todos los casos se sembró una colonia previamente transformada con el plásmido de interés en 10 ml de medio LB con ampicilina (100 µg/ml) y se crecieron en una incubadora con agitación orbital (*Lab-Line<sup>R</sup> Incubator-Shaker*) a 37°C y 180 rpm por 16 horas. El preinóculo se adicionó a 100-200 ml de medio LB (cultivo masivo), se dejó crecer hasta una DO de 0.4 -0.8 a 600 nm y la inducción se realizó con la adición de 1 mM de IPTG, durante 5 horas a 30 °C. La sobre-expresión de las proteínas recombinantes se verificó mediante electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) teñidos con azul de Coomassie y ensayos de Western blot utilizando un anticuerpo específico contra la etiqueta de GST adicionada por el vector en el extremo C-terminal de las proteínas.

### **6.13 Análisis de la solubilidad de las proteínas recombinantes**

Para el análisis de la solubilidad de las proteínas recombinantes, se utilizaron 100 ml de bacterias *BL21* que expresaban las proteínas recombinantes. Las bacterias se centrifugaron a 10000 x g por 5 minutos, la pastilla se resuspendió en 2.5 ml de amortiguador de lisis (Tris-HCl 20 mM pH 8.0, EDTA 2 mM, NaCl 100 mM y 1 mM PMSF), se le agregó lisozima a una concentración final de 1 mg/ml y se incubó por una hora a 4 °C. Posteriormente, la mezcla se sometió a sonicación en frío (sonicador ultrasónico de punta *Vibra-Cell Sonics<sup>R</sup>*), por cinco veces, con intervalos de 30 segundos a una amplitud de 60 watts. El lisado celular se centrifugó a 12000 x g por 20 minutos a 4°C, para separar la fracción soluble y la insoluble. Se tomó una alícuota de 100 µl de cada fracción a la que se agregaron 20 µl de amortiguador de muestra 5X (tris pH 6.8, SDS 10%, glicerol 87% y azul de bromofenol 2%) y se analizaron por electroforesis en geles de poliacrilamida SDS-PAGE teñidos con azul de Coomassie (Azul de Coomassie R-250 al 0.025%, metanol 40% y ácido acético 70%).

### **6.14 Purificación de las proteínas recombinantes EhPRMT's por perlas de glutatión-sefarosa**

El plásmido *pGEX-6P-1* posee una secuencia líder que codifica para la enzima Glutathion-S-transferasa (GST), fusionada a los genes clonados. De esta forma se expresaron las proteínas EhPRMT5 y EhPRMT-A fusionadas a GST que se purificaron por cromatografía de afinidad en una matriz de glutatión-sefarosa (GE Healthcare). A partir de bacterias *BL21* transformadas con *pGEX-6P-1/Ehprmt5* o *pGEX-6P-1/Ehprmt-A*, se preparó un preinóculo de 10 ml y se agregó a 200 ml de medio LB más ampicilina (50 µg/ml). Las bacterias se incubaron en agitación (180 rpm), a 37 °C hasta alcanzar una DO de 0.5-0.8 a 600 nm. A continuación, se adicionó al cultivo IPTG a una concentración final de 1 mM y se incubó durante 5 horas a 30 °C. Posteriormente, se cosecharon las células a 1000 x g por 15 min a 4 °C, se desechó el sobrenadante y a la pastilla se le adicionó lisozima (10 mg/ml), dejándola de 15 minutos a 1 hora en hielo. Trascorrido el tiempo se adicionó ditiotreitól (100mM), se mezcló por inversión y se incubó en hielo por otros 10

minutos. Después, se adicionó sarcosil 2 %, se mezcló y se sometió a sonicación cinco veces con intervalos de 30 segundos a una amplitud de 60 watts. El lisado celular se centrifugó a 7000 x g por 15 min a 4 °C, el sobrenadante se transfirió a un tubo Falcon de 50 ml nuevo, se le agregó Triton X-100 al 2 % y las perlas de Glutación Sepharosa 4B previamente lavadas con el amortiguador PBS 1X en una proporción correspondiente al volumen final de cultivo e incubadas toda la noche a 4 °C. Posteriormente, la mezcla se centrifugó a 800 x g por 2 minutos a 4 °C, se eliminó el sobrenadante y las perlas se lavaron 10 veces con el amortiguador PBS 1X; en cada lavado se centrifugó a 800 x g por 2 min a 4°C. Una vez lavadas las perlas se incubaron con el amortiguador de elución (20 mM glutatión, 100 mM Tris-HCl pH 8 y 120 mM NaCl) en un volumen correspondiente al volumen final de cultivo para obtener una fracción con la proteína recombinante pura mediante separación de las perlas. La mezcla de perlas con el amortiguador de elución se incubó toda la noche a 4 °C. Para su análisis, se tomó una alícuota de 20 µl de la fracción purificada; además, las perlas se transfirieron a un tubo nuevo, a ambas fracciones se les agregó un volumen de amortiguador de muestra 5X, se hirvieron a 100 °C por 5 minutos y se centrifugaron a 10000 x g por 2 minutos. Las muestras se analizaron por SDS-PAGE al 12% teñidos con azul de Coomassie y por ensayos de Western blot utilizando el anticuerpo anti-GST.

### **6.15 Obtención de anticuerpos contra EhPRMT5 y EhPRMT-A**

Para poder obtener anticuerpos contra EhPRMT5 y EhPRMT-A se procedió a la inmunización de cada proteína recombinante en cinco ratones Balb/c de 4 a 5 semanas de edad. Se realizaron tres inmunizaciones con 150 µg de proteína recombinante utilizando adyuvante Titer Max (Sigma) en una proporción 1:1, con un tiempo entre cada inmunización de 21 días. El suero de los animales se obtuvo antes de cada inmunización para determinar mediante ensayos de Western blot el título de anticuerpos y la especificidad de los mismos.

### **6.16 Extracción de proteínas totales de *E. histolytica***

Para realizar el análisis de los anticuerpos obtenidos en los animales, se obtuvieron extractos totales amibianos. Los trofozoítos se cosecharon, se resuspendieron en PBS frío estéril y se agregó una mezcla de inhibidores de proteasas (Complete protease inhibitors Roche 2x, PMSF 2 mM, leupeptina 20  $\mu$ M, NEM 50 mM, PHMB 5 mM, E-64 10  $\mu$ M, Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> 2 mM, NaF 100 mM, Iodoacetamida 10 mM, Tris/HCl 50 mM). Posteriormente, la mezcla se congeló con nitrógeno líquido y se agitó en vórtex para lisar las células. Este proceso se repitió hasta que la muestra se descongeló por completo. Posteriormente, se tomó una alícuota para cuantificar la concentración de proteínas por el método colorimétrico de Bradford (Bradford, 1976) y se analizaron los extractos por electroforesis en SDS-PAGE 10% y con tinción de azul de Coomassie.

### **6.17 Electroforesis de proteínas**

La separación de proteínas se llevó a cabo mediante electroforesis SDS-PAGE. El gel separador se preparó con acrilamida 10%, Bis-acrilamida 0.9%, TrisHCl 1.5 M pH 8.8, SDS al 0.1 %, persulfato de amonio (PSA) al 0.1 % y 0.15% de TEMED. El gel concentrador se preparó con acrilamida 29%, Bis-acrilamida 0.9%, TrisHCl 1.5 M pH 6.8, SDS al 0.1 %, PSA al 0.1 % y 0.15% de TEMED. Como amortiguador de corrida se utilizó una solución con Tris 0.25 M, glicina 1.9 M y 0.1% de SDS. La electroforesis se realizó manteniendo un voltaje constante de 120 volts, por aproximadamente 2 horas. Los geles se tiñeron con azul de Coomassie, durante 15 minutos. Posteriormente, los geles se destiñeron con una solución de metanol al 5% y ácido acético al 7%.

### **6.18 Western blot**

Las proteínas separadas por electroforesis se transfirieron a membranas de nitrocelulosa (Bio-Rad) en una unidad de electrotransferencia (Bio-Rad). Las unidades se montaron a manera de sandwich en el siguiente orden: ánodo, esponja, papel filtro Whatman, gel de poliacrilamida, membrana de nitrocelulosa, papel filtro

Whatman, esponja y cátodo. La cámara se llenó con la solución de transferencia (Tris 0.025 M, glicina 0.190 M, metanol 10%, pH 8.3) fría y se colocó en hielo para transferir las proteínas a 350 mA por 2 horas. Después, la membrana de nitrocelulosa se tiñó con rojo de Ponceau (rojo de Ponceau 0.1% y ácido acético 1%), para verificar la presencia de las proteínas en la membrana. A continuación, la membrana se incubó con solución bloqueadora (PBS-Tween 0.5%, leche 5%) y para la inmuno-detección de las proteínas se utilizaron los anticuerpos contra las EhPRMTs obtenidos en ratón, diluidos en solución bloqueadora. La membrana se incubó toda la noche en agitación a 4 °C. Posteriormente se realizaron tres lavados de 15 minutos y tres de 5 minutos con PBS-Tween 0.5 %. Las membranas se incubaron con el anticuerpo secundario anti-IgG acoplado a peroxidasa, diluido 1:10,000 en solución bloqueadora, durante 1.5 h a temperatura ambiente. Al término de la incubación se realizaron los mismos lavados con PBS-Tween 0.5 %, como se describió anteriormente. La unión antígeno-anticuerpo se reveló por quimioluminiscencia (ECL, Amersham) y el resultado se guardó en el fotodocumentador Microchemi (DNR Bio-Imaging Systems).

### **6.19 Ensayo de actividad enzimática de las EhPRMT's**

Para demostrar la actividad enzimática de las EhPRMT's recombinantes se utilizó el kit *histone methyltransferase assay* (MERCK). Los ensayos se llevaron a cabo mediante el análisis de la incorporación de [<sup>3</sup>H] en histonas comerciales a partir de S-adenosil-L-metionina marcado con tritio ([<sup>3</sup>H]Adomet). Para ello, las proteínas recombinantes (1 µg) se incubaron con 4 µg de histonas de pollo (Millipore) y 0.25 µCi de [<sup>3</sup>H]Adomet (Perkin Elmer Life Sciences) en amortiguador HMT (50 mM Tris-HCl pH 8.0, 5% glicerol, 0.1 mM EDTA, 50 mM KCl, 1 mM DTT, 10 mM butirato de sodio) en presencia de un cóctel inhibidor de proteasas (Sigma), en un volumen de reacción de 30 µl. Las reacciones que se utilizaron como control se realizaron con una proteína no relacionada (lisozima) y sirvieron como referencia de la incorporación de [<sup>3</sup>H]. Después de una incubación de 45 minutos a 30 °C, el volumen total de cada reacción se colocó en filtros P81 (Whatman) y se secó al aire. Después, los filtros se lavaron tres veces en una solución de TCA al 10% por 5

minutos, se enjuagaron en etanol y de nuevo se secaron al aire. Finalmente, la radioactividad se registró en un contador de centelleo (Beckman LS 6500) en 4 ml de líquido de centelleo (Ready Safe, Beckman Coulter). Se realizaron además ensayos de Western blot después de realizar los ensayos *in vitro* con las mismas condiciones pero utilizando el sustrato Adomet sin marca radioactiva. Al término de la incubación, el volumen total de las reacciones se corrió en un gel de acrilamida, se electrotransfirió y se incubó con un anticuerpo comercial contra la marca de la dimetilación asimétrica de la arginina 3 de la histona 4 (H4R3me2) en una concentración 1:500, después se incubó con un anticuerpo secundario Anti-IgG de conejo acoplado a peroxidasa en una concentración 1:10000 y se reveló utilizando el protocolo anteriormente mencionado.

## **6.20 Ensayos de inmunofluorescencia y microscopía confocal**

A partir de un cultivo de trofozoítos en confluencia, las amibas se despegaron de la caja de cultivo al ser incubadas en hielo, se resuspendieron en un volumen de 2-3 ml de medio y posteriormente se colocaron en cajas de seis pozos, a las cuales previamente se les colocaron cubreobjetos estériles (300 µl por cubreobjeto) y se incubaron por 1 h a 37 °C para permitir la adherencia de las amibas al vidrio. Después, las células se fijaron y se permeabilizaron con metanol al 100% por 10 min, se lavaron dos veces con PBS 1X y se bloquearon con suero fetal bovino al 10% durante 1 h a 37°C. A continuación se agregaron los anticuerpos primarios (obtenidos de la inmunización de las proteínas recombinantes en los animales) y se incubaron a 4°C durante toda la noche. Después de lavarse con PBS tres veces, los cubreobjetos se incubaron con el anticuerpo secundario conjugado a FITC por 1.5 horas, se lavó de nuevo con PBS y posteriormente se incubaron con DAPI por 10 minutos para teñir los núcleos. Las muestras se montaron con 8 µl de VECTASHIELD (VECTOR laboratorios, Inc H-1000) en portaobjetos y se analizaron por microscopía confocal en un microscopio Zeiss LSM700 y analizadas con el programa ZEN 2012 (Zeiss).



## 7. Resultados

### 7.1 ANÁLISIS *in silico*

#### 7.1.1 Alineamiento de las histonas de humano y *E. histolytica*

Con el fin de encontrar los posibles sitios de metilación de histonas amibianas por EhPRMT5, se realizó el alineamiento entre las histonas H3 de amiba (3 variantes proporcionadas por la base de datos Amoebadb), las histonas H2A (2 variantes proporcionadas por la base de datos Amoebadb) y la histona H4 con sus similares en *Homo sapiens*, buscando los siguientes residuos de arginina: H2AR3, H3R2, H3R8 y H4R3, que se conoce son blancos de metilación por parte de la PRMT5 de humano (Wei *et al*, 2014).

El alineamiento se realizó en el programa Biology Workbench, donde se observó que EhH3 tiene conservadas las argininas 2 y 8 (Fig. 8A), en tanto que EhH4 cuenta con la arginina 3, pero ésta se encuentra movida a la posición 8 (Fig. 8B). En contraste, la arginina 3 en EhH2A se encuentra sustituida por un residuo de ácido glutámico en la proteína amibiana (Fig. 8C). Estos resultados sugieren que en las histonas amibianas, los residuos H3R2, H3R8 y H4R8 pueden ser susceptibles de metilación por EhPRMT5.

#### 7.1.2 Análisis de identidad de EhPRMT5 y EhPRMT-A

Al comparar las secuencia de EhPRMT5 con la de su homólogo en humano (HsPRMT5) se encontró que existe un porcentaje de identidad del 30% entre ellas. En cuanto a EhPRMT-A, debido a que no se conoce una proteína homóloga directa, se realizó el análisis con todas las PRMT's de humano, donde se encontró una mayor identidad con las PRMT's 1, 3, 6 y 8 (Tabla 1), todas ellas clasificadas como enzimas de tipo I (Wei *et al*, 2014).

### 7.1.3 Análisis de la presencia de sitios fosforilación conservados en enzimas de tipo I en las EhPRMT's

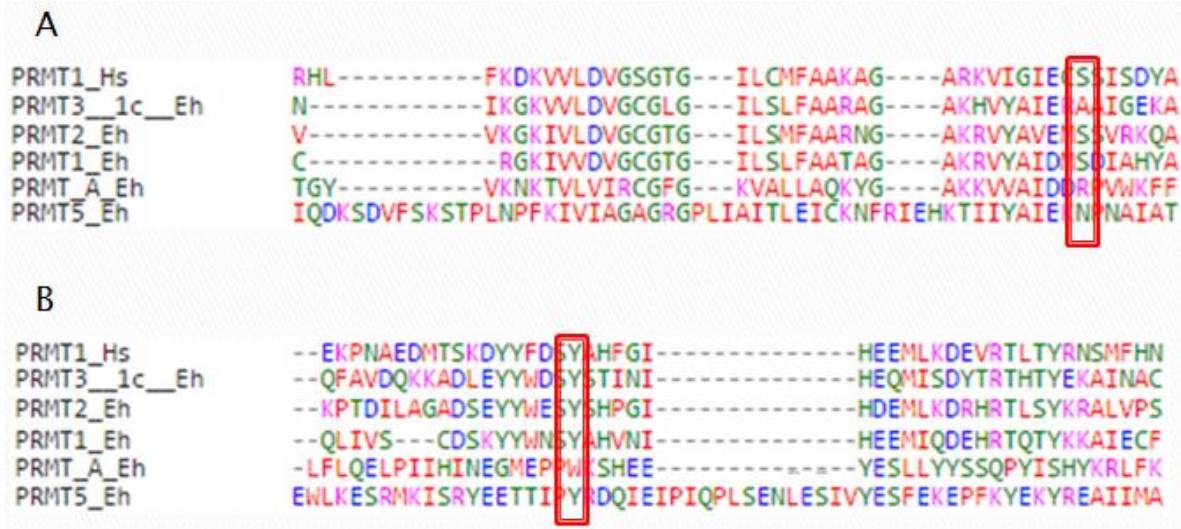
Las PRMT's de tipo I cuentan con dos aminoácidos conservados y que no se encuentran en las enzimas de tipo II, los cuales son una serina en la posición 217 (S217) y una tirosina en la posición 154 (Y154) (Feng *et al*, 2009). Con el objetivo de buscar estos aminoácidos en las PRMT's de amiba, se realizó el alineamiento de las cinco secuencias de las EhPRMT's (PRMT1a, PRMT1b, PRMT1c, PRMT5 y PRMT-A) con la de la PRMT1 de humano, una enzima característica de las PRMT's de tipo I. El alineamiento se realizó utilizando el programa Clustal W (Multiple Sequence Alignment) y se encontró que EhPRMT1a y 1b cuentan con S217 pero no así EhPRMT1c, EhPRMT5 y EhPRMT-A, las cuales tienen en su lugar una alanina, una asparagina y una arginina, respectivamente. En cuanto a Y154, se encontró que todas las EhPRMT1's y EhPRMT5 tienen este residuo conservado, mientras que en EhPRMT-A este aminoácido es sustituido por un residuo de triptófano (Fig. 9). La ausencia de esos dos aminoácidos en EhPRMT-A sugiere que a pesar de que EhPRMT-A muestra mayor identidad con enzimas de tipo I, esta proteína pudiera tener actividad de tipo II o tipo III.

**Tabla 1. Porcentaje de homología de EhPRMT-A con las PRMT's de humano.**

Enzima	Porcentaje de homología
PRMT1	18.5
PRMT2	13.3
PRMT3	18.5
PRMT4	15
PRMT5	11.1
PRMT6	15.5
PRMT7	10
PRMT8	20
PRMT9	3.5



**Fig. 8 Alineamiento de las histonas de amiba y humano.** Se realizó la comparación de secuencias de las histonas H3 (A), H4 (B) y H2A (C) de humano con las histonas correspondientes de *E. histolytica* para encontrar los residuos de arginina conservados que son potenciales blancos de metilación por parte de PRMT5 (rectángulos en rojo).



**Fig. 9 Búsqueda de residuos conservados de enzimas de tipo I en PRMT's de *Entamoeba histolytica*.** Se alinearon las secuencias de las 5 proteínas de amiba con HsPRMT1 para buscar los residuos conservados S217 (A) y Y154 (B), característicos de

PRMT's de tipo I. En los rectángulos en rojo se indica la posición de los aminoácidos analizados.

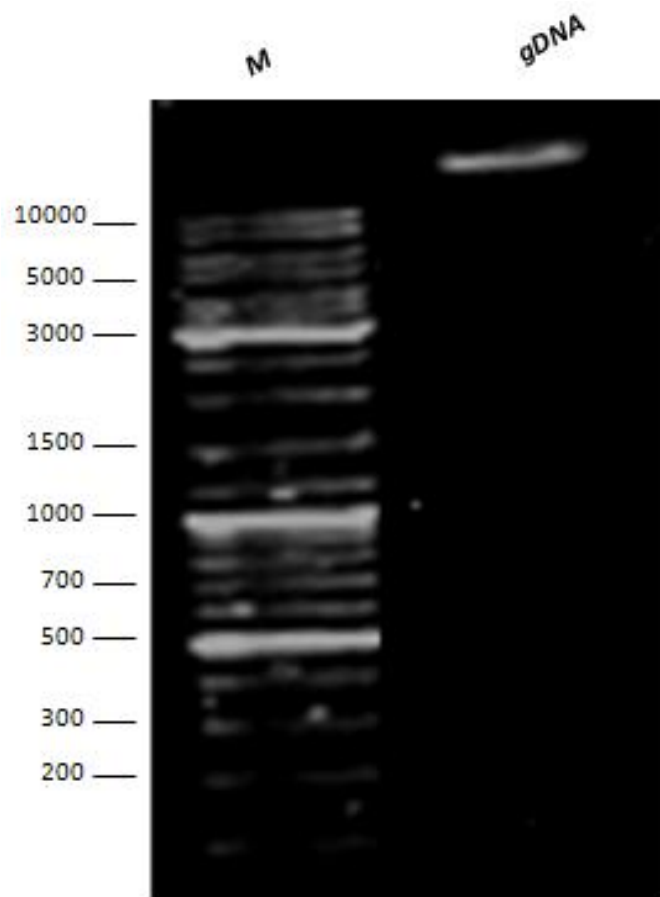
## **7.2 CLONACIÓN DE LOS GENES *Ehprmt5* y *Ehprmt-A***

### **7.2.1 Extracción de DNA genómico**

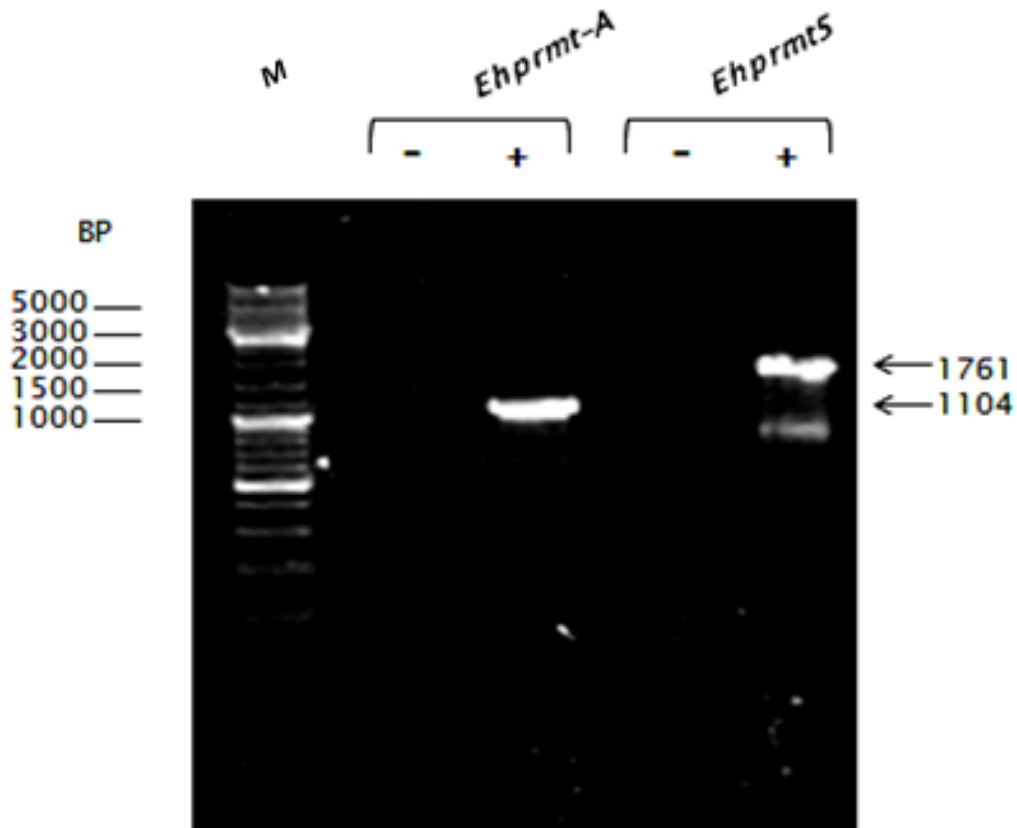
Para la clonación de los genes de interés, inicialmente se aisló el DNA genómico de los trofozoítos de *E. histolytica* utilizando el Wizard Genomic DNA Purification kit, debido a que los genes no tienen intrones en su secuencia. El análisis electroforético del DNA obtenido mostró una banda superior a 10 kilobases, (Fig. 10), sugiriendo el aislamiento de DNA genómico de alta integridad.

### **7.2.2 Amplificación de los genes *Ehprmt5* y *Ehprmt-A***

Una vez obtenido el DNA genómico se procedió a realizar la amplificación de los genes *Ehprmt5* y *Ehprmt-A* mediante PCR utilizando la enzima de alta fidelidad *Kapa HiFi Hot Start* para evitar inespecificidades o errores en la amplificación. Posteriormente, los productos de amplificación se analizaron mediante electroforesis en geles de agarosa al 1% teñidos con bromuro de etidio. En estos experimentos, aunque en las reacciones se observaron productos minoritarios de tamaño menor al esperado, se obtuvieron los amplificados en el tamaño esperado para cada gen, en donde *Ehprmt5* tiene un tamaño de 1761 pares de bases y *Ehprmt-A* un tamaño de 1104 pares de bases (Fig. 11).



**Fig. 10 Aislamiento de DNA genómico de *E. histolytica*:** El DNA genómico (gDNA, ~20 Mb) obtenido de los trofozoítos se analizó mediante electroforesis en geles de agarosa al 1% teñidos con bromuro de etidio. M, marcadores de tamaño.



**Fig. 11 Amplificación de los genes *Ehprmt5* y *Ehprmt-A*:** Los productos de amplificación utilizando cebadores específicos para *Ehprmt5* y *Ehprmt-A* se analizaron en gels de agarosa 1% teñidas con bromuro de etidio. M, marcados de tamaño. (-) Reacciones de PCR en ausencia de DNA molde. (+) Reacciones de PCR en presencia de DNA molde.

### **7.2.3 Digestión del vector de expresión *pGEX-6P-1* y de los amplificadores**

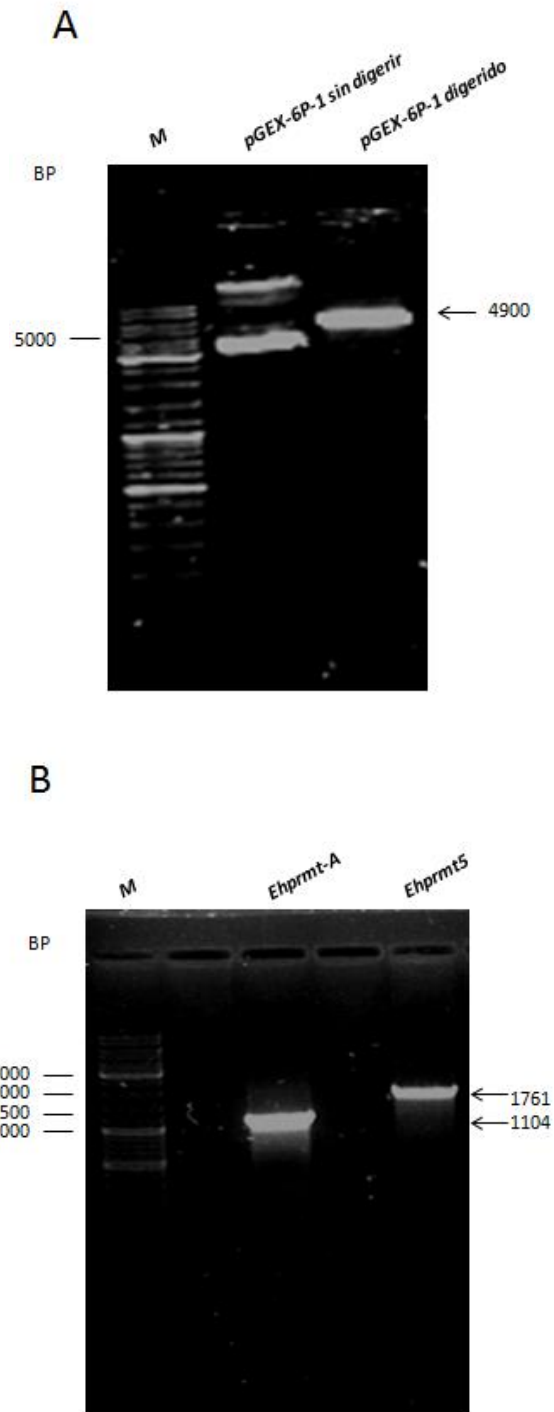
Después de obtener el vector de expresión *pGEX-6P-1* a partir de bacterias transformadas, éste así como los amplificadores de los genes *Ehprmt5* y *Ehprmt-A* se sometieron a doble digestión con las enzimas de restricción *BamHI* y *XhoI* y los productos se analizaron en geles de agarosa al 1% teñidos con bromuro de etidio. En estos ensayos se observaron bandas del tamaño esperado (4900 pb para el vector y 1761 y 1104 pb para los genes *Ehprmt5* y *Ehprmt-A*, respectivamente) (Fig. 12). Posteriormente las bandas se purificaron a partir de los geles de agarosa utilizando el kit *Qiaquick Gel Extraction* y se utilizaron para las reacciones de ligación con el objetivo de obtener las construcciones que posteriormente se transformaron en la cepa de expresión *E. coli* BL21.

### **7.2.4 Clonación en el vector de expresión *pGEX-6P-1***

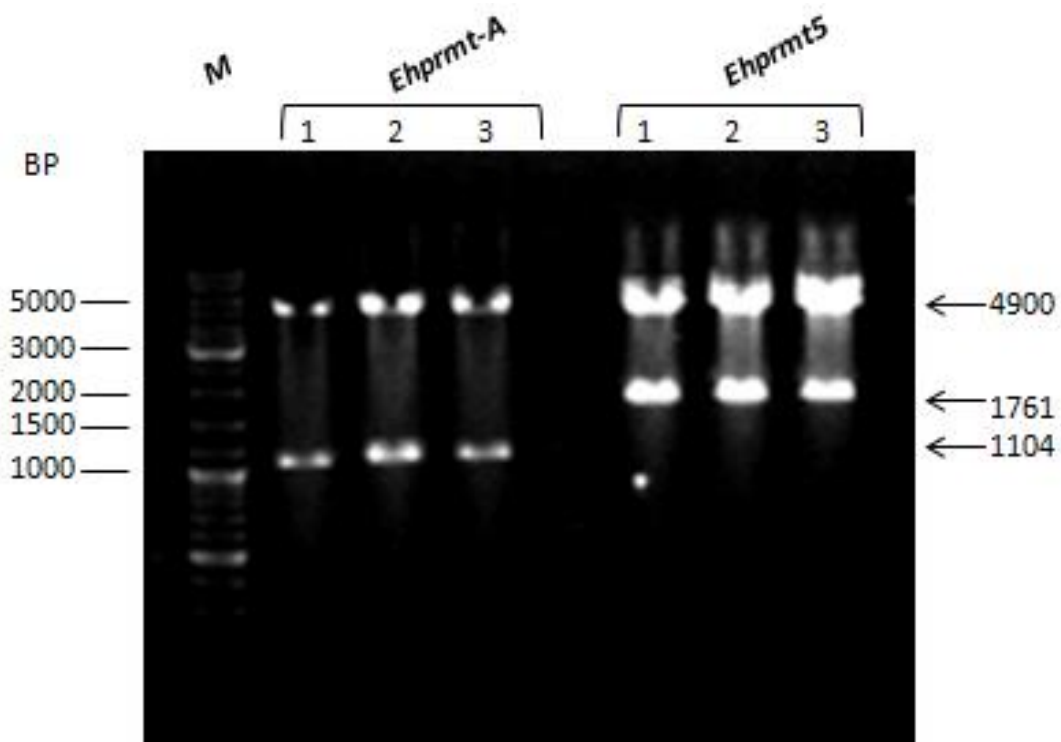
Después de purificar los fragmentos y el vector digeridos de los geles de agarosa, se procedió a realizar la ligación como se describe en la metodología. Posteriormente, las mezclas de reacción se utilizaron para transformar bacterias *E. coli* competentes de la cepa DH5 $\alpha$  y de algunas de las colonias resultantes se extrajo el DNA plasmídico para comprobar la clonación de los genes mediante reacciones de doble digestión enzimática y electroforesis en geles de agarosa al 1%. Al analizar tres construcciones para cada gen, se observaron las bandas correspondientes al vector y a cada uno de los insertos ligados con el tamaño esperado, corroborándose la inserción de los genes *Ehprmt5* y *Ehprmt-A* en el vector (Fig. 13).

Una vez realizadas las construcciones, se procedió a la transformación de bacterias competentes de *E. coli* de la cepa BL21 para la expresión de las proteínas recombinantes.





**Fig. 12 Análisis de la digestión del vector y de los amplificados con las enzimas BamH1 y Xho1:** El vector de expresión pGEX-6P-1 (A) y los amplificados de los genes *Ehprmt5* y *Ehprmt-A* (B) se sometieron a digestión con las enzimas BamH1 y Xho1 y los productos se analizaron en geles de agarosa teñidos con bromuro de etidio. M, marcadores de tamaño.

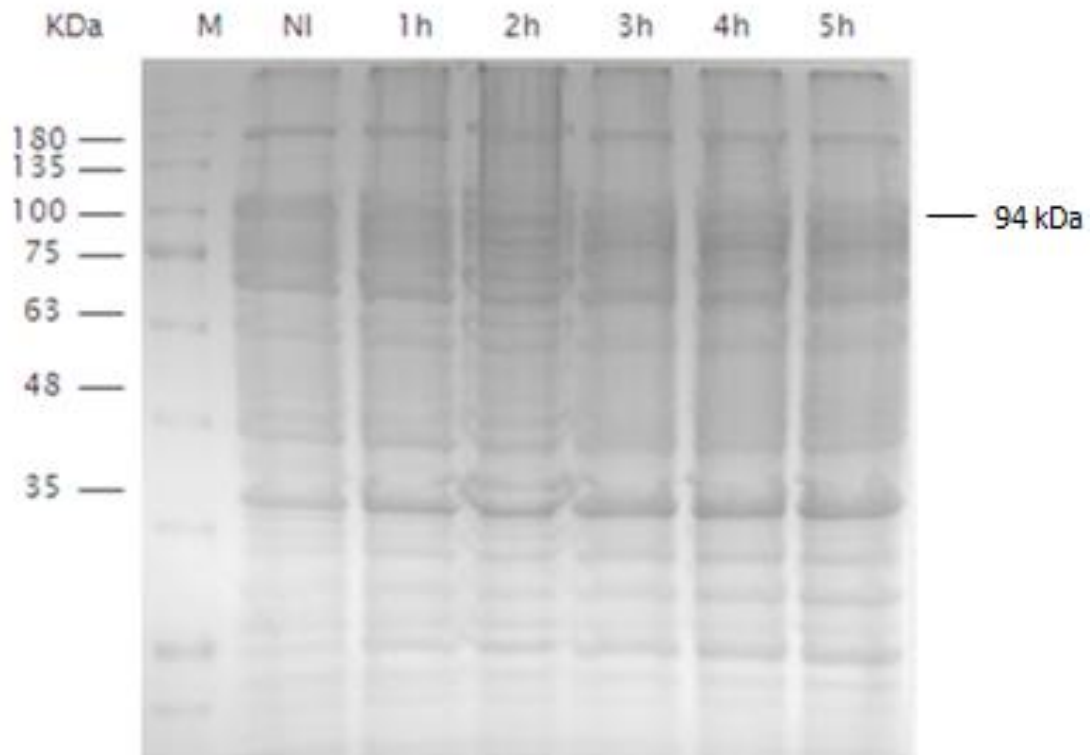


**Fig. 13 Clonación de los genes *Ehprmt5* y *Ehprmt-A*:** Después de realizar las reacciones de ligación con el plásmido pGEX-6P-1 y los amplificadores de los genes EhPRMT5 y EhPRMT-A se realizó la transformación de células *E. coli* de la cepa DH5 $\alpha$  y de tres colonias resultantes para cada gen se extrajo el DNA plasmídico para analizarlos mediante doble digestión y electroforesis en geles de agarosa al 1%. M: marcadores de tamaño.

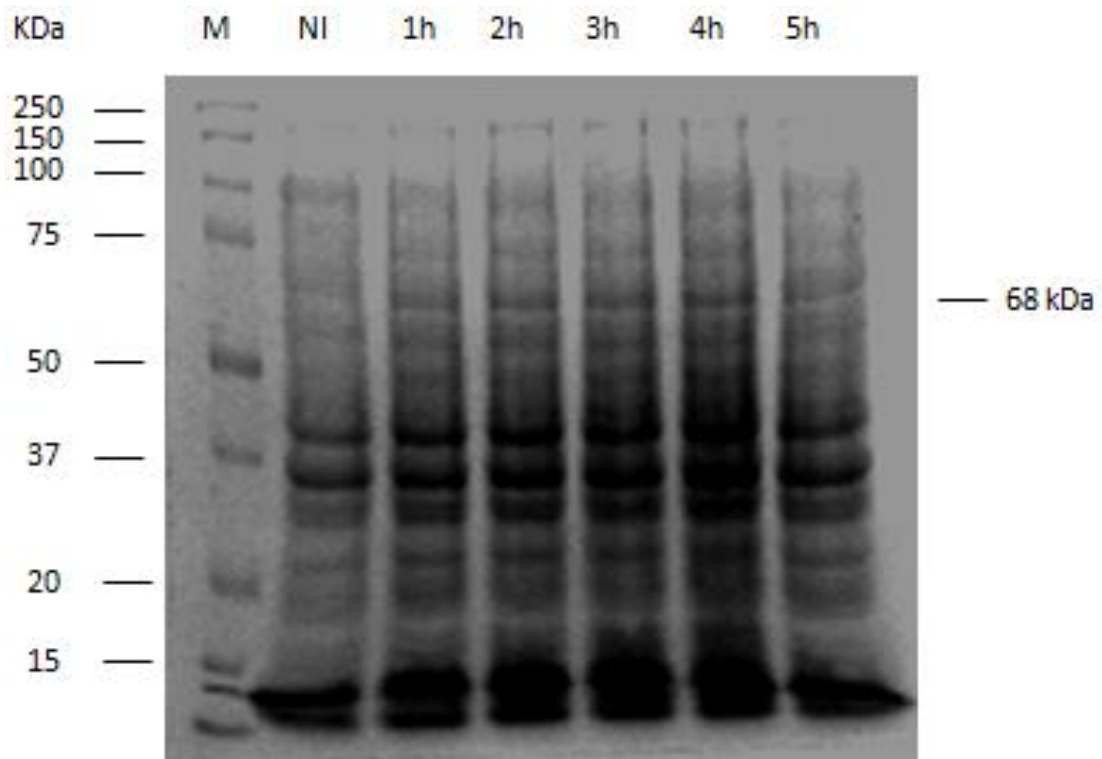
## 7.3 INDUCCION Y PURIFICACIÓN DE LAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES

### 7.3.1 Inducción de las proteínas recombinantes

Las células BL21 transformadas con las construcciones se crecieron en medio LB/ampicilina líquido por 18 horas a 37 °C. Al término de la incubación, una parte de este se adicionó a un volumen de 100 ml de medio LB/ampicilina y se pusieron a crecer en agitación constante hasta alcanzar la densidad óptica de 0.4 a 0.6 a 600 nm la cual se alcanzó en aproximadamente dos horas. Entonces, se tomó una alícuota que corresponde al cultivo no inducido, y al resto del cultivo se le agregó el inductor IPTG, se incubó a 37 °C con agitación y se tomó una alícuota del cultivo cada hora hasta llegar a 5 h. más. Posteriormente, se obtuvo el lisado de las bacterias y la inducción de las proteínas recombinantes se analizó mediante electroforesis en geles de poliacrilamida al 10% teñidos con azul de Coomassie. Para el caso del gen EhPRMT5 se observó la sobreexpresión de una proteína de 94 kDa a partir de 2 h de incubación con el IPTG, teniendo una expresión máxima a las 4 y 5 h (Fig. 14). Esta proteína tiene el peso esperado para la proteína recombinante, correspondiente a 68 kDa de EhPRMT5 y 26 kDa de la etiqueta de GST. Por otra parte, en las bacterias transformadas con la construcción conteniendo el gen *Ehprmt-A* e incubadas con IPTG se puede observar la sobreexpresión de una proteína de 68 kDa (Fig. 15), correspondientes a 42 kDa de EhPRMT-A y 26 kDa de GST. La inducción de EhPRMT-A se observó a partir de 1 h de incubación con IPTG con un máximo de expresión a las 4 h (Fig. 15). Estos resultados sugieren la correcta expresión de las proteínas de interés.



**Fig. 14 Inducción de la proteína recombinante EhPRMT5:** Bacterias *E. coli*, cepa BL21, se transformaron con la construcción pGEX-6P-1/Ehprmt5. Para la inducción de la proteína las bacterias se incubaron con 1 mM de IPTG durante 1 a 5 h. Finalmente, se obtuvieron los extractos totales de las bacterias y la expresión de la proteína recombinante se analizó en geles de poliacrilamida al 10% teñidos con azul de Coomassie. M: marcadores de peso molecular. NI extracto de bacterias no inducidas.

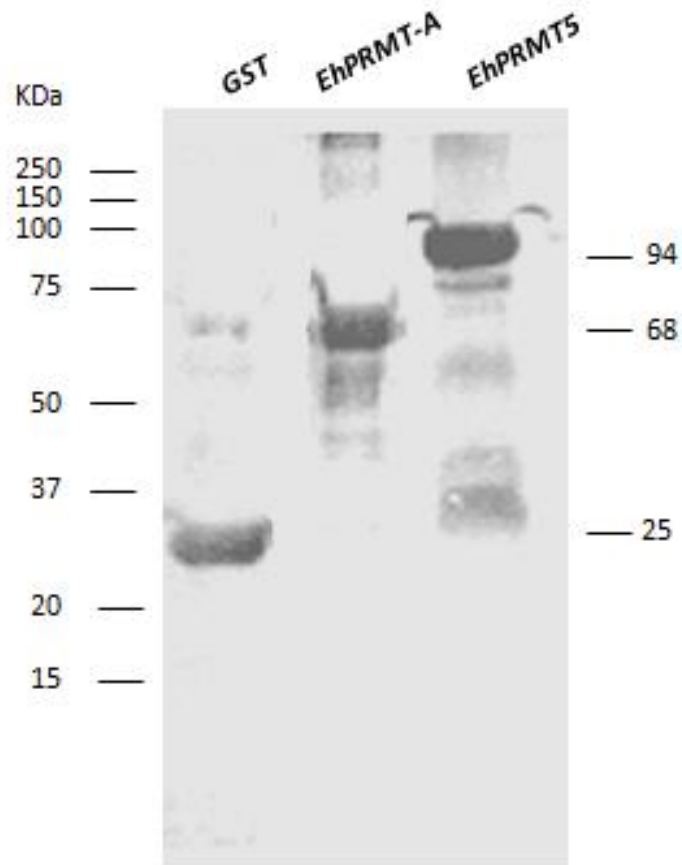


**Fig. 15 Inducción de la proteína recombinante EhPRMT-A:** Bacterias *E. coli*, cepa BL21, se transformaron con la construcción pGEX-6P-1/*Ehprmt5*. Para la inducción de la proteína las bacterias se incubaron con 1 mM de IPTG durante 1 a 5 h. Finalmente, se obtuvieron los extractos totales de las bacterias y la expresión de la proteína recombinante se analizó en geles de poliacrilamida al 10% teñidos con azul de Coomassie. M: marcadores de peso molecular. NI extracto de bacterias no inducidas.

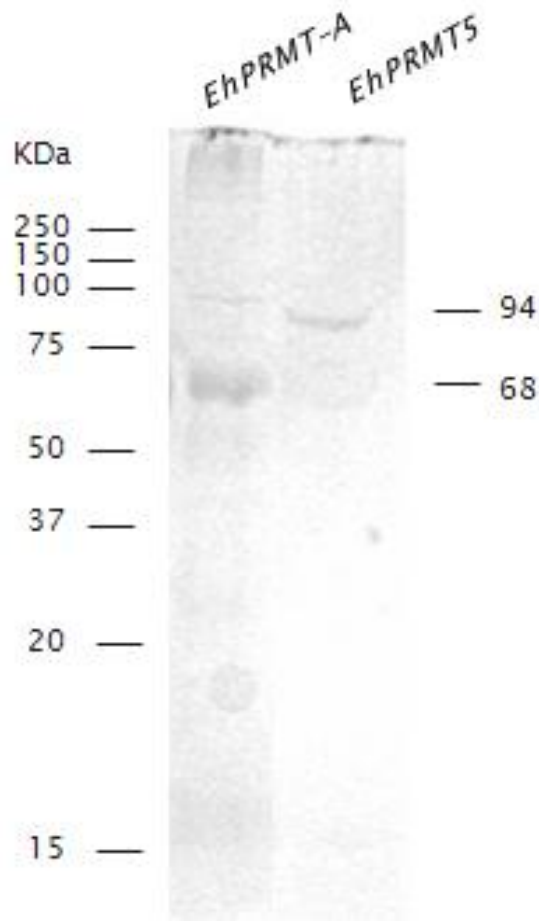
Para comprobar la correcta expresión de las proteínas se realizó la identificación de la etiqueta de GST fusionada a EhPRMT-A y EhPRMT5 mediante ensayos Western blot utilizando un anticuerpo comercial anti-GST. En esos experimentos se observó el reconocimiento por el anticuerpo de la proteína GST en extractos de bacterias transformadas con el vector vacío inducidas con IPTG (control positivo), así como de las proteínas de 94 y 68 kDa en bacterias transformadas con los plásmidos conteniendo los genes *Ehprmt5* y *Ehprmt-A* e incubadas con IPTG (Fig. 16). Con estos ensayos se comprobó la identidad de las proteínas recombinantes, su expresión y la disponibilidad de ambas para su purificación por afinidad a perlas de glutatión.

### **7.3.2 Purificación de las proteínas recombinantes**

Una vez comprobada la inducción de las proteínas recombinantes EhPRMT5 y EhPRMT-A, se hicieron cultivos masivos de 200 ml utilizando el procedimiento anterior para purificar las proteínas recombinantes. Una vez realizada la inducción, se procedió a realizar la lisis de las células para obtener la fracción soluble del paquete celular. La purificación se llevó a cabo mediante cromatografía de afinidad con perlas de glutatión-sefarosa. Después de la incubación de la fracción soluble con las perlas toda la noche y de la elución de las proteínas unidas a las perlas, se tomó una alícuota de cada fracción de purificación para su análisis por electroforesis SDS-PAGE al 10%. En estos ensayos se obtuvieron las proteínas recombinantes de 94 y 68 kDa (Fig. 17). Posteriormente, las fracciones purificadas se analizaron de igual manera por Western blot, utilizando los anticuerpos anti-GST, observándose la detección de ambas proteínas recombinantes en los pesos esperados (Fig. 18).

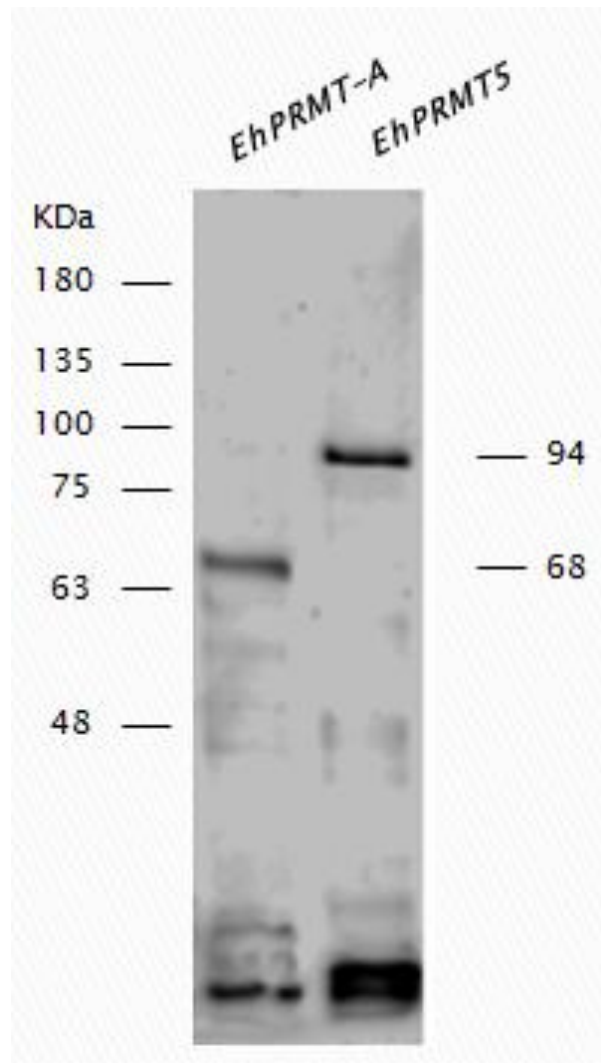


**Fig. 16 Western blot de las proteínas recombinantes EhPRMT-A y EhPRMT5:** Extractos de bacterias transformadas con el vector vacío portador de la etiqueta de GST o con el plásmido conteniendo los genes *Ehprmt5* y *Ehprmt-A* se sometieron a ensayos de Western blot utilizando un anticuerpo comercial anti-GST de cabra 1:5000, anticuerpo secundario anti-IgG de cabra 1:2000 y revelado mediante quimioluminiscencia con ECL.



**Fig. 17 Purificación de las proteínas recombinantes:** Para la purificación de las proteínas recombinantes, la fracción soluble de extractos de bacterias transformadas con los plásmidos conteniendo los genes *Ehprmt5* y *EhPRMT-A* e inducidas con IPTG se incubaron con perlas de glutatión-sefarosa. Después de lavados exhaustivos las proteínas obtenidas por la cromatografía de afinidad se eluyeron y se analizaron en geles de acrilamida SDS-PAGE al 12% teñidos con azul de Coomassie.





**Fig. 18 Western blot de las proteínas purificadas:** Las proteínas purificadas de la columna de afinidad se sometieron a ensayos de Western blot utilizando el anticuerpo anti-GST de cabra 1:5000, anticuerpo secundario anti-IgG de cabra 1:2000 y revelado mediante quimioluminiscencia utilizando ECL.

## 7.4 OBTENCIÓN DE ANTICUERPOS CONTRA LAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES

### 7.4.1 Obtención de anticuerpos contra EhPRMT-A y EhPRMT5

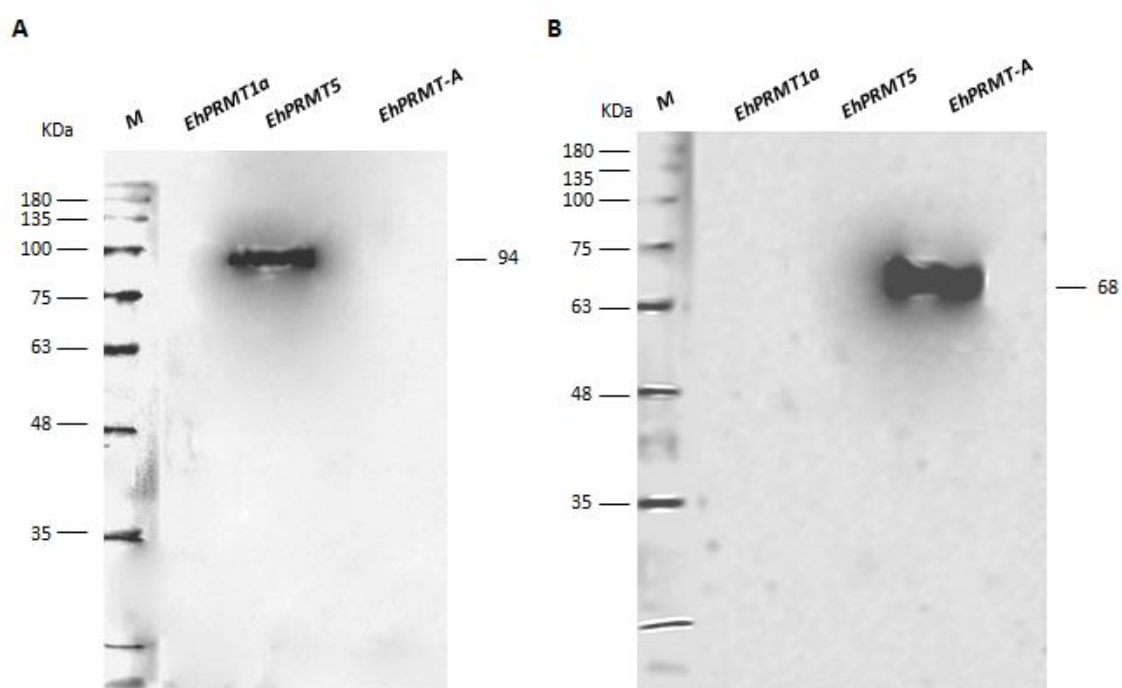
Después de obtener las proteínas recombinantes purificadas, se llevó a cabo la inmunización de animales para obtener anticuerpos contra ellas. Se inmunizaron cuatro ratones con la proteína recombinante EhPRMT5 y cinco ratones con la proteína EhPRMT-A con el esquema de inmunización que se muestra en la tabla 2.

Posteriormente, para verificar la especificidad de los anticuerpos, se procedió a realizar ensayos de Western blot sobre las proteínas recombinantes EhPRMT1a (Borbolla-Vázquez et al, 2015), EhPRMT5 y EhPRMT-A, utilizando los anticuerpos obtenidos contra las proteínas EhPRMT5 y EhPRMT-A. En esos experimentos observamos que ambos anticuerpos fueron específicos para cada proteína, es decir, los anticuerpos solo reconocieron la proteína recombinante a la que están dirigidos (Fig. 19A, B).

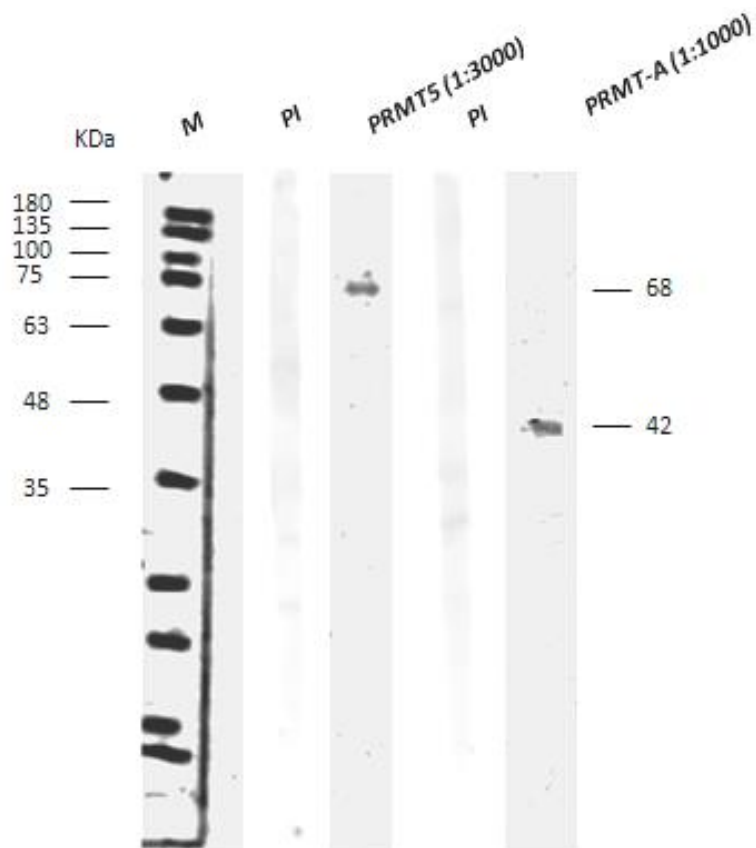
Una vez comprobada la especificidad de los anticuerpos, se analizó el reconocimiento de estos anticuerpos en extractos totales de trofozoítos de *E. histolytica*. Los resultados mostraron que el anticuerpo contra EhPRMT5 reconoció una sola banda de 68 kDa, mientras que el anticuerpo contra EhPRMT-A identificó una sola banda de 42 kDa (Fig. 20). Ambos pesos moleculares corresponden con los esperados para las proteínas nativas, indicando que los anticuerpos son altamente específicos y que ambas metil-transferasas se expresan a nivel proteico en los trofozoítos amibianos.

**Tabla 2.** Esquema de inmunización utilizado para la obtención de anticuerpos en contra de las proteínas EhPRMT5 y EhPRMT-A.

Antígeno	Animal	Cantidad (µg)	Adyuvante	Nº inmunizaciones	Intervalos
EhPRMT5	Ratón	150	Titer Max	3	21 días
EhPRMT-A	Ratón	150	Gold 1:1 (Sigma)	3	21 días



**Fig. 19 Reconocimiento de las proteínas recombinantes por los anticuerpos obtenidos:** Las proteínas recombinantes EhPRMT1a, EhPRMT5 y EhPRMT-A se purificaron mediante cromatografía de afinidad y se sometieron a ensayos de Western blot. (A) Western blot utilizando anticuerpo obtenido en ratón (1:1000) contra EhPRMT5. (B) Western blot utilizando anticuerpo obtenido en ratón (1:1000) contra EhPRMT-A. Se utilizó como anticuerpo secundario anti-IgG de ratón 1:20000 y revelado por quimioluminiscencia utilizando ECL. M: Marcador de peso molecular.



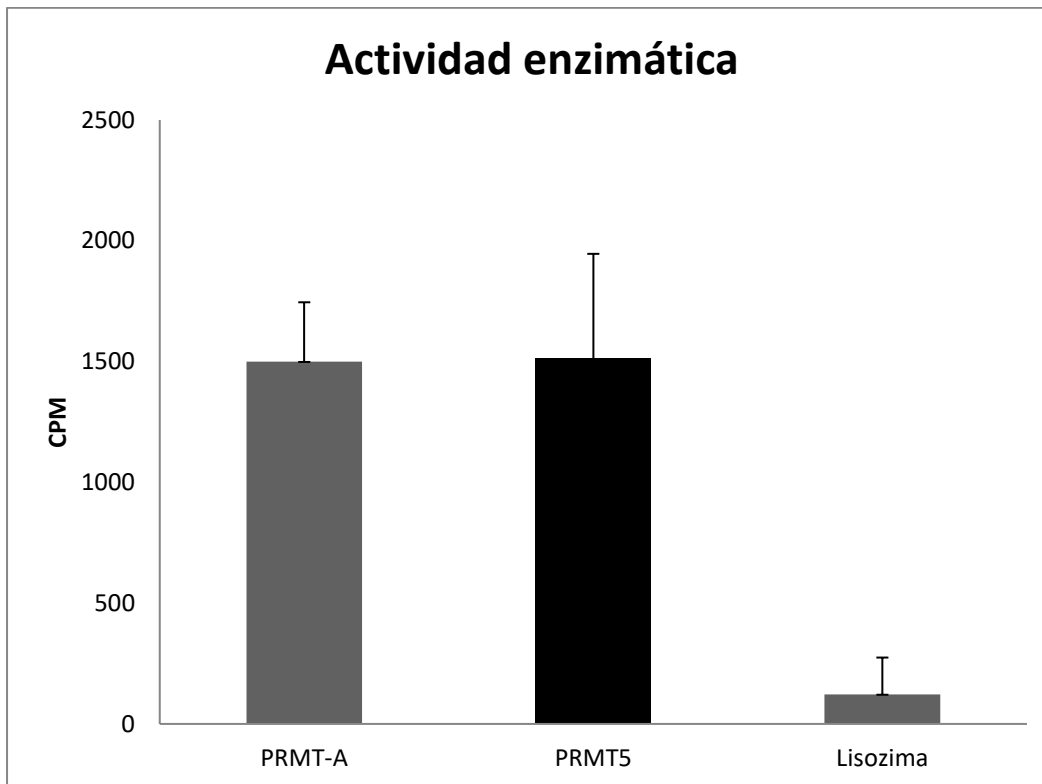
**Fig. 20 Western blot en extractos de *E. histolytica*:** Los extractos totales de trofozoítos de *E. histolytica* se sometieron a ensayos de Western blot utilizando los anticuerpos obtenidos en ratón contra EhPRMT5 y EhPRMT-A. Se utilizó como anticuerpo secundario anti-IgG de ratón 1:20000 y revelado por quimioluminiscencia utilizando ECL. PI: suero preimmune. Entre paréntesis se indica la dilución de los anticuerpos.

## 7.5 ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE LAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES

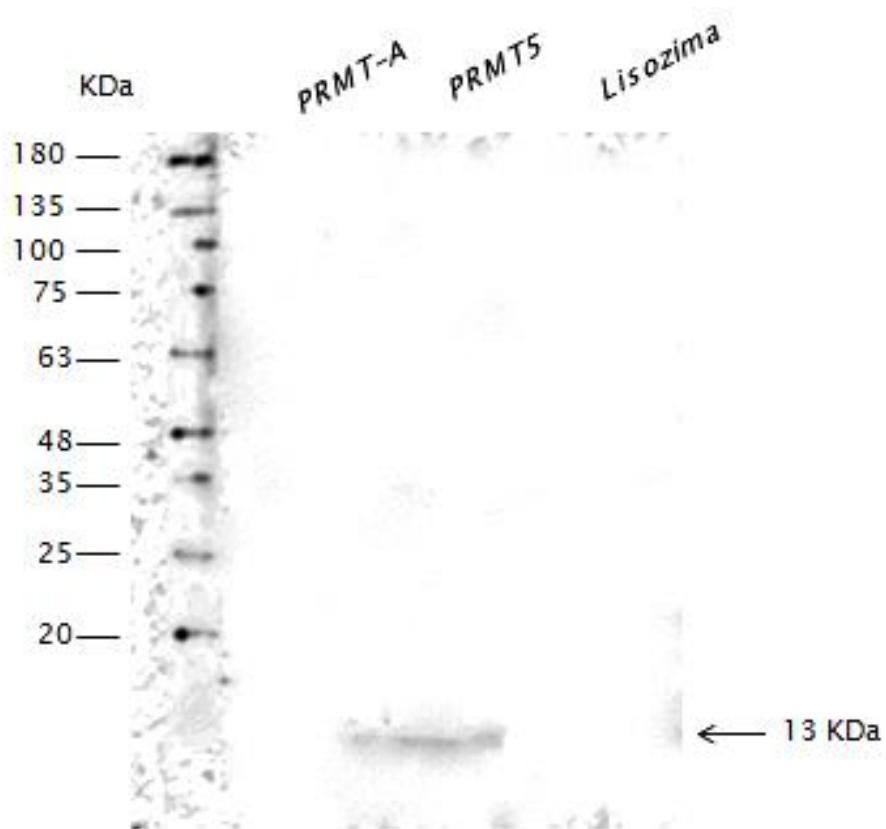
### 7.5.1 Actividad enzimática de las proteínas EhPRMT5 y EhPRMT-A sobre histonas comerciales

Para confirmar la actividad de metil-transferasa, las proteínas recombinantes purificadas (1 µg/µl) se utilizaron para determinar su actividad enzimática *in vitro* utilizando histonas comerciales de pollo como sustrato y el donador S-adenosil metionina acoplado a tritio ([<sup>3</sup>H]Adomet). Como sustrato no relacionado usado como control negativo de incorporación de marca radioactiva se utilizó la lisozima en una concentración de 1 µg/µl. En estos ensayos se observó la transferencia de los grupos metilo del Adomet a las histonas de pollo (aproximadamente 1500 cpm), mientras que la lisozima presentó una actividad menor más de 10 veces (aproximadamente 120 cpm) (Fig. 21). Estos resultados indican que, al menos *in vitro*, las proteínas EhPRMT5 y EhPRMT-A tienen actividad de metil-transferasas de histonas.

Una vez analizada la actividad *in vitro* de las proteínas, se realizaron ensayos de Western blot con las reacciones enzimáticas donde se utilizó el Adomet sin marca radioactiva, es decir, una vez realizados los ensayos *in vitro*, se corrió la muestra en un gel de acrilamida SDS-PAGE, se electrotransfirió y se incubó la membrana de nitrocelulosa con el anticuerpo contra la marca epigenética H4R3me2. En estos ensayos se observó el reconocimiento de la banda correspondiente a la histona H4 en las reacciones donde se utilizó a la enzima EhPRMT5, pero no en las reacciones donde se utilizó a EhPRMT-A o el control de lisozima (Fig. 22), confirmándose que el residuo 3 de la histona H4 es un blanco de EhPRMT5, lo que apoya la hipótesis de que EhPRMT5 es un ortólogo de la enzima PRMT5 de otros organismos.



**Fig. 21 Actividad de metil-transferasa de histonas de las proteínas recombinantes:** Las proteínas recombinantes EhPRMT-A y EhPRMT5, así como la lisozima (control negativo) se incubaron con histonas comerciales de pollo en presencia de [<sup>3</sup>H]Adomet y posteriormente se midió la transferencia de los grupos metilo radiactivos a las histonas. Los resultados se expresaron como la media ± la desviación estándar de tres experimentos independientes realizados por duplicado. CPM: cuentas por minuto.



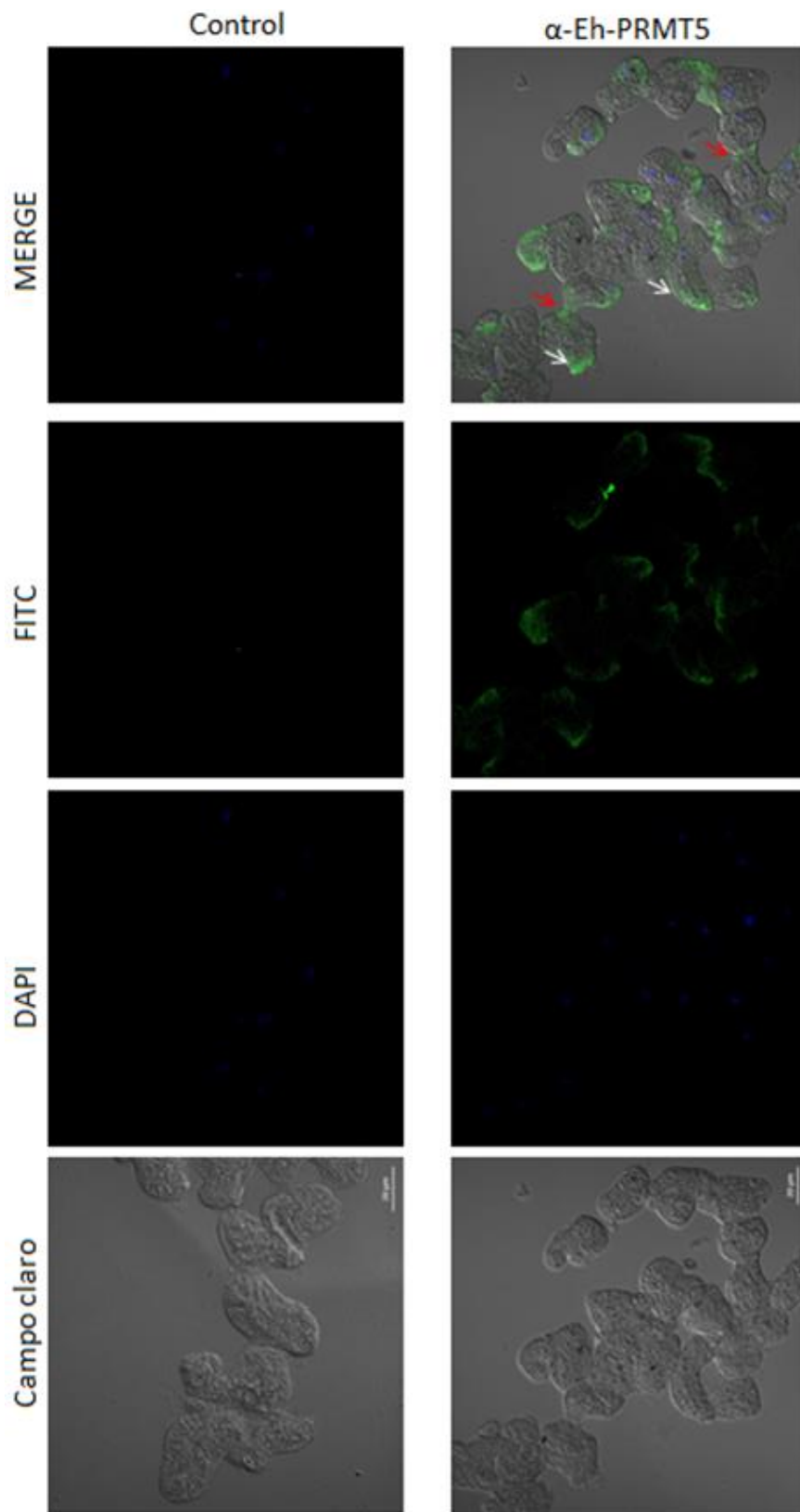
**Fig. 22 Western blot con el anticuerpo anti-H34R3me2:** Se realizaron los ensayos de actividad enzimática *in vitro* de las proteínas EhPRMT5, EhPRMT-A y lisozima (control negativo) utilizando Adomet sin marca radioactiva. Posteriormente los productos de la reacción se sometieron a ensayos de western blot utilizando un anticuerpo que reconoce la dimetilación del residuo de arginina en posición 3 de la histona H4 (H4R3me2; flecha) de conejo 1:500. Como anticuerpo secundario se utilizó anti-IgG de conejo 1:2000 y revelado por quimioluminiscencia utilizando ECL.

## 7.6 INMUNOLocalIZACIÓN DE EhPRMT5 Y EhPRMT-A

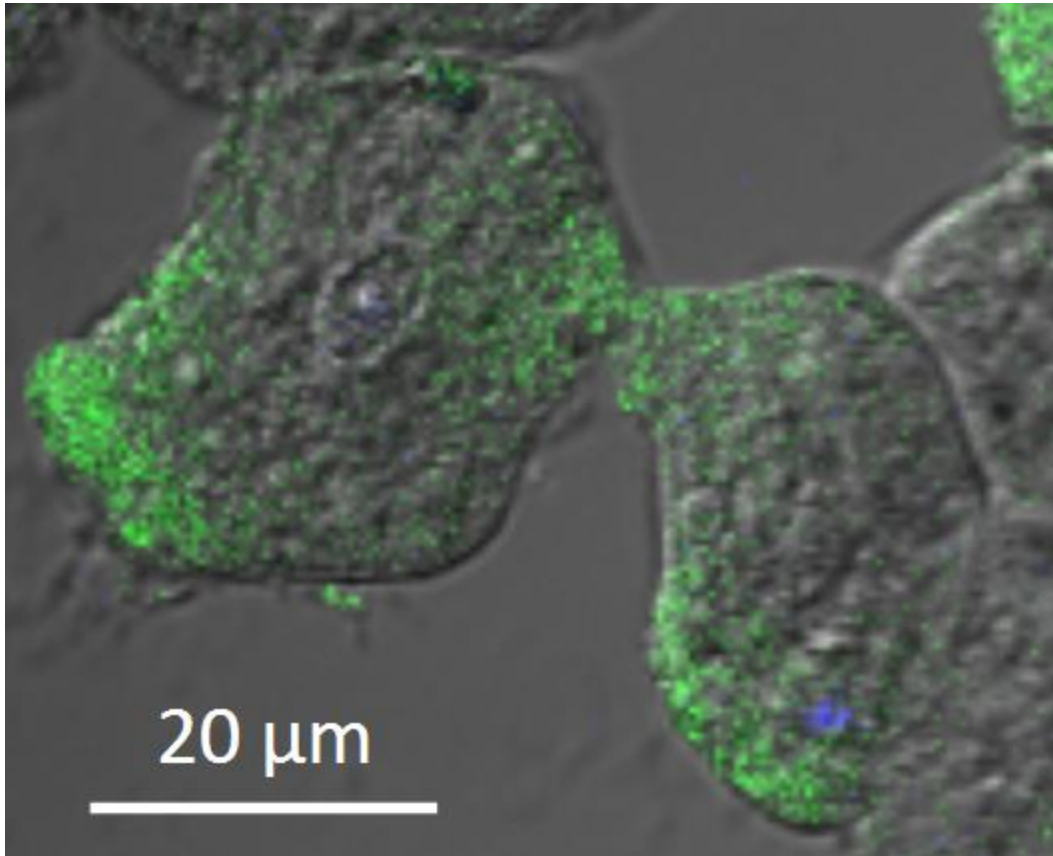
Para determinar la localización subcelular de las proteínas EhPRMT5 y EhPRMT-A en los trofozoítos amibianos se realizaron ensayos de inmunofluorescencia indirecta usando pos anticuerpos obtenidos en el presente trabajo en una concentración de 1:50. Como marcador de fluorescencia se utilizó un anticuerpo secundario acoplado a FITC. Como se observa en la figura 23, EhPRMT5 se encontró en el citoplasma celular, con una distribución polarizada cerca de la membrana plasmática, en segmentos celulares que posiblemente son pseudópodos (flechas blancas), y en sitios donde se observan células en un posible proceso de división (flechas rojas). En la figura 24, se observa una amplificación de dos células en posible división, donde se observa la marca de la proteína en el sitio de posible separación de las células. Sorprendentemente, en estos ensayos no se detectó marca en los núcleos de los trofozoítos (Fig. 23 y Fig. 24). Estos resultados sugieren que EhPRMT5 puede estar participando en la motilidad y en la división celular de los trofozoítos. Posiblemente, bajo condiciones aún no determinadas EhPRMT5 podría translocarse al núcleo para metilar a las histonas, como lo demuestran los ensayos de actividad in vitro (Fig.21 y Fig. 22).

En cuanto a EhPRMT-A, como se observa en la figura 25, la localización de la proteína es homogénea en todo el citoplasma del trofozoíto, observándose además como el contorno membranal se delimita con la señal de detección del fluorocromo FITC. Además, la marca también se detectó en los núcleos teñidos con DAPI (flechas rojas). En la figura 26 se presenta una célula en donde se comprueba la colocalización entre FITC y DAPI, sugiriendo el papel de esta enzima en la metilación de la cromatina. En los ensayos control, en donde las amibas fueron incubadas únicamente con el anticuerpo secundario se puede observar que no existe señal de color verde, correspondiente al FITC (Fig. 23 y Fig. 25), indicando la especificidad de la localización de las proteínas EhPRMT5 y EhPRMT-A.

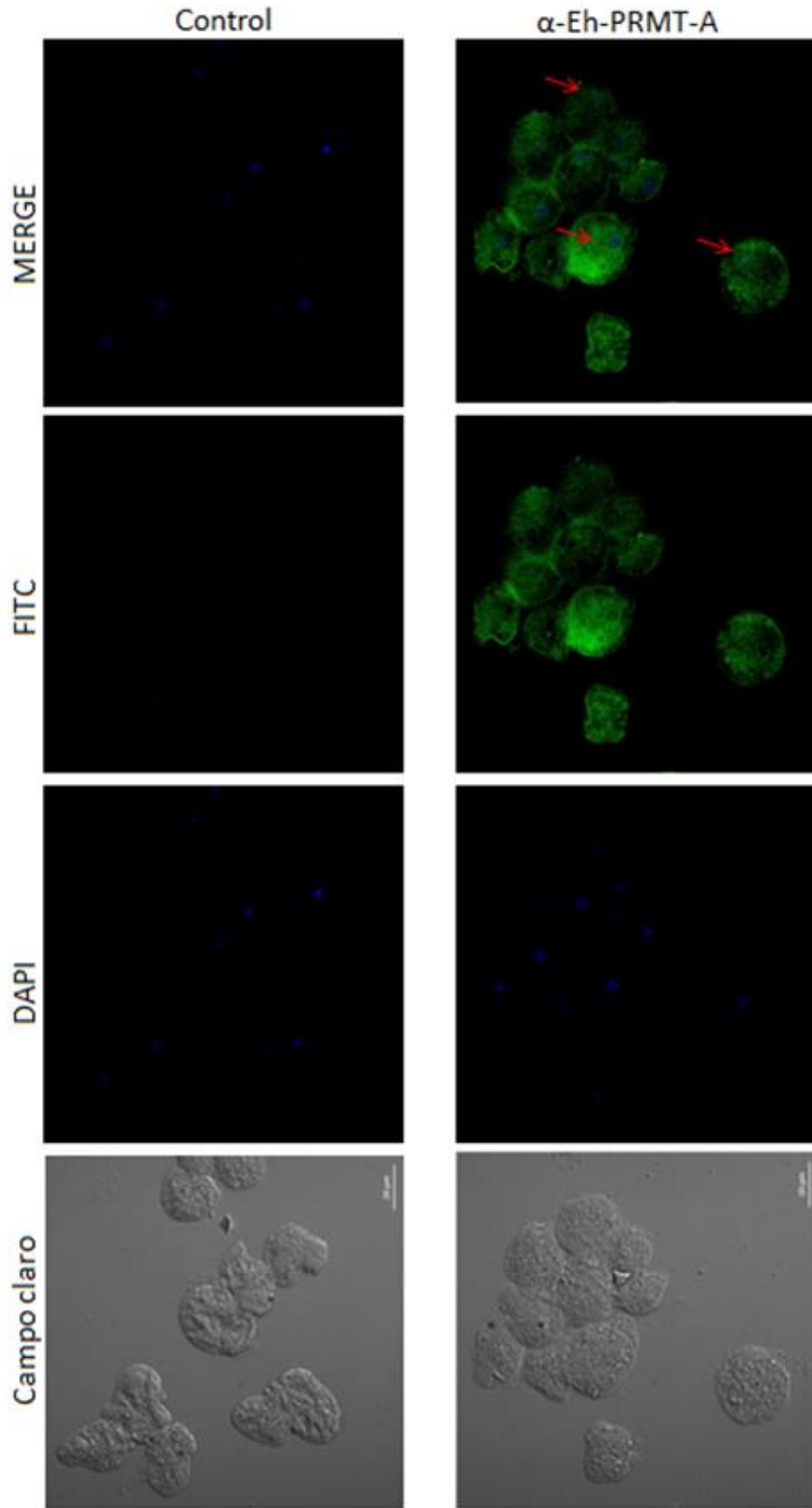




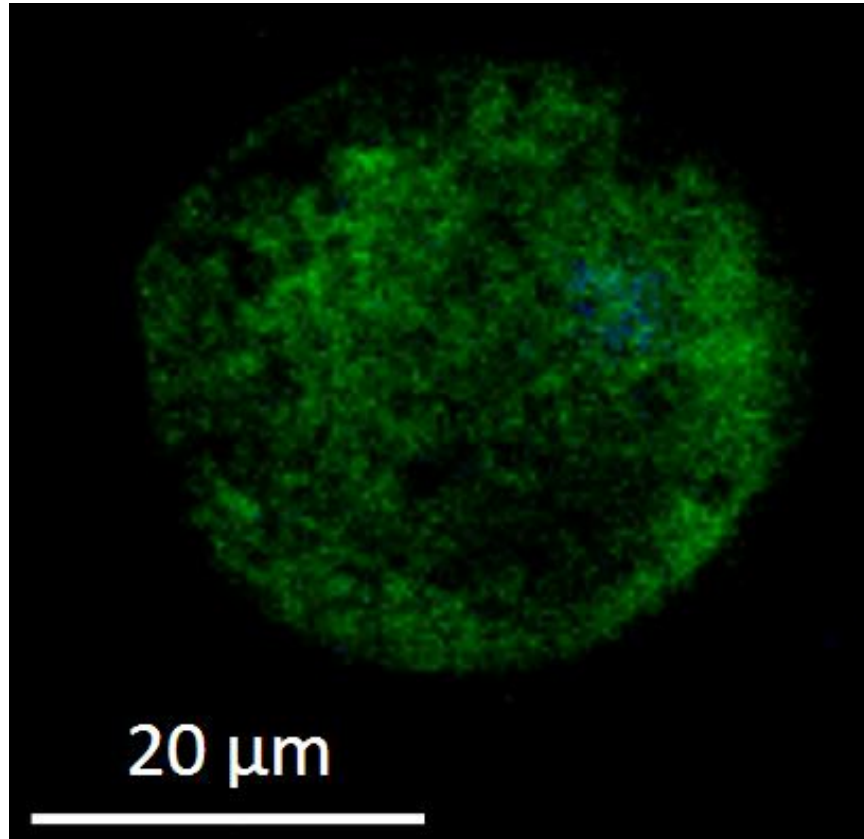
**Fig. 23 Inmunolocalización de la proteína EhPRMT5.** Los trofozoítos se fijaron, se permeabilizaron y se incubaron secuencialmente con el anticuerpo anti-EhPRMT5 y un anticuerpo secundario acoplado a FITC. Posteriormente, núcleos se tiñeron con DAPI y las muestras se analizaron mediante microscopía confocal. Como control se utilizaron células incubadas únicamente con el anticuerpo secundario acoplado a FITC.



**Fig. 24 Amplificación de la imagen de la inmunolocalización de la proteína EhPRMT5:** La imagen amplificada se tomó de las células observadas en la figura 21.



**Fig. 25 Inmunolocalización de la proteína EhPRMT-A:** Los trofozoítos se fijaron, se permeabilizaron y se incubaron secuencialmente con el anticuerpo anti-EhPRMT-A y un anticuerpo secundario acoplado a FITC. Posteriormente, núcleos se tiñeron con DAPI y las muestras se analizaron mediante microscopía confocal. Como control se utilizaron células incubadas únicamente con el anticuerpo secundario acoplado a FITC.



**Fig. 26 Amplificación de la imagen de la inmunolocalización de la proteína EhPRMT-A:** La imagen amplificada se tomó de las células de la figura 23.

## 8. Discusión

En *E. histolytica* se han identificado cinco genes que codifican para PRMT's putativas (EhPRMT's) y originalmente se sugirió que cuatro de ellas eran homólogas a PRMT1 y una a PRMT5 (Fisk y Read, 2011). En un estudio más reciente, nuestro grupo de trabajo (Borbolla-Vázquez *et al.*, 2015) realizó un nuevo análisis filogenético, donde se encontró que solo tres de las PRMT's comparten homología con PRMT1 (EhPRMT1a, EhPRMT1b y EhPRMT1c), una con PRMT5 (EhPRMT5) y la restante no mostró homología significativa con otra PRMT de *E. histolytica* ni de algún otro organismo, por lo que esta enzima se denominó PRMT-A (atípica). Nuestro grupo de trabajo también reportó: a) la presencia de las enzimas EhPRMT1 en los trofozoítos, b) la presencia de la dimetilación en la arginina 8 en la histona H4 de *E. histolytica*, equivalente a la arginina 3 de H4 en otros organismos, modificación realizada por PRMT1; y c) la actividad de metil-transferasa de la enzima EhPRMT1a recombinante sobre la H4 en una mezcla de histonas de pollo comerciales (Borbolla-Vázquez *et al.*, 2015). En ese estudio se sugirió una posible actividad redundante de las tres EhPRMT1, faltando por caracterizar a las enzimas EhPRMT5 y EhPRMT-A. Por tal motivo, en este trabajo de tesis se inició la caracterización de estas dos enzimas amibianas.

Dado que una de estas enzimas mostró relación filogenética con PRMT5, se decidió analizar la presencia en las histonas amibianas de los posibles residuos blanco, ya que se conoce que PRMT5 realiza la metilación en H3R8, H4R3 y H2AR3 (Wei *et al.*, 2014). Nuestros resultados mostraron que el residuo de arginina 3 en H2A se encuentra sustituido por un residuo de ácido glutámico en la proteína amibiana, mientras que los residuos blanco de arginina en H3 y H4 están presentes en las histonas de *E. histolytica*, aunque en H4 la arginina se localiza en la posición 8. Estos resultados sugieren que EhPRMT5 podría realizar la metilaciones de esos residuos, tal y como lo realizan sus homólogas. Sin embargo, hacía falta realizar los estudios pertinentes para demostrar su actividad e identificar sus posibles blancos.

Inicialmente se realizó un alineamiento entre PRMT-A y las PRMT's de humano (HsPRMT's). Estos análisis arrojaron que EhPRMT-A comparte un mayor

porcentaje de identidad con HsPRMT1 (18.5%), HsPRMT3 (18.5%), HsPRMT6 (15.5%) y HsPRMT8 (20%), todas ellas enzimas de tipo I (Wei *et al*, 2014), sugiriendo que EhPRMT-A pudiera ser también de tipo I. Sin embargo, en un estudio realizado por Feng *et al* (2009), se encontró que las PRMT's de tipo I tienen dos aminoácidos conservados que no se encuentran en las enzimas de tipo II: una serina en la posición 217 (S217) y una tirosina en la posición 154 (Y154). Por lo tanto, para analizar la pertenencia de las EhPRMT's a las PRMT's de tipo I, en este estudio se analizó la presencia de esos residuos en ellas. El análisis mostró la conservación de esos residuos en dos de las tres PRMT1 de *E. histolytica* (EhPRMT1c no tiene Y154), mientras que EhPRMT-A no conserva esos residuos característicos de las enzimas de tipo I. En EhPRMT-A el residuo S217 está sustituido por una arginina y en lugar de Y154 tiene un residuo de triptófano. Estos resultados sugieren fuertemente que EhPRMT-A no es una enzima de tipo I a pesar de tener una identidad mayor con tres proteínas pertenecientes a este tipo de metiltransferasas. EhPRMT5 sólo tiene conservado el residuo de Y154, pero no S217, soportando la hipótesis que esta enzima pudiera realizar una dimetilación simétrica, característica de las enzimas de tipo II, como las PRMT5 de otros organismos. Cabe mencionar que en el estudio realizado por Feng *et al* (2009), se indica que ambos aminoácidos deben estar presentes en la secuencia de la proteína para poder ser clasificada como una PRMT de tipo I, por lo que deben realizarse más estudios para EhPRMT1c, la cual se ha clasificado hasta el momento como una homóloga de HsPRMT1.

Para comprobar que las enzimas fueran funcionales, se realizaron ensayos de actividad *in vitro* utilizando histonas comerciales como sustrato y Adomet acoplado a la marca de tritio. Los ensayos mostraron que EhPRMT5 y EhPRMT-A realizan la transferencia de grupos metilo a histonas comerciales de pollo. En el estudio se utilizó una sola concentración de histonas, la cual fue 4 µg; no obstante, no se descarta que tengan también una actividad que aumenta de manera concentración-dependiente al igual que EhPRMT1a (Borbolla-Vázquez *et al.*, 2015). Sin embargo, con los ensayos realizados en este estudio no se puede discernir el tipo de actividad enzimática que ambas proteínas realizaron, por lo que más estudios deben

realizarse en función de encontrar el tipo de producto metilado que las PRMT's de *E. histolytica* producen. El ensayo idóneo para la caracterización completa sería realizar la reacción con el sustrato marcado, precipitar los productos con ácido tricloroacético, hidrolizar ácidamente los mismos en residuos de aminoácidos y fraccionarlos en columnas de intercambio catiónico junto con estándares de especies metiladas simétrica o asimétricamente, así como también con un estándar monometilado, para su posterior análisis por el ensayo cualitativo de ninhidrina (Branscombe *et al*, 2001).

En este trabajo se realizó una aproximación del tipo de actividad que presenta EhPRMT5. Esto se logró mediante el uso de un anticuerpo comercial contra la dimetilación asimétrica de la arginina 3 de la histona 4 (H4R3me2). Como se observó en los resultados, después de la reacción de EhPRMT5 sobre las histonas comerciales, el anticuerpo reconoció en ensayos de Western blot a la proteína H4. Aunque el anticuerpo está dirigido contra la modificación de una enzima de tipo I, el residuo modificado es el mismo (H4R3), posiblemente por ello hay una reactividad cruzada a la posible metilación simétrica realizada por EhPRMT5. Por lo tanto, se postula que EhPRMT5 es capaz de dimetilar la histona 4 en el residuo de arginina 3, como su homólogo de humano (Karkhanis *et al*, 2011; Wei *et al*, 2014; Wang *et al*, 2014).

En humanos, PRMT5 realiza su función catalítica mediante la unión a una proteína denominada proteína de metilosoма 50 (MEP50), la cual se ha comprobado que activa a PRMT5 y es capaz de aumentar el rango de sustratos sobre los cuales puede actuar, además de que este complejo es el responsable de la metilación de las histonas H2A, H3 y H4 (Karkhanis *et al*, 2011; Wang *et al*, 2014; Wei *et al*, 2014). Para discernir si un caso similar de formación de complejo pudiera resultar en *E. histolytica* se realizó la búsqueda mediante BLAST del homólogo de MEP50 en el parásito, encontrándose una proteína con un porcentaje de identidad del 28% que contiene los repetidos WD40 presentes en la proteína de metilosoма 50 (datos no mostrados), por lo que resulta posible que en este microorganismo se diera la formación de complejo como en el caso de la proteína metil-transferasa de humano.

Con todo lo anterior, se sugiere fuertemente que EhPRMT5 es una metil-transferasa de tipo II que modifica a H4R8 (equivalente a H4R3 de otros organismos) y que se podría asociar con una proteína tipo MEP50 para activar su función.

En el estudio realizado por Fisk y Read (2011), se postuló que EhPRMT-A era una proteína homóloga a PRMT1. Sin embargo, en los ensayos de Western blot utilizando el anticuerpo anti-H4R3me2 sobre los productos de actividad *in vitro* de EhPRMT-A no se detectó señal alguna, indicando y que esta enzima no realiza esta metilación, la cual es llevada a cabo por PRMT1 de humano (Boulanger *et al*, 2004; Wei *et al*, 2014), de *Toxoplasma gondii* (Croken *et al*, 2012), de *Drosophila melanogaster* y de *E. histolytica* (Borbolla-Vázquez *et al.*, 2015). Además, la ausencia de los aminoácidos conservados en las enzimas de tipo I en EhPRMT-A, refuerza la idea de que EhPRMT-A no es una PRMT1 o cualquier otra metil-transferasa de tipo I. Se podría postular en este sentido que EhPRMT-A pudiera ser una enzima de tipo II, como EhPRMT5, ya que en humano existe más de una PRMT de este tipo (Wei *et al*, 2014). Una opción más, es que EhPRMT-A pudiera fungir como una PRMT de tipo III, cuyos productos monometilados pudieran servir como sustrato para que las otras metil-transferasas agreguen el segundo grupo metilo para producir residuos de arginina simétrica o asimétricamente metilados, como ocurre en *Trypanosoma brucei*, donde se sugiere que TbPRMT7 produciría monometil-argininas y actuaría de manera sinérgica con las enzimas de tipo I y II (Fisk y Read, 2008; 2011).

En este estudio, la caracterización de las enzimas EhPRMT5 y EhPRMT-A incluyó la localización de las proteínas mediante ensayos de inmunofluorescencia y microscopía confocal utilizando anticuerpos obtenidos de la inmunización de animales con las proteínas recombinantes purificadas. Primeramente, con estos anticuerpos se realizaron experimentos de Western blot que demostraron que éstos son específicos para el reconocimiento de la respectiva EhPRMT, ya que no hubo reconocimiento cruzado con otras EhPRMT's recombinantes ni de cualquier otra proteína amibiana. Por otra parte, los ensayos de inmunolocalización revelaron que EhPRMT5 se localiza de manera polarizada hacia varios puntos extremos de las



células, los que pudieran ser pseudópodos, y en regiones que pudieran ser episodios de división celular. Por su parte, EhPRMT-A se encontró distribuida de manera homogénea en el citoplasma de los trofozoítos analizados, aunque también se observó en el área que parece corresponder a la membrana citoplasmática interna, alrededor y en el interior de los núcleos. La presencia de PRMT's en el citoplasma no es raro, ya que se ha descrito que diversas proteínas citoplásmicas son blanco de la metilación de argininas por este tipo de enzimas (Wei *et al.*, 2014).

Debido a que en otros organismos se ha comprobado la presencia de PRMT's tanto en citoplasma como en núcleo, se realizó un análisis de las secuencias de EhPRMT5 y EhPRMT-A con el software PSORT II, el cual es un programa de predicción de localización subcelular. Al analizar las secuencias de las proteínas de amiba con este software, no se encontró secuencia de péptido señal, así como tampoco con una secuencia de localización nuclear. El software además indica que la predicción de localización subcelular es citoplasmática, con un porcentaje de fiabilidad de 56.5% para EhPRMT5 y de 53% para EhPRMT-A (datos no mostrados). De forma interesante, PRMT1 en distintas especies está distribuida en diferentes compartimentos celulares, además de realizar funciones completamente distintas de organismo a organismo. PRMT1 de humano se encuentra mayoritariamente en núcleo realizando la metilación de histonas y otros sustratos nucleares, aunque se ha encontrado que puede tener actividad sobre blancos citoplasmáticos, como la subunidad Ig $\alpha$  del receptor BCR de células B, donde regula negativamente la actividad de la vía de señalización de PI3K, lo que provoca la diferenciación de las células B (Wei *et al.*, 2014). PRMT1 de *Toxoplasma gondii* (TgPRMT1) co-precipita con un ortólogo de la proteína Argonauta, que participa en el mecanismo del RNA interferente, es decir, un sustrato citoplasmático (Croken *et al.*, 2012). Se menciona además que la metilación de proteínas no histonas por TgPRMT1 pudiera tener una implicación en la sobrevivencia del parásito (Croken *et al.*, 2012). En un estudio donde se analizó la localización subcelular de dos PRMT's de tipo I de mamífero (PRMT1 y 3) se encontró que PRMT1 se encontraba principalmente en núcleo y ligeramente en citoplasma, mientras que PRMT3 se localizaba primariamente en citoplasma (Tang *et al.*, 1998). En ese trabajo se sugiere

además la posibilidad de que exista interacción entre ambas PRMT's (1 y 3) o con otras proteínas que puedan alterar su localización subcelular, debido a que se ha encontrado que PRMT1 interactúa con los dominios citoplasmáticos del receptor de interferón  $\alpha$  y  $\beta$ , las cuales a su vez interactúan con proteínas como JAK cinasas y factores de transcripción STAT, que participan en vías de señalización donde el interferón participa (Tang *et al*, 1998; Wang *et al*, 2014). Además, se ha reportado que modificaciones postraduccionales también están involucradas en la localización de algunas PRMT's; por ejemplo, la fosforilación del residuo de serina en posición 217 (S217) de CARM1 (también conocida como PRMT4) participa en la relocalización de la proteína, sugiriendo que CARM1 es fosforilada en el núcleo y posterior a la modificación, ésta se mueve al citoplasma (Feng *et al.*, 2009). El análisis *in silico* de EhPRMT-A y EhPRMT5 con el programa NetPhos (ExpASY) evidenció que ambas tienen múltiples residuos que pudieran ser blancos de fosforilación (datos no mostrados), lo que abre la posibilidad de que la modificación de esas PRMT's por cinasas del parásito pueda jugar un rol en su localización y actividad. Por otra parte, cuando se inhibe la metilación por PRMT1, esta proteína se acumula en el núcleo unida a sustratos no metilados y una vez que se reanuda la metilación, PRMT1 es distribuida nuevamente al citoplasma (Herrmann *et al.*, 2005). Además se ha reportado que PRMT1 de humano, al igual que EhPRMT5 y EhPRMT-A, no tiene señal de localización nuclear, por lo que se sugiere que ésta puede relocalizarse al núcleo mediante la unión a ribonucleoproteínas heterogéneas nucleares (hnRNP's) recién sintetizadas desde el citoplasma. Así, aunque la localización de EhPRMT5 se detectó en el citoplasma de los trofozoítos, existe la posibilidad de que esta localización pueda deberse a que los trofozoítos utilizados para ubicar a la enzima subcelularmente fueron obtenidos en condiciones de cultivo normales, por lo que hace falta aplicar algún tipo de estímulo, como fagocitosis de bacterias o eritrocitos, inducción de estrés, inhibición de la metilación, enquistamiento, etc., que permita observar si la proteína EhPRMT5 permanece en el citoplasma o si se relocaliza en el núcleo, ya sea por efecto de modificaciones postraduccionales y/o por su asociación con otras proteínas, y así realizar la metilación de histonas que lleven a cabo una regulación transcripcional. Otra

posibilidad es que a pesar de que *in vitro* EhPRMT5 mostró actividad sobre histonas, *in vivo* tenga actividad exclusiva sobre proteínas citoplásmicas. Por otra parte, se sabe que PRMT5 de humano tiene participación en el desarrollo de ciertos tipos de neoplasias, debido a que se sobreexpresa en cáncer de cerebro, mama, vejiga, sangre, colon y estómago (Wang *et al*, 2014). Además, se sabe que en células de cáncer linfóide, PRMT5 participa en la metilación de las histonas H3 y H4, evento que correlaciona con una represión transcripcional de RBL2, un inhibidor de la proliferación celular (Wang *et al*, 2014). Así, a pesar de que HsPRMT5 tiene una localización primariamente citoplasmática, donde interactúa con el receptor de factor de crecimiento epidérmico (Wang *et al*, 2014) y con proteínas de la familia de Janus cinasas (Karkhanis *et al*, 2011), entre otras, también tiene un papel importante en el crecimiento celular actuando directamente sobre la cromatina. Sin embargo, hasta el momento no se ha reportado la participación de PRMT5 en motilidad y citocinesis, como parece ser que ocurre con EhPRMT5 en los trofozoítos de *E. histolytica*. Interesantemente, un estudio en *Trypanosoma brucei* donde se silenció la proteína PRMT6 (TbPRMT6) mediante RNA de interferencia, se encontró que los parásitos presentan un crecimiento lento y que las células no se separan, dando como resultado cuerpos gigantes con “cabezas” que emergen desde un cuerpo central, en donde cada cabeza mostró tinción con DAPI (Fisk *et al*, 2010). A diferencia de PRMT6 de humano, cuya localización es nuclear, TbPRMT6 se encontró en el citoplasma y la purificación de proteínas con afinidad a TbPRMT6 reveló la interacción de esta enzima con proteínas flagelares, las cuales se sabe que participan en la división celular de este parásito (Fisk *et al*, 2010), apoyando la hipótesis de que TbPRMT6 pudiera tener un papel importante en la división celular de *T. brucei*. De igual manera, la detección de EhPRMT5 en sitios de aparente división de los trofozoítos sugiere la participación de esta metil-transferasa en la citocinesis de *E. histolytica*, tal vez regulando la actividad de proteínas que llevan a cabo este proceso en el parásito.

En el caso de EhPRMT-A, su presencia en el núcleo sugiere de manera fuerte una actividad de metil-transferasa de histonas y/o de otros factores nucleares. La presencia de EhPRMT-A en el núcleo puede deberse a un mecanismo de

translocación similar al observado los estudios anteriormente mencionados (Herrmann *et al*, 2005; Feng *et al*, 2009), dado que la proteína no cuenta con una señal de localización nuclear, pero sí muchos sitios potenciales de fosforilación. De cualquier manera, las proteínas blanco citoplásmicos y nucleares de EhPRMT-A se desconocen aún.

En conclusión, por los estudios realizados en el presente trabajo se determinó que EhPRMT5 y EhPRMT-A poseen actividad enzimática de metil-transferasa y que EhPRMT5 es capaz de dimetilar *in vitro* a la histona 4 en la arginina 3 (H4R8 en *E. histolytica*). Aunque la localización de EhPRMT5 es citoplásmica, es posible que un estímulo induzca su translocación al núcleo para catalizar la metilación de histonas y tener un efecto en la regulación transcripcional de *E. histolytica*.

## **9. Perspectivas**

Después de lo encontrado en este trabajo, aún queda por determinar si EhPRMT5 y EhPRMT-A tienen como blanco otros residuos de arginina en las histonas del parásito, por lo que la obtención de las mismas de manera recombinante es pertinente para analizar la capacidad de las enzimas de metilar más de una histona y la repercusión de éstas metilaciones en la regulación transcripcional del parásito. También sería importante conocer las proteínas citoplásmicas blanco de las EhPRMTs y su efecto en la biología del microorganismo, así como identificar el tipo de actividad de cada PRMT (tipo I, dimetilación asimétrica; tipo II, dimetilación simétrica; o tipo III, monometilación).

## 10. Bibliografía

Abrahamsen, M. S. et al. Complete genome sequence of the apicomplexan, *Cryptosporidium parvum*. 2004. Science 304, 441–445.

Ali IKM, Clark CG, Petri WA Jr. 2008. Molecular epidemiology of amebiasis. Infect. Genet. Evol. 8(5):698-707.

Ali IKM, Mondal U, Roy S, Haque R, Petri WA Jr, Clark CG. 2007. Evidence for a link between parasite genotype and outcome of infection with *Entamoeba histolytica*. J. Clin. Microbiol. 45(2):285-89.

Arroyo R., Orozco E., Localization and identification of an *Entamoeba histolytica* adhesin. Mol Biochem Parasitol 23:151-158.

Bailey G.B., Nudelman E.D., Bay D.B., Gilmaur J.R., Harper C.F., 1990. Use of non-cellular models to study interactions of *Entamoeba histolytica* with mammalian cells. Arch Invest Med 1:85-89.

Bhattacharya A., Satish S., Bagchi A. y Battacharya S., 2000. The genome of *Entamoeba histolytica*, Int. J. Parasitol. 4:401-410.

Bedford MT and Clarke SG. 2009. Protein arginine methylation in mammals: who, what, and why. Mol Cell. 33:1-13.

Binder M., Ortner S., Plaimauer B., 1995. Sequence and organization of an unusual histone H4 gene in the human parasite *Entamoeba histolytica*, Mol. Biochem. Parasitol. 2:243-247.

Branscombe T., Frankel A., Lee J., Cook J., Yang Z., Pestka S. y Clarke S., 2001. PRMT5 (Janus Kinase-binding Protein I) Catalyzes the Formation of Symmetric Dimethylarginine Residues in Proteins. The Journal of Biological Chemistry. 276(35):32971-32976.

Borbolla V. J. 2012. Identificación y caracterización parcial de metiltransferasa de histonas en *Entamoeba histolytica*. Tesis de maestría. CINVESTAV.

Boulanger M., Miranda T., Clarke S., Fruscio M., Suter B., Lasko P. y Richard S., 2004. Characterization of the *Drosophila* protein arginine methyltransferases DART1 and DART4. *Biochemical Society*. 379:283-289.

Campos Peralta J. M., Sánchez M. V., Villalba M. D. J., 2011. *Entamoeba histolytica* y su relación huésped parásito. *Enf. Inf. Microbiol.* 2: 63-70.

Chacín-Bonilla L. 2013. Amebiasis: aspectos clínicos, terapéuticos y de diagnóstico de la infección. *Rev Med Chile*. 141:609-615.

Cook J., Lee J., Yang Z., Krause C., Herth N., Hoffmann R. and Pestka S., 2006. FBXO11/PRMT9, a new protein arginine methyltransferase, symmetrically dimethylates arginine residues. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 342:472-481.

Croken MM, Nardelli SC and Kim K. 2012. Chromatin modifications, epigenetics and how protozoan parasites regulate their lives. *Trends in parasitology*. 28(5):202-213.

Cui L. and Miao J. 2010. Chromatin-mediated epigenetic regulation in the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Eukaryotic Cell*. 9:1138-1149.

Cura V, Troffer-Charlier N, Lambert MA, Bonnefond L and Cavarelli J. 2013. Cloning, expression, purification and preliminary X-ray crystallographic analysis of mouse protein arginine methyltransferase 7. *Acta Cryst.* F70:80-86.

Dalmaso C. M., Sullivan J. W. Jr., Angel S. O., 2011. Canonical and variant histones of protozoan parasites. *Bioscience* 16:2086-2105.

Diamond, L.S., Harlow, D.R., and Cunnick, C.C. 1978. A new medium for the axenic cultivation of *Entamoeba histolytica* and other *Entamoeba*. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 72:431-432.

Fan Q., Miao J., Cui L. and Cui L. 2009. Characterization of PRMT1 from *Plasmodium falciparum*. *Biochem J*. 421:107-118.

Faust DM, Guillen N. 2012. Virulence and virulence factors in *Entamoeba histolytica*, the agent of human amoebiasis. *Microbes Infect.* 14:1428-41.

Feng Q., He B., Jung S., Song Y., Qin J., Tsai S., Tsai M. y O'Malley B., 2009. Biochemical Control of CARM1 Enzymatic Activity by Phosphorylation. *Journal of Biological Chemistry.* 284(52):36167-36174.

Fernández R.J. 2007. Estudio molecular y funcional del factor del corte del pre-mRNA EhCFI de *E. histolytica*. Tesis de maestría. CINVESTAV.

Fisher O., Siman-Tov R., Ankri S., 2004. Characterization of cytosine methylated regions and 5-cytosine DNA methyltransferase (Ehmet) in the protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. *Nucleic Acid Res.* 1:287-297.

Fisk J. y Read L., 2011. Protein arginin methylation in parasitic protozoa. *Cell Eukaryotic.* 10:05103-11.

Fisk J., Zurita-Lopez C., Sayegh J., Tmasello D., Clarke S. y Read L., 2010. TbPRMT6 Is a Type I Protein Arginine Methyltransferase That Contributes to Cytokinesis in *Trypanosoma brucei*. *Eukaryotic Cell.* 9(6):866-877.

Fotedar R, Stark D, Beebe N, Marriott D, Ellis J, Harkness J. 2007. Laboratory Techniques for *Entamoeba histolytica* species. *Clin Microbiol Rev.* 20(3):511-32.

Gissot, M. et al. 2007. Epigenomic modifications predict active promoters and gene structure in *Toxoplasma gondii*. *Plos Pathog.* 3, e77.

Gómez J.C., Cortés J., Cuervo S., López M.C. 2007. Amebiasis intestinal. *Infectio.* 1:36-45.

González M.C., Carabarin A., Baylon L., Rosales J.L. 2012. De amibas y amibiasis: *Entamoeba histolytica*. *Elementos.* 87:13-18.

Hakimi M.A. and Deitsch K.W. 2007. Epigenetics in Apicomplexa: control of gene expression during cell cycle progression, differentiation and antigenic variation. *Curr. Opin. Microbiol.* 10(4):357-362.



Haque R, Huston CD, Hughes M, Houpt E, Petri WA Jr. 2003. Amebiasis. *N. Engl. J. Med.* 348(16):1565-73.

Herrmann F., Lee J., Bedford M. and Fackelmayer F., 2005. Dynamics of Human Protein Arginine Methyltransferase 1 (PRMT1) *in Vivo*. *Journal of Biological Chemistry.* 280(45):38005-38010.

Hirouchi KY., Eason MM., Ferry JJ., Planck JL., Walsh CP., Smith RF., Howitz KT. and Ma H. 2013. Assay development for histone methyltransferases. *Assay and drug development technologies.* 11(4):227-236.

Janzen, C.J. et al. 2006. Unusual histone modifications in *Trypanosoma brucei*. *FEBS Lett.* 580:2306-2310.

Jeffers V., William J., and Sullivan J., 2012. Lysine acetylation is widespread on proteins of diverse function and localization in the protozoan parasite *Toxoplasma gondii*. *Eukaryotic Cell.* 11:735-742.

Karkhanis V, Hu YJ, Baiocchi RA, Imbalzano AN and Sif S. 2011. Versatility of PRMT5-induced methylation in growth control and development. *Trends in Biochem Sciences.* 36(12):633-641.

Kelsall BL, Ravdin JI. 1993. Degradation of human immunoglobulin A by *Entamoeba histolytica* trophozoites. *Adv Exp Med Biol.* 216B:1283-1288.

Kouzarides, T. (2007) Chromatin modifications and their functions. *Cell* 128:693-705.

Lakowski TM. and Frankel A. 2009. Kinetic analysis of human protein arginine N-methyltransferase 2: formation of monomethyl- and asymmetric dimethyl-arginine residues on histone H4. *Biochem J.* 421:253-261.

Lee J, Sayegh J, Daniel J, Clarke S and Bedford MT. 2005. PRMT8, a new membrane-bound tissue-specific member of the protein arginine methyltransferase family. *J of Biol Chem.* 280(38): 32890-32896.

Lewin B., 2008. Genes, McGrawHill.

Lizuka M. y Smith M. M. 2003. Functional consequences of histone modifications. *Genetics and development*. 13:154-160.

Loftus B., Anderson I., Davies R., Alsmack UC, Samuelson J., Amedeo P., Roncaglia P., Berriman M., Hirt RP., Mann B. J., Nozaki T., Suh B., Pop M., Duchene M., Ackers J., Tannich E., Leippe M., Hofer M., Bruchhaus I., Willhoeft U., Battacharya A., Chillingworth T., Churcher C., Hance Z., Harris B., Harris D., Jagels K., Moule S., Mungall K., Ormond D., Squares R., Whitehead S., Quail M. A., Rabbinowitsch E., Norbertczak H., Price C., Wang Z., Guillén N., Gilchrist C., Stroup S. E., Bhattacharua S., Lohia A., Foster PG, Sicheritz-Ponten T., Weber C., Singh U., Mukherjee C., El-Sayed NM., Petri WA Jr., Clarck CG., Embley TM., Barrel B., Fraser CM y Hall N., 2005. The genome of the protest parasite *Entamoeba histolytica*. *Nature*. 433:865-868.

López R. I., 2010. Análisis de la expresión del mRNA de los genes que forman la maquinaria ESCRT en *Entamoeba histolytica* y caracterización funcional de la proteína EhVps4. Tesis de doctorado. CINVESTAV.

Marie C. and Petri Jr. 2014. Regulation of Virulence of *Entamoeba histolytica*. *Annu Rev Microbiol*. 68:493-520.

Melville S., Gerrard C. S., Blackwell J. M., 1999. Multiple causes of size variation in the diploid megabase chromosomes of African Trypanosomes. *Chromosome Res*. 7:1991-2003.

Meza I., 2000. Extracellular matrix-induced signaling in *Entamoeba histolytica*: its role in invasiveness. *Parasitol*. 16:23-28.

Miao J., Fan Q., Li X., Wang H., Ning G., Reese J. C., y Cui L. 2010. The MYST family histone acetyltransferase regulates gene expression and cell cycle in malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Mol. Microbiol*. 78:883-902.

Mirelman D., Anbar M. and Bracha R. 2008. Epigenetic transcriptional silencing in *Entamoeba histolytica*. IUBMB Life. 60(9):598-604.

Ocádiz R., Orozco E., Carrillo E., Quintas L., Ortega-López J., García-Pérez R., Sánchez T., Castillo-Juárez B., García-Rivera G., Rodríguez M. A., 2005. EhCP112 is an *Entamoeba histolytica* secreted cysteine protease that may be involved in the parasite virulence. Cellular Microbiology. 2:221-232.

Okada M, Huston CD, Oue M, Mann BJ, Petri WA Jr, et al. 2006. Kinetics and strain variation of phagosome proteins of *Entamoeba histolytica* by proteomic analysis. Mol Biochem Parasitol. 145(2):171-83.

Pasternack D., Sayegh J., Clarke S. and Read L., 2007. Evolutionary Divergent Type II Protein Arginine Methyltransferase in *Trypanosoma brucei*. Eukaryotic Cell. 6(9):1665-1681.

Pearson J. R., and Singh U., 2010. Approaches to characterizing *Entamoeba histolytica* transcription regulation. Cell Microbiology. 12:1681-1690.

Pelletier M., Pasternack D. y Read L., 2005. In vitro and in vivo analysis of the mayor type I protein arginina methyltransferase from *Trypanosoma brucei*. Mol. Biochem. Parasitol. 144:206-217.

Petri WA Jr, Haque R, Mann BJ. 2002. The bittersweet interface of parasite and host: lectin-carbohydrate interactions during invasion by the parasite *Entamoeba histolytica*. Annu. Rev. Microbiol. 56:39-64.

Purdy, J. E., Pho, L. T., Mann, B. J., and Petri, W. A. Jr. 1996. Upstream regulatory elements controlling expression of the *Entamoeba histolytica* lectin. Mol Biochem Parasitol. 78:91-103.

Que X, Kim SH, Sajid M, Eckman L, Dinarello CA, Mckerrow JH, Reed SL. 2003. A surface amebic cysteine proteinase inactivates interleukin-18. Infect immun. 71:1274-1280.

Que X., Brinen L. S., Perkins P., Herdman S., Hirataa K., Torian B. E. 2002. Cysteine proteinases from distinct cellular compartments are recruited to phagocytic vesicles by *Entamoeba histolytica*. *Mol Biochem Parasitol* 119:23-32.

Que X. and Reed S.L. 2000. Cysteine proteinases and the pathogenesis of amebiasis. *Clin Microbiol Rev.* 13:196-206.

Ramakrishnan G., Gilchrista C. A., Musaa H., Torokd M., Grantd P., Manna, B. y Petri W. 2004. Histone acetyltransferases and deacetylase in *Entamoeba histolytica*. *Mol Biochem Parasitol.* 138:205-216.

Recillas T. F., y Escamilla A. M., 2004. Participación de la estructura de la cromatina en la regulación de la expresión génica. *Mensaje Bioquímico UNAM.* 38:173-198.

Reyes L. y León R., 2002. Diferenciación de *Entamoeba histolytica/ Entamoeba dispar* y los nuevos hallazgos en la patogénesis de la amibiasis intestinal. *Rev. Costarric. Cienc. Méd.* 23:3-4.

Rice C. J. and Allis D. C., 2001. Code of silence. *Nature.* 414:258-259.

Riverón A. M., López-Canovas L., Báez-Camargo M., Flores E., Pérez-Pérez G., Luna-Arias J. P. y Orozco E., 2000. Circular and linear DNA molecules in the *Entamoeba histolytica* complex molecular karyotype. *Eur Biophys.* 29:48-56.

Rudenko, G. 2010. Epigenetics and transcriptional control in African trypanosomes. *Essays Biochem.* 48:201-219.

Saksouk, N. et al. 2005. Histone-modifying complexes regulate gene expression pertinent to the differentiation of the protozoan parasite *Toxoplasma gondii*. *Mol Cell Biol.* 25:10301-10314.

Salles JM, Morales LA, Salles MC. 2003. Hepatic amebiasis. *Braz J Infect Dis.* 7(2):96-110.

Stanley S. and Reed. S. 2001. *Entamoeba histolytica*: parasite-host interactions. *J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 280:G1049-G1054.

Strahl B. and Allis C., 2000. The language of covalent histone modifications. *Nature*. 6765:41-45.

Tang J., Gary J., Clarke S. y Herschman H., 1998. PRMT3, a Type I Protein Arginine N-Methyltransferase That Differs from PRMT1 in Its Oligomerization, Subcellular Localization, Substrate Specificity and Regulation. *The Journal of Biological Chemistry*. 273(27):16935-16945.

Tanyuksel M, Petri WA Jr. 2003. Laboratory diagnosis of amebiasis. *Clin Microbiol Rev*. 16(4): 713-9.

Cooper GM. 2000. *The Cell: A Molecular Approach*. 2nd edition. Sunderland (MA).

Torres-Guerrero, H. Peattie, D. A., and Meza I. 1991. Chromatin organization in *Entamoeba histolytica*. *Mol Biochem Parasitol*. 45:121-130.

Tovy A., Tov R., Gaentzch R., Helm M. and Ankri S., 2010. A new nuclear function of the *Entamoeba histolytica* glycolytic enzyme enolase: The metabolic regulation of cytosine-5 mehtyltransferase 2 (Dnmt2) activity. *Plos Pathogens*. 6:1-13.

Trelle, M.B. et al. 2009. Global histone analysis by mass spectrometry reveals a high content of acetylated lysine residues in the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *J. Proteome Res*. 8:3439-3450.

Volkel P. and Angrand P. 2006. The control of histone lysine methylation in epigenetic regulation. *Elsevier Biochimie* 89:1-20.

Wang M., Fuhrmann J. y Thompson P., 2014. Protein Arginine Methyltransferase 5 Catalyzes Substrate Dimethylation in a Distributive Fashion. *Biochemistry*. 53:7884-7892.

Wang, Q.P. et al. 2010. Histone deacetylases play distinct roles in telomeric VSG expression site silencing in African trypanosomes. *Mol. Microbiol*. 77:1237-1245.

Wang Y.C. and Li C., 2012. Evolutionarily conserved protein arginine methyltransferases in non-mammalian animal systems. *The Febs Journal*. 279:932-945.

Wei H., Mundade R., Lange K. y Lu T. 2014. Protein arginine methylation of non-histone proteins and its role in diseases. *Cell Cycle*. 13(1):32-41.

Willhoeft U. and Tannich E., 1999. The electrophoretic karyotype of *Entamoeba histolytica*. *Mol Biochem Parasitol* 99:41-53.

Ximénez C, Morán P, Rojas L, Valadez A, Gómez A. 2009. Reassessment of the epidemiology of amebiasis: state of the art. *Infect. Genet. Evol.* 9(6):1023-32.

Ximénez C., Morán P., Ramos F., Ramiro M., 2007. Amibiasis intestinal: estado actual del conocimiento. *Med Int Mex* 5:398-407.

Zaki M, Andrew N, Insall RH. 2006. *Entamoeba histolytica* cell movement: a central role for self-generated chemokines and chemorepellents. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 103(49):18751-56.

Zhang X., Wen H. and Shi X., 2012. Lysine methylation: beyond histone. *ABBS* 44:14-27

Zhang Y., Reinberg D., 2001. Transcription regulation by histone methylation: interplay between different covalent modifications of the core histone tails. *Genes Dev* 18:2343-2360.

Zhang, X., Zhang, Z., Alexander, D., Brancha, R., Mirelman, D., and Stanley, S.L., Jr. 2004. Expression of amoebapores is required for full expression of *Entamoeba histolytica* virulence in amebic liver abscess but is not necessary for the induction of inflammation or tissue damage in amebic colitis. *Infect. immun.* 72:678-683.