

Pastor Gutiérrez Emilio.pdf




Resumen de fuentes

5%

SIMILITUD GENERAL

1	docplayer.es INTERNET	<1%
2	rio.upo.es INTERNET	<1%
3	eprints.ucm.es INTERNET	<1%
4	eprints.uanl.mx INTERNET	<1%
5	digibug.ugr.es INTERNET	<1%
6	Belacortu, Yaiza, Ron Weiss, Sebastian Kadener, and Nuria Paricio. "Transcriptional Activity and Nuclear Localization of Cabut, the Dros...	<1%
7	Simão Lindoso de Souza. "Análise do proteoma do fluido intercelular de raízes de cana-de-açúcar colonizadas por Glomus clarum.", Uni...	<1%
8	www.hindawi.com INTERNET	<1%
9	DIANA CAROLINA MUÑOZ LASSO. "Fisiopatología de la ataxia de Friedreich: Transporte y degeneración axonal.", Universitat Politècnica...	<1%
10	es.slideshare.net INTERNET	<1%
11	repository.javeriana.edu.co INTERNET	<1%
12	www.buenastareas.com INTERNET	<1%
13	tesis.ipn.mx INTERNET	<1%
14	cybertesis.uach.cl INTERNET	<1%

15	docplayer.com.br INTERNET	<1%
16	repositorio.uam.es INTERNET	<1%
17	www.cbib.u-bordeaux2.fr INTERNET	<1%
18	www.researchsquare.com INTERNET	<1%
19	Poonam Kumari, Mrigya Babuta, Alok Bhattacharya, Samudrala Gourinath. "Structural and functional characterisation of phosphoserine ..." CROSSREF	<1%
20	bibliotecasibe.ecosur.mx INTERNET	<1%
21	link.springer.com INTERNET	<1%
22	revistacta.agrosavia.co INTERNET	<1%
23	roderic.uv.es INTERNET	<1%
24	www.freepatentsonline.com INTERNET	<1%
25	www.termedia.pl INTERNET	<1%
26	doczz.es INTERNET	<1%
27	es.scribd.com INTERNET	<1%
28	opus.bibliothek.uni-wuerzburg.de INTERNET	<1%
29	patents.google.com INTERNET	<1%
30	repositorio.itesm.mx INTERNET	<1%
31	repositorio.unicamp.br INTERNET	<1%
32	stacks.cdc.gov INTERNET	<1%
33	www.frontiersin.org INTERNET	<1%

 34	hdl.handle.net INTERNET	<1%
 35	pesquisa.bvsalud.org INTERNET	<1%
 36	riunet.upv.es INTERNET	<1%

Se excluyeron los depósitos de búsqueda:

- Trabajos entregados

Excluido del Informe de Similitud:

- Bibliografía
- Citas
- Coincidencias menores (10 palabras o menos)

Se excluyeron las fuentes:

- Ninguno



¹⁰ **CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE
ESTUDIOS AVANZADOS DEL INSTITUTO
POLITÉCNICO NACIONAL**

UNIDAD ZACATENCO

**Departamento de Infectómica y Patogénesis
Molecular**

Tesis:
**Identificación celular de las cofilinas codificadas
por los genes *EHI_164480* y *EHI_197480* en
*Entamoeba histolytica***

Que presenta:
LBM. Emilio Pastor Gutiérrez

³⁰ **Para obtener el grado de:**
Maestro en Ciencias
en Infectómica y Patogénesis Molecular

Director de Tesis:
Dr. José Luis Rosales Encina

Ciudad de México.

Marzo, 2020

³⁶ Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (**CONACYT**) por permitirme realizar ¹² mis estudios en el Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (**CINVESTAV**) gracias a la beca **CVU: 863419** otorgada por parte del Programa Nacional de Posgrados de Calidad (**PNPC**).

Agradecimientos

11 INDICE

RESUMEN / ABSTRACT	1
1. INTRODUCCIÓN.	2
2. MARCO TEÓRICO:	2
2.1. <i>Entamoeba histolytica</i> .	2
2.2. Cofilinas	4
2.3. Actina.	6
2.4. Transporte Nuclear.	7
3. ANTECEDENTES ESPECÍFICOS.	9
4. JUSTIFICACIÓN.	10
5. HIPÓTESIS.	11
6. OBJETIVOS:	11
6.1. General.	11
6.2. Específicos.	11
7. MATERIALES Y MÉTODOS:	12
7.1. Análisis <i>in silico</i> .	12
7.2. Cepas y Cultivo	12
7.3. Purificación de ADN	12
7.4. Diseño de Oligonucleótidos	13
7.5. Reacción de PCR	14
7.6. Producción de las construcciones <i>Topo::CoAC / pRSETC::CoAC</i> y <i>Topo::COF / pRSETC::COF</i>	14
7.7. Células competentes <i>E. coli</i> Top 10F ⁺ y BL21 (DE3) p-LysS	15
7.8. Transformación de células competentes <i>E. coli</i> Top 10F ⁺ y BL21 (DE3) p-LysS.	15

7.9. Producción de las proteínas recombinantes CoAC (<i>EHI_164480</i>) y COF (<i>EHI_197480</i>)	16
7.10. Purificación de las proteínas recombinantes CoAC y COF	16
7.11. Extracción de proteínas totales a partir de trofozoitos de <i>Entamoeba histolytica</i> empelando el reactivo TRIzol.	17
7.12. Cuantificación de Proteínas	18
7.13. Obtención de anticuerpos policlonales CoAC (Anti-CoAC) y Cof (Anti-Cof).	18
7.14. Electroforesis e Inmunotransferencia	19
7.15. Purificación Nuclear	19
7.16. Ensayos de Inmunofluorescencia	20
8. RESULTADOS.	21
8.1 <i>Entamoeba histolytica</i> tiene 9 proteínas Cofilina en su genoma.	21
8.2. Generación de las Construcciones Topo::CoAC / PrSETC::CoAC y Topo::COF / PrSETC::COF.	25
8.3 Obtención de anticuerpos policlonales para CoAC y COF.	28
8.4 Localización subcelular de las proteínas CoAC y COF	32
8.5 La proteína COF se identificó mediante WB y Espectrometría de Masas en la Fracción Nuclear de <i>Entamoeba histolytica</i> .	35
9. DISCUSIÓN.	38
10. CONCLUSIONES.	44
11. PERSPECTIVAS.	44
12. BIBLIOGRAFÍA.	45
13. ANEXOS.	51
Anexo 1) Análisis bioinformático de las proteínas Importinas 9, Exportinas 6, Profilinas y Cofilinas de <i>Entamoeba histolytica</i>	51
Anexo 2) Análisis bioinformático de los 10 genes de Cofilina en <i>Entamoeba histolytica</i>	55
Anexo 3) Análisis del Nucleoproteoma de <i>Entamoeba histolytica</i>	56

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Alineamiento nucleotídico de los genes <i>EHI_164480</i> (CoAC) y <i>EHI_092023</i> .	21
Figura 2. Alineamiento aminoacídico de las proteínas codificadas por los genes <i>EHI_164480</i> (CoAC) y <i>EHI_092023</i> .	22
Figura 3. Alineamiento múltiple de las proteínas Cofilina de <i>Entamoeba histolytica</i> .	23
Figura 4. Amplificación de los genes <i>EHI_164480</i> y <i>EHI_197480</i> .	26
Figura 5. Las construcciones TOPO::CoAC y TOPO::COF tienen los genes de interés	27
Figura 6. Las construcciones PrSETC::CoAC y PrSETC::COF tienen los genes de interés	27
Figura 7. Expresión de los genes <i>EHI_197480</i> y <i>EHI_164480</i> en <i>Entamoeba histolytica</i> .	28
Figura 8. Expresión de la proteína recombinante CoAC	29
Figura 9. Expresión de la proteína recombinante COF	29
Figura 10. Las proteínas recombinantes purificadas tienen etiquetas de histidina.	30
Figura 11. Titulación de anticuerpos policlonales.	31
Figura 12. Identificación de CoAC y Cof en extractos de proteínas totales de <i>Entamoeba histolytica</i> .	32
Figura 13. La proteína CoAC se concentra en puntos en <i>E. histolytica</i>	33
Figura 14. La proteína COF se ubica en la periferia celular de <i>E. histolytica</i>	33
Figura 15. Las proteínas CoAC y COF se localizan en la periferia de la membrana celular en <i>E. histolytica</i> .	34
Figura 16. Trofozoitos de <i>Entamoeba histolytica</i> estimulados con fibronectina.	35
Figura 17. Análisis del Nucleoproteoma de <i>Entamoeba histolytica</i>	36
Figura 18. La proteína COF, esta presente en la Fracción Nuclear y Citoplasmática de <i>E. histolytica</i>	37

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Programas Bioinformáticos empleados para analizar secuencias de proteínas.	12
Tabla 2. Oligonucleótidos diseñados para amplificar los genes de interés.	13
Tabla 3. Condiciones empleadas para amplificar los genes que codifican para las proteínas CoAC (<i>EHI_164480</i>) y COF (<i>EHI_197480</i>).	14
Tabla 4. Cronograma de actividades empleado durante la producción de los anticuerpos policlonales.	18
Tabla 5. Identidad de las 10 proteínas cofilinas de <i>Entamoeba histolytica</i> .	22
Tabla 6. Identidad de las 10 proteínas cofilinas de <i>Entamoeba histolytica</i> y la proteína CFL-1 de humano.	23
Tabla 7. Análisis <i>in silico</i> de las proteínas cofilina de <i>Entamoeba histolytica</i> .	24

RESUMEN

Las proteínas cofilina participan en la constante reestructuración del citoesqueleto, por lo que son importantes para la estabilidad estructural así como para la eficiente respuesta celular a los estímulos del medio que las rodea. En la actualidad se ha reportado que estas proteínas, además de ejercer su función en el citoesqueleto, participan en diferentes actividades nucleares, como la estructura nuclear, la expresión génica o el transporte de proteínas dentro del núcleo.

Entamoeba histolytica es un patógeno que causa amebiasis intestinal y extra intestinal, y a pesar de su importancia clínica se desconoce la función que ejercen las cofilinas a nivel de núcleo celular en el parásito. En este trabajo se caracterizaron las proteínas cofilina de *E. histolytica* a través del análisis *in silico* de las 10 proteínas codificadas en el genoma del parásito. Se generaron anticuerpos policlonales para analizar a dos de estas proteínas, CoAC (*EHI_164480*) y COF (*EHI_197480*), y mediante microscopía confocal se observó su distribución celular. Por último se analizaron las proteínas del nucleoproteoma, y se identificó a la proteína COF (*EHI_197480*) como parte de las proteínas presentes en la fracción nuclear de este parásito.

ABSTRACT

Cofilin proteins participate in cell cytoskeleton restructuration, therefore are important for structural stability and the cell efficient response to environment stimuli. It has been reported that these proteins, in addition to their cytoplasmatic function, participate in different nuclear activities such as nuclear structure, gene expression or protein transport within the nucleus.

¹⁹ *Entamoeba histolytica* is a pathogen that causes intestinal and extra intestinal amoebiasis, and despite its clinical importance, the role of cofilin proteins at the cell nucleus in this parasite is unknown. In this work, cofilin proteins of *E. histolytica*, were characterized in through *in silico* analysis of the 10 proteins coded by the parasite genome. Polyclonal antibodies were generated to analyze two of these proteins, CoAC (*EHI_164480*) and COF (*EHI_197480*), and their cell distribution was observed by confocal microscopy. Finally, the nucleoproteome proteins were analyzed, and the COF protein (*EHI_197480*) was identified as part of the proteins present in the nuclear fraction of this parasite.

1 INTRODUCCIÓN

Las proteínas del citoesqueleto como actina, y las distintas proteínas de unión a actina (ABPs, *Actin Binding Proteins*) participan en la constante restructuración del citoplasma, con lo que le dan estabilidad a las células y le permiten adaptarse a los estímulos del medio que las rodea. Durante el siglo pasado, el estudio de estas proteínas se centró en su actividad citoplasmática, descartando de manera absoluta su participación en otros procesos celulares. Sin embargo, un pequeño grupo de estudios demostró que estas proteínas podrían tener una participación en la fisiología celular mucho más compleja de lo que se había pensado, debido a que se identificó que estas proteínas del citoplasma se translocan al núcleo celular, (Jockusch, *et al.*, 1974; Clark & Merriam., 1977; Fukui., 1978; Egly, *et al.*, 1984;) abriendo con esto una nueva etapa en el estudio de estas proteínas.

2 MARCO TEÓRICO

2.1. *Entamoeba histolytica*.

Entamoeba histolytica es un protozooario que se transmite al humano por medio de comida o agua contaminada. Es el agente causal de la colitis amebiana y de los abscesos hepáticos amebianos, que son enfermedades asociadas con niveles significativos de mortalidad en todo el mundo (Mi-ichi, *et al.*, 2016). *E. histolytica* está clasificada por la OMS como el tercer agente causante de muerte por infecciones parasitarias, con un estimado de 100,000 muertes anuales (Sateriale & Huston., 2011).

Fedor Aleksandrovich Lesh fue el primero en describir el cuadro clínico causado por este parásito en 1875. En un paciente con disentería, describió al agente causal y estableció la relación "causa-efecto" de la enfermedad al infectar perros con quistes amebianos humanos (Lesh., 1975).

Este parásito presenta un ciclo de vida simple, que consta de ¹ dos estadios: el quiste y el trofozoito. El quiste es la forma infectiva y resistente del parásito, que ³² se encuentra en las heces de las personas infectadas, el cual, una vez que llega al intestino se convierte a trofozoito, forma móvil e invasiva del parásito, que cuenta con la capacidad de invadir el intestino, lo que puede culminar en colitis necrotizante y abscesos hepáticos (Gómez, et al., 2007; González Vázquez et al., 2012).

En la amebiasis intestinal, el proceso de infección se divide en tres etapas, luego de las cuales el parásito es capaz de generar daño a su hospedero (Moncada, et al 2003), estas etapas son:

- Colonización.- Es la etapa inicial, se realiza a través de la adhesión mediada por distintas lectinas, que reconocen azúcares como: galactosa (Gal) y N-acetilgalactosamina (GalNAc) sobre la superficie de la célula huésped (Mi-ichi, et al., 2016; Aguirre García, et al., 2015).
- Disrupción de la mucosa.- Durante esta etapa el parásito secreta una gran cantidad de Glicosidasas y Cisteína proteasas que degradan la mucosa de una manera directamente proporcional a la dosis y al tiempo (Moncada, et al 2003; Moncada, et al 2005). Es importante mencionar que el genoma de *E. histolytica* codifica para un total de 86 peptidasas, de las cuales 50 son exclusivamente Cisteína proteasas (Tillack, et al., 2007)
- Unión y citólisis.- En esta etapa final, el trofozoito es capaz de iniciar la destrucción de la capa celular mediante diferentes mecanismos como: el ameboporo A, el complejo EhCPADH, o la proteína ROM1, que le otorgan a la ameba actividad citotóxica mediante la cual puede eliminar las células del epitelio intestinal, facilitando con esto que alcance la capa submucosa y la lámina propia. (Ralston & Petri., 2011; Sateriale & Huston., 2011).

2.2. Cofilinas

La familia de proteínas del factor despolarizante de actina (ADF), es un grupo de proteínas de unión a actina con funciones cruciales para regular la homeostasis celular, debido a que participan en los procesos de reestructuración de actina, lo cual resulta esencial para la estructura y la migración celular. La primera de las proteínas de esta familia en ser identificada fue el Factor Despolarizante de Actina, que se purificó a partir de cerebro de pollo y se demostró que tenía la capacidad de desarmar filamentos de actina (Bamburg, Harris & Weeds., 1980). Casi simultáneamente se identificó en cerebros de cerdo una proteína con la capacidad de unirse a actina monomérica, misma que también tenía la capacidad de dismantelar filamentos de actina, razón por la que recibió el nombre de cofilina (Nishida, Maekawa & Sakai., 1984). Las proteínas de la familia ADF se unen a ambos extremos de los filamentos de actina e interactúan preferentemente con los complejos de ADP-F/Actina, promoviendo la rápida despolimerización de los filamentos de actina en el extremo en punta, evitando el alargamiento de los extremos barbados y generando con esto la dismantelación de filamentos actina (Wioland, et al., 2017). Estas proteínas han sido identificadas en todos los organismos eucariotas y se han descrito 3 isoformas (Kanellos & Frame., 2016):

- Factor despolarizante de actina (ADF/Destrina)
- Cofilina-1 (CFL-1)
- Cofilina-2 (CFL-2)

Las proteínas de esta familia comparten una gran similitud a nivel de su secuencia aminoacídica, sin embargo no son semejantes, ya que se ha identificado que a nivel celular ADF y CFL-1 se localizan en membranas "ondulantes" donde existe una gran reestructuración de actina (Bamburg & Bray., 1987; Yonezawa et al., 1987) mientras que CFL2 se encuentra en los discos Z de los sarcómeros (Kremneva, et al., 2014).

Actualmente existe un creciente número de estudios que demuestran las implicaciones que estas proteínas pueden llegar a tener a diferentes niveles de la fisiología celular y no solo a nivel citoplasmático. En procesos apoptóticos se ha determinado que la translocación de cofilina a la mitocondria es necesaria para la inducción de la muerte celular programada (Chua et al., 2003) y que a su vez esta translocación a la mitocondria puede desencadenarse por TGF- β o por la oxidación de los residuos de cisteína (Zhu et al., 2006; Klamt et al., 2009).

Se ha determinado también su participación en la arquitectura nuclear, ya que se demostró que el silenciamiento de las proteínas ADF y CFL1 en células epiteliales de ratón, propicia la pérdida de la forma nuclear como resultado de la acumulación desenfrenada de filamentos de actina que invaden el espacio intranuclear y que se originan como resultado de estrés celular (Kanellos et al., 2015). Durante este proceso de deformación nuclear se encuentra involucrado el complejo conector del citoesqueleto y el nucleoesqueleto (LINC, define en inglés), el cual también se ve afectado por la acumulación de fibras de estrés, lo que provoca una creciente tensión física que colabora con la deformación del núcleo y se ha sugerido que esta pérdida de la estructura nuclear podía a su vez afectar otros procesos como la transcripción y la traducción (Kanellos et al., 2015). De hecho, existen estudios que demuestran la participación de la cofilina (CFL1) en procesos como la transcripción (en conjunto con la actina nuclear, la polimerasa II y la proteína ARP3) en donde el silenciamiento de esta proteína desencadena una pérdida de la actividad transcripcional (Obřilík & Percipalle., 2011; Kalendová et al., 2014).

2.3. Actina.

Una de las moléculas más importantes presentes en el citoplasma es la actina, proteína que se encuentra en los 3 dominios de la naturaleza (Gunning, *et al.*, 2015). Tiene un peso de 42 kDa, posee 375 residuos altamente conservados, su estructura terciaria consiste en 4 subdominios que juntos forman los dominios: Largo o Interno (Subdominio 3 y 4), y Corto o Externo (Subdominio 1 y 2). Estos subdominios a su vez participan en la formación de los extremos: barbados (subdominio 1 y 3) y de punta (subdominio 2 y 4) de esta proteína (Chhabra & dos Remedios., 2008). La Actina fue identificada en el año de 1942 por Straub, quien reportó que puede estar presente en dos formas diferentes: activa e inactiva; formas que tiempo después serían conocidas como actina Globular y Filamentosa (Straub.,1943; Szent-Györgyi., 2004).

La polimerización de G actina a F actina necesita de la hidrólisis de ATP, así como de la unión de ADP a la actina, este proceso requiere de cuatro pasos consecutivos: activación, nucleación, alargamiento y alineamiento, durante los cuales la actina pasa por una serie de procesos bioquímicos que le permiten estabilizar su carga, disminuir su repulsión electrostática y adquirir un cambio conformacional que favorezca la hidrólisis de ATP, lo que permite la agregación de monómeros de actina al lado barbado del filamento de actina (Chhabra & dos Remedios., 2008; Dominguez & Holmes., 2011; Kudryashov & Reisler.,2013; Pollard., 2016). Sin embargo, no siempre es necesaria la presencia de nucleótidos, ya que cuando la actina se encuentra en presencia de análogos de nucleótidos no hidrolizables, es capaz de formar filamentos de actina (Cooke.,1975).

Esta proteína también se ha identificado en el núcleo celular y se ha descrito que participa en la activación transcripcional de genes en respuesta a diferentes estímulos (Sharili, *et al.*, 2016; Virtanen & Vartiainen., 2017).

Adicionalmente, como resultado de diferentes estudios sabemos que la actina participa activamente en el importe y exporte nuclear, en asociación con Cofilina en complejo de importe y con Profilina para formar el complejo de exporte (Percipalle., 2013).

2.4. Transporte Nuclear

El núcleo es uno de los organelos más importantes para la célula, y requiere estar parcialmente aislado del resto de otros compartimentos celulares, sin embargo se sabe que existe una gran comunicación entre el citoplasma y el núcleo; el intercambio de diferentes tipos de moléculas entre el interior y el exterior del núcleo requiere de un selecto transporte que involucra la participación de proteínas receptoras (importinas α , importinas β y exportinas), así como de la presencia de secuencias aminoacídicas específicas que identifican las moléculas que deben entrar o salir (Ossareh-Nazari, et al., 2001; Freitas & Cunha.,2009); a estas secuencias se le conoce como:

- Señal de localización nuclear (NLS), que es una secuencias rica en aminoácidos básicos.
- Señal de exporte nuclear (NES) que contiene una secuencia rica en leucinas.

El transporte nuclear requiere paso ¹ a través de los complejos de poro nuclear (NPC), lo que necesita de la interacción entre los complejos de importe o exporte y las regiones ricas en fenilalanina-glicina (FG) presentes en los complejos del poro nuclear (Freitas & Cunha., 2009). Las proteínas de los complejos de importe o exporte se denominan receptores de transporte nucleocitoplasmático y pertenecen a la súper familia de las Karioferinas que se divide en dos grupos $\text{Kap}\alpha$ y $\text{Kap}\beta$ (Chook., & Süel., 2011; Oka & Yoneda., 2018).

Las α -importinas ($\text{Kap}\alpha$) poseen tres dominios estructurales: un dominio de N-terminal de importe (IBB), un dominio repetido de tres hélices alfa conocido

7

como ARM (Armadillo Repeat Proteins), y un dominio de unión para factor de exporte (Oka & Yoneda., 2018). Las proteínas con dominios ARM no poseen gran identidad de secuencia, sin embargo, la estructura secundaria y terciaria es muy similar entre ellas (Peifer, et al., 1994; Tewari, et al., 2010). En los seres humanos las α -importinas se dividen en tres subfamilias: $\alpha 1$, $\alpha 2$ y $\alpha 3$, dentro de las cuales se agrupan diferentes isoformas de alfa importinas, que transportan cargas específicas al núcleo (Pumroy & Cingolani., 2015). La función de estas importinas es la de servir como adaptadores, ya que tienen la capacidad de interactuar con las secuencias de localización nuclear (NLS) presentes en otras proteínas (por el dominio ARM) y con las β importinas (por el dominio IBB), dando así lugar a la vía clásica de importe nuclear (Pumroy & Cingolani., 2015).

El segundo grupo Kap β incluye a las β -importinas y las exportinas, que tienen por función la interacción con las regiones FG de los poros nucleares y con las proteínas Ran (proteínas pequeñas de unión a GTP de la superfamilia Ras que regulan procesos celulares como el transporte nucleocitoplasmático, la formación de envoltura nuclear y el ensamblaje del huso mitótico (de Boer, S., et al 2015)), lo que facilita el transporte de diferentes proteínas al interior o exterior del núcleo. Estas proteínas constituyen una familia de proteínas con una masa molecular de entre 90 y 145 kDa, punto isoelectrico de entre 4.0 y 5.5, una baja identidad de secuencia y como característica sobresaliente, dominios HEAT (Chook., & Süel., 2011). Es importante mencionar que las β importinas no siempre requieren de α importinas, pues gracias a los dominios HEAT, que estructuralmente son muy similares a los dominios ARM presentes en las alfa importinas, pueden interactuar con otras proteínas y sus secuencias de localización nuclear sin la necesidad de una alfa importina (Macara, 2001; Freitas & Cunha, 2009).

Además de los complejos de proteínas ya mencionadas, la dirección del transporte nuclear (que involucra la formación de complejos de importe y exporte) depende de un gradiente asimétrico de GTP/GDP, y de la presencia de GTPasas pequeñas de la familia Ran y de sus respectivos factores intercambiadores y

activadores (Freitas & Cunha, 2009). Una vez que el complejo de importe pasa a través del poro nuclear, interactúa con RanGTP, (el cual se encuentra de manera abundante en el núcleo gracias a la acción de la proteína RCC1) esto genera en la importina- β un cambio conformacional que disocia el complejo de importe y libera la carga (Kalab & Heald, 2008). Así mismo la unión de RanGTP con la importina- β da como resultado la formación del complejo de exporte, el cual promueve la salida de la importina- β , así como de cualquier proteína que posea una secuencia NES (Ossareh-Nazari, et al., 2001; Macara, 2001). Una vez en el citoplasma, la desfosforilación de RanGTP a RanGDP (debido a la presencia de RanGAP) induce la disociación del complejo de exporte y la respectiva liberación de la carga (Kalab & Heald, 2008). Por su parte, la α -importina sale del núcleo al formar un complejo con la proteína CAS (Cse1 en levaduras) de una manera RanGTP dependiente (Ullman, et al., 1997). Tanto las exportinas como las proteínas CAS reingresan al núcleo para iniciar nuevamente un ciclo de exporte (Macara, 2001).

3 ANTECEDENTES ESPECÍFICOS

La presencia y translocación de proteínas citoplasmáticas al núcleo es un fenómeno que se ha descrito en años recientes, se trata de un proceso que depende de diferentes estímulos, tiene diferentes efectos en las células y se ha asociado fuertemente con translocación de la actina en células eucariotas. Se ha reportado que la presencia de actina en el núcleo es capaz de inducir y potenciar la diferenciación osteogénica en células derivadas de médula ósea; este fenómeno se consiguió mediante la despolimerización de filamentos de actina con Citocalasina D, lo que incrementó la cantidad de actina globular disponible para entrar al núcleo, y repercutió en el aumento de la actividad del factor transcripcional Runx2, el cual es el responsable de desencadenar el proceso de diferenciación (Sen, et al., 2015). Resultados similares han sido observados en células HeCaT, donde la disminución en la expresión de los genes MYL9, ITGB1 y VCL (involucrados en adhesión y movilidad), la alteración de las adhesiones

focales y la pérdida de movilidad celular se relacionó con un aumento en la concentración de actina en el núcleo (Sharili, et al., 2016).

Se ha establecido la importancia de la cofilina en el transporte nuclear, debido a que el silenciamiento de esta proteína disminuye la acumulación de actina en el núcleo, además se le identificó en asociación con actina e importina β mediante inmunoprecipitaciones (Dopie, et al., 2012). Por otro lado, se ha demostrado experimentalmente que al generar daño en el DNA de células HeLa y HEK293T tratadas con Metil-metanosulfonato se induce la formación de filamentos de actina dentro del núcleo, y que el silenciamiento de las proteínas IPO9 y CFL-1 (involucradas en el importe de actina al núcleo) así como de Formin-2 (proteína necesaria para la formación de estos filamentos) disminuye la capacidad de reparación del daño al ADN (Belin, et al., 2015).

En *Amoeba proteus*, se demostró que la actina se encuentra de manera abundante en el núcleo en forma globular formando parte de la cromatina, adicionalmente, mediante ensayos de microscopía confocal se identificó la presencia de filamentos de actina dentro del núcleo (Berdieva, et al., 2016). En *E. histolytica* se identificó que la proteína de unión a actina EhNCABP166, con actividad citoplasmática, además de contar con múltiples dominios (CH, GBD/FH3, BAG, BAR, PABC y bZIP), tenía una secuencia de localización nuclear que le permitía entrar al núcleo, lo cual se comprobó mediante inmunodetección por Western Blot y microscopía confocal (Campos-Parra, et al., 2010).

La información disponible sobre el fenómeno de entrada de proteínas citoplasmáticas al núcleo en *E. histolytica* (y en general para la mayoría de protistas) es escasa, poco se sabe de las proteínas que participan en el proceso de translocación o de los estímulos que desencadenan este proceso, razón por la cual es necesario comenzar con la caracterización de las proteínas citoplasmáticas que pudieran estar involucradas en el transporte nuclear en *E. histolytica*.

4 JUSTIFICACIÓN.

Numerosos estudios celulares en distintas líneas de investigación, han demostrado que la actividad biológica de la **cofilina**, **no se limita** únicamente a la **actividad** en el **citoplasma**, y se ha demostrado además, que esta proteína tiene la capacidad de entrar al núcleo en donde desempeña un papel importante en la homeostasis celular. Sin embargo, actualmente **no existe suficiente información en protozoarios** con respecto al transporte de proteínas citoplasmáticas, ni del papel que estas proteínas desempeñan a nivel nuclear.

Debido a que *E. histolytica* es un patógeno de importancia clínica y epidemiológica para el ser humano, es importante **iniciar** la **caracterización** del papel que desempeñan las **cofilinas en el núcleo** celular de este organismo.

5 HIPÓTESIS

El nucleoproteoma de *Entamoeba histolytica* tiene proteínas con dominios ADF.

6 OBJETIVOS.

6.1. General:

Caracterizar la localización subcelular de las proteínas cofilinas en *Entamoeba histolytica*.

6.2. Específicos:

6.2.1. Identificar en el genoma de *Entamoeba histolytica* genes que codifiquen para proteínas cofilinas y realizar análisis *in silico* de estas proteínas.

6.2.2. Generar anticuerpos específicos contra cofilinas seleccionadas de *E. histolytica*.

6.2.3. Observar la localización celular de la cofilinas seleccionadas.

7 MATERIALES Y MÉTODOS.

7.1. Análisis *in silico*.

Mediante los programas bioinformáticos listados en la Tabla 1 se analizaron e identificaron las proteínas cofilinas presentes en el genoma de *E. histolytica*

Tabla1. Programas Bioinformáticos empleados para analizar secuencias de proteínas

Programa	URL
BLAST	https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi
17 ProtoNet	http://www.protonet.cs.huji.ac.il
InterPro	http://www.ebi.ac.uk/interpro
CATH	http://www.cathdb.info/search/by_sequence
STRING	http://version33.string-db.org/
18 Prosite	https://prosite.expasy.org/
Pfam	https://pfam.xfam.org/
SMART	http://smart.embl-heidelberg.de/
Clustal W	https://www.genome.jp/tools-bin/clustalw
21 AmoebaDB	http://amoebadb.org/amoeba/
Conserved Domains	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi
PSORT II	https://psort.hg.jp/Form2.html
cNLS Mapper	http://nls-mapper.jab.kiio.ac.jp/cgi-bin/NLS_Mapper_form.cgi
SeqNLS	http://mieg.cse.sc.edu/seqNLS/
28 NetNES 1.1	http://www.cbs.dtu.dk/service/NetNES/
NucPred	https://nucpred.bioinfo.se/cgi-bin/single.cgi
LocSigDB	http://genome.unmc.edu/LocSigDB/
NES Finder 0.2	http://research.nki.nl/Tomerodlab/NES-Finder.htm
NLSdb	https://roslab.org/services/nlsdb/
TOPCONS	http://topcons.cbr.su.se/
PANDA	http://dna.cs.miami.edu/PANDA/

7.2. Cepas y Cultivo.

13 Trofozoitos de *E. histolytica* cepa HMI:IMSS se cultivaron en medio TYI-S-33 suplementado con 10% de suero bovino (Diamond, et al., 1978).

7.3. Purificación de DNA.

Para obtener ADN genómico se utilizaron 2×10^6 trofozoítos de *E. histolytica*, los cuales se colectaron mediante centrifugación a 120 RCF durante 10 min, posteriormente la pastilla se pulverizó con la ayuda de un mortero y nitrógeno líquido y se le agregó 6 ml de amortiguador de lisis (Tris-HCl 200 mM pH 8.5, NaCl 200 mM, SDS 0.5 %, EDTA 25 mM, 1 mg/ml de proteinasa K) se mezcló y se colocó a 65 °C por 30 min; posteriormente se hicieron alícuotas de 1 ml y se centrifugaron a 16,000 RCF durante 15 min. Se recuperó el sobrenadante y se extrajo con fenol: cloroformo: alcohol isoamílico (24:24:1) y otra extracción con Cloroformo:Alcohol Isoamílico (24:1). Posteriormente se recuperó el sobrenadante y se le agregó acetato de amonio 5 M y 900 µl de etanol absoluto y se incubó a -20°C durante 2 h. Después se centrifugó a 16,000 RCF por 15 min y la pastilla se lavó con etanol al 70%, se dejó secar y se agregó 50 µl de agua a la pastilla para resuspenderla. Adicionalmente se incubó con un coctel de RNAsa T (Roche 109293) y RNAsa A1 (Research organic 12650-88) durante 45 min a 37°C.

7.4. Diseño de Oligonucleótidos.

A partir de los genes seleccionados se diseñaron oligonucleótidos con la finalidad de amplificar el gen de interés para su respectiva clonación en plásmidos de mantenimiento y expresión. A cada uno de los oligonucleótidos se le agregaron sitios de restricción diferentes con la finalidad de dirigir la inserción del fragmento de interés (Tabla 2). Estos oligonucleótidos se utilizaron para amplificar a partir de DNA genómico de *E. histolytica* los genes de interés para su posterior uso y manipulación.

Tabla 2 Oligonucleótidos diseñados para amplificar los genes de interés

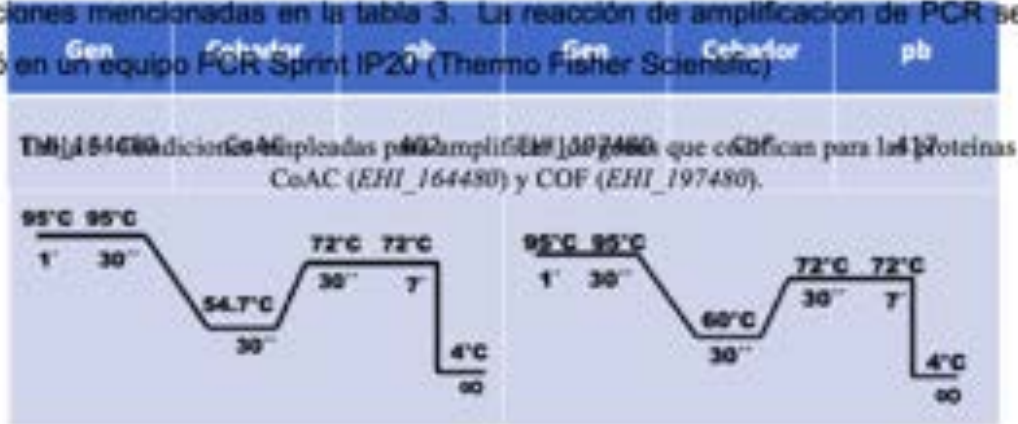
	Cebador	Enzima	Producto	Nombre
Proteína EHI_164480	CGGATCCAAATGCTTGAAGCTGCTATGAAAG (Sense)	BamHI	402 pb	CoAC
	C AAGCTTAGTTEATTACATGAGAACCTGCTG (Anti-sense)	HinDIII		

En rojo	Proteína	CCTGCAGATGGCTGGAATTCACCTTGC (Sentido)	PstI	427 pb	COF
	EHI_197480	GAAGCTTATTTTGAGATAGTTTTTACCTEAGC (Antisentido)	HinDIII		

se indican los sitios de restricción de cada enzima.

7.5. Reacción de PCR.

A partir de DNA genómico de trofozoitos de *E. histolytica* se realizaron reacciones en cadena de polimerasa (PCR) con amortiguador [2x], MgCl₂ [2 mM], mezcla de DNTP's (dGTP, dTTP, dATP, dCTP) [2.5 mM], Oligonucleótido en sentido [1.25 mM], Oligonucleótido antisentido [1.25 mM], empleando las condiciones mencionadas en la tabla 3. La reacción de amplificación de PCR se realizó en un equipo PCR Sprint IP20 (Thermo Fisher Scientific)



7.6. Producción de las construcciones Topo::CoAC/PrSETC::CoAC y Topo::COF/PrSETC::COF.

Con los productos de PCR de 427 y 402 pb obtenidos a partir de la amplificación de DNA genómico de *E. histolytica* se realizó la ligación de los mismos en el vector TOPO 2.1 siguiendo las instrucciones del fabricante (Thermo Fisher Scientific). De esta manera se generaron las construcciones TOPO::CoAC

y TOPO::Cof. Se comprobó que las construcciones tuvieran los genes de interés a través de amplificación de los mismos por PCR empleando las condiciones descritas en la Tabla 3 y mediante la secuenciación de las construcciones gracias a los sitios sentido y antisentido M13 presentes en el vector. Una vez comprobadas las construcciones se purificaron mediante extracción Fenol-Cloroformo y se procedió a liberar los fragmentos correspondientes al utilizar las enzimas de restricción específicas para cada gen (Tabla 2); se preparó una reacción de digestión que consistió en .5 µl de cada una de las enzimas de restricción (Thermo Fisher Scientific), Tango Buffer [1x] (Thermo Fisher Scientific), ADN [1µg] y agua, la reacción de restricción se llevó a cabo a 37°C durante 60 minutos. Finalmente los productos liberados se ligaron en el vector de expresión pRSETC, generando de esta forma las construcciones pRSETC::CoACp y pRSETC::Cofdm.

7.7. Células competentes *E. coli* Top 10F' y BL21 (DE3) p-LysS.

Se realizó un cultivo en medio LB (Tryptona 1%, glucosa 0.2%, Extracto de levadura 0.5, NaCl 0.55) en agitación constante a 37 °C toda la noche de las cepas de *E. coli* (Top 10F' o BL21 (DE3) p-LysS). Al día siguiente se inocularon 5 ml del cultivo en 10 ml de medio LB fresco y se mantuvo en agitación a 37 °C hasta alcanzar una D.O.₆₀₀ de 0.5. Posteriormente las bacterias se empastillaron a 12,100 RCF por 10 min, se resuspendió la pastilla obtenida en 1 ml de CaCl₂ [50 mM] y se dejaron incubando en hielo durante 20 min.

7.8. Transformación de células competentes *E. coli* Top 10F' y BL21 (DE3) p-LysS.

A las construcciones pRSETC::CoAC y pRSETC::Cof se les agregaron 100 µl de células competentes y se dejaron incubando en hielo durante 20 min. Posteriormente se incubaron a 37 °C durante 5 min y se colocaron en hielo una vez más por 2 min; terminado este periodo, se les agregó 1 ml de medio LB sin antibiótico y se dejaron incubando a 37 °C durante 40 min. Finalizado el tiempo de incubación, las células se centrifugaron a 735 RCF por 6 min, se decantó el

sobrenadante dejando aproximadamente 100 μ l de medio para resuspender la pastilla. Finalmente se dispensaron las bacterias en placas de LB-Ampicilina [50 μ g/ml] y se incubaron 18 h a 37 °C.

7.9. Producción de las proteínas recombinantes CoAC (*EHI_164480*) y COF (*EHI_197480*)

A partir de las construcciones PrSETC::CoAC y PrSETC::COF y mediante el uso de células competentes BL21 (DE3)p-LysS se indujo la expresión de las proteínas CoAC (*EHI_164480*) y Cof (*EHI_197480*). Se dejó un cultivo de células transformantes BL21 (DE3)p-LysS en medio de cultivo (Medio LB-Ampicilina [50 μ g/ml]) durante toda la noche a 37°C, al día siguiente se colocó 15 ml de cultivo inoculado en 500 ml de medio LB-Ampicilina [50 μ g/ml] fresco y se dejó incubar nuevamente hasta alcanzar una DO₆₀₀ de .6-1.0 (de 3 a 5 hrs.). Una vez alcanzada la DO₆₀₀ se incubaron los medios de cultivos con IPTG [1 mM] durante 150 minutos. Las células se colectaron por centrifugación (12,100 RCF durante 10 min) y se utilizaron para la purificación de las proteínas recombinantes.

7.10. Purificación de las proteínas recombinantes CoAC y COF

Mediante uso de cromatografía de afinidad, las proteínas recombinantes CoAC y COF fueron purificadas a partir de extractos proteínicos totales obtenidos de cultivos de células BL21 (DE3) p-LysS transformadas con las construcciones de interés. Las células recolectadas por centrifugación (12,100 RCF durante 10 min) se re suspendieron en solución de lisis (50 mM de Tris-HCl pH 8.5, 10 mM de 2-Mercaptoetanol, 1mM de PMSF) previamente enfriada en una relación peso / volumen de 1:4. La solución de lisis se colocó en hielo durante 10 minutos y posteriormente las células se lisaron mediante sonicación (frecuencia de 90 kHz) a través de rafagas cortas de 60 segundos seguidas de intervalos de enfriamiento de 3 minutos, este proceso se repitió hasta lograr clarificar la solución de lisis. Posteriormente se centrifugó la solución de lisis a 12,100 RCF durante 10 minutos

y se transfirió el sobrenadante a una columna con resina Ni-NTA (Qiagen) previamente equilibrada con solución A (20mM de Tris-HCl pH 8.5, 100mM KCl, 20 mM de Imidazol, 10mM de 2-Mercaptoetanol, 10% (v/v) de glicerol) a una velocidad de flujo de 0,5 ml / min. Las proteínas bacterianas unidas inespecíficamente a la columna se eliminaron mediante lavados secuenciales que consistieron en diez volúmenes de solución A, ocho volúmenes de solución B (20mM de Tris-HCl pH 8.5, 1 M KCl, 10mM de 2-Mercaptoetanol, 10% (v/v) de glicerol) y dos volúmenes de solución A. La proteínas recombinantes que poseían la etiqueta de poli histidina se eluyeron selectivamente con 10 volúmenes de solución C (20mM de Tris-HCl pH 8.5, 100mM KCl, 500 mM de Imidazol, 10mM de 2-Mercaptoetanol, 10% (v/v) de glicerol). Finalmente se cuantificó la cantidad de proteína obtenida a partir de los eluidos y se corrió un gel desnaturalizante de poliacrilamida al 15% para observar la integridad de la proteína. Los eluidos se pasaron una segunda vez por la columna Ni-NTA (Qiagen) para asegurar su pureza y se almacenaron a -72 °C hasta su uso.

7.11. Extracción de proteínas totales a partir de trofozoítos de *E. histolytica* empleando el reactivo TRIzol.

A partir de cultivos de *E. histolytica* se extrajeron proteínas siguiendo las recomendaciones del fabricante (Thermo Fisher Scientific). En un tubo Eppendorf de 1.5 ml limpio se agregó 800 µL de reactivo de TRIzol por cada $5 \times 10^5 - 3 \times 10^6$ trofozoítos, los tubos se mezclaron por inversión y se centrifugaron durante 10 min a 16,000 RCF. Posteriormente el sobrenadante se transfirió a otro tubo Eppendorf de 1.5 ml con ayuda de una micropipeta, y se agregaron 1.5 ml de isopropanol por cada 1 ml de reactivo de TRIzol, se mezcló por inversión y se dejó incubando por 10 min. Una vez cumplido el tiempo, las muestras se centrifugaron durante 10 min a 13,800 RCF; el sobrenadante se descartó y las pastillas se lavaron dos veces al dejarse incubar durante 20 min con 2 ml buffer de lavado (Hidrocioruro de Guanidina [0.3 M], Etanol [95 %]) por cada 1 ml de reactivo de TRIzol. Las muestras se centrifugaron durante 5 min a 8,160 RCF, después de cada lavado

se les agregó 2 ml de Etanol [100 %] por cada mililitro de TRizol. Se dejaron incubar durante 20 min, se centrifugaron durante 5 min a 8,160 RCF, se desechó el sobrenadante y se dejaron secar por 10 min. Para resuspender las pastillas de proteínas se agregaron 200 μ L de SDS [1 %] y se incubaron a 50 °C, posteriormente se colocaron en agitador Vórtex durante 1 min. Este proceso se repitió hasta conseguir solubilizar la pastilla de proteínas.

7.12. Cuantificación de Proteínas

Se cuantificaron las proteínas totales obtenidas a través de la purificación por cromatografía de afinidad (columna de níquel) o mediante TRizol. La cuantificación se realizó mediante Dot blot, a través del uso de membranas de nitrocelulosa sobre las cuales se dispensó 1 μ l de las muestras obtenidas, así como de una curva estandarizada de albúmina (.019 125 I μ l – 2.5 125 I μ l) que sirvió como referencia para determinar la cantidad de proteína presente en cada muestra. Se empleó Negro Amida (Amido Black 0.25 %, MeOH 45 %, H₂O 45 %, ácido acético 10 %) para revelar.

7.13. Obtención de anticuerpos policlonales CoAc (Anti-CoAC) y COF (Anti-COF)

A partir de los eluidos de las proteínas recombinantes CoAC y Cof se indujo la producción de anticuerpos policlonales en ratones hembras BALB/c de 4 semanas de vida. Para intensificar la respuesta inmune se empleó como adyuvante TiterMAX (Sigma-Aldrich), y se utilizaron [50 125 I μ l] de las proteínas recombinantes para hacer las inoculaciones, utilizando el esquema de inmunización de la tabla 4.

Tabla 4. Esquema de inmunización empleado durante la producción de los anticuerpos policlonales

Día	Actividad	Muestra Obtenida
0	Obtención suero pre-inmune	200 μ L

	Primera inoculación	
7	Segunda inoculación	-
28	Obtención suero para titular anticuerpo	200 µL

7.14. Electroforesis e Inmunotransferencia.

Las proteínas obtenidas de *E. histolytica* se separaron mediante geles de poliacrilamida-SDS al 15% (Gel separador: acrilamida [12 %] bis-acrilamida [0.216 %], Tris-HCL [375 mM / pH 8.8], SDS [0.1 %], persulfato de amonio [0.063 %] y TEMED [0.05 %]). Gel concentrador: acrilamida [5 %] bis-acrilamida [0.090 %], Tris-HCL [500 mM / pH 8.8], Tris-HCl [104 mM / pH6.8] SDS [0.083 %], persulfato de amonio [0.062 %] y TEMED [0.0375 %]). Las proteínas se corrieron a 80 voltios en un tanque Bio-Rad Mini-Protean II Cell, con amortiguador de corrida (Tris [25 mM], glicina [190 mM] y SDS [0.1%]). Posterior a la separación, las proteínas se transfirieron a membranas de nitrocelulosa, mediante el sistema Mini-Protean (BioRad). Como anticuerpo primario se utilizaron anticuerpos anti-histidinas (Santa Cruz Biotechnology) [dilución 1:1000], anti-CoAC y Anti-COF [dilución 1:100] que se dejaron incubando durante toda la noche, como anticuerpos secundarios se emplearon anticuerpos anti-IgG de ratón acoplados a fosfatasa alcalina [dilución 1:5000], mismos que se incubaron durante 60 minutos; los anticuerpos se diluyeron en solución TBST (150 mM de NaCl, 2.7 mM de KCl, 20 mM de Tris base y 0.1% (w/v) de Tween 20), misma que también se empleó para lavar la membrana tres veces entre cada anticuerpo. Para llevar a cabo la inmunodetección se preparó solución reveladora la cual consistió en 500 µl de NBT (Nitroblue Tetrazolium Chloride / BioRad) y 500 µl de BCIP (5-Bromo-4-Cloro-3-Idolifosfato / BioRad) diluidos en 9 ml de agua, la membrana se dejó incubar con la solución reveladora hasta detectar señal y para detener la reacción se lavó la membrana con agua destilada y se dejó secar.

7.15. Purificación de Proteínas Nucleares

Se obtuvo la fracción de proteínas nucleares de trofozoitos de *E. histolytica* siguiendo el protocolo descrito por Scheiber, et al., (1989), con algunas modificaciones. Trofozoitos (2×10^7) con 48 h de crecimiento se cosecharon al colocarse en hielo durante 5 min (con la finalidad de despegarlos del tubo), se centrifugaron a 125 RCF por 5 min a 4 °C y se les realizaron dos lavados con PBS entre cada centrifugación. Posteriormente las células se resuspendieron en solución "A" fría (HEPES 10 mM, pH 7.9, MgCl₂ 1.5 mM, KCL 10 mM, DTT 0.5 mM) en presencia de inhibidor de proteasa [1X] y se lisaron hipotónicamente al ser incubados durante 20 min a 4 °C con 1% de NP-40. La integridad nuclear se monitoreó mediante microscopía óptica. Posterior a esto, las muestras se centrifugaron a 20,000 RCF durante 15 min a 4 °C. El sobrenadante (que corresponde a la fracción citoplasmática) se desechó y los núcleos (contenidos en la pastilla) se resuspendieron en 50 µl de solución "B" (HEPES 20 mM, pH7.9, NaCl₂ 20 mM, EDTA 1 mM, EGTA 1 mM, DTT 0.5 mM) y se incubaron por 40 min a 4 °C en presencia de inhibidor de proteasas [1X]. Después se centrifugaron a 20,000 RFC durante 15 min a 4 °C. El sobrenadante obtenido, que corresponde a la proteínas presentes en la fracción nuclear, se recolectó y se almacenó a -72 °C hasta su uso.

7.16. Ensayos de inmunofluorescencia.

Trofozoitos (3×10^6) se incubaron en 200 µl de medio TYI-S-33 completo sobre cubreobjetos de vidrio por un periodo de 10 min. Las laminillas se fijaron con Paraformaldehído [4 %] durante 60 min a 37 °C, se permeabilizaron con Tritón X-100 [0.02%] durante 2 min y se bloquearon con Suero Fetal Bovino al [10 %] durante 60 min. Posterior a esto se incubaron con los anticuerpos primarios Anti-CoAC y Anti-Cof en una dilución 1:100 durante 1 h y finalmente se marcaron con un anticuerpo anti-IgG de ratón acoplado a fluorocromo (Cabra FITC) por 1 h. Se utilizó VECTASHIELD con DAPI (Vector Laboratories) para marcar el nucleolo celular. Para los ensayos de interacción con fibronectina, 3×10^5 trofozoitos de *E. histolytica* se dejaron incubando durante 60 minutos en cubre objetos con

fibronectina [100 µg/µl]. Las laminillas se observaron en un microscopio Confocal Zeiss LSM 700.

8 RESULTADOS.

8.1 *E. histolytica* tiene 10 proteínas Cofilinas en su genoma.

Con la finalidad de conocer cuántas proteínas con dominios ADF se encuentran presentes en el genoma de *E. histolytica* se realizó una búsqueda utilizando la base de datos Amoeba DB (<https://amoebadb.org/amoeba/>), mediante la cual se identificaron 10 proteínas con dominios ADF. Las secuencias de estos genes se descargaron y se analizaron en búsqueda de secuencias de exporte e importe nuclear, así como la posible presencia de algún otro tipo de dominio (Tabla 7). Es importante mencionar que se realizó el mismo análisis para las proteínas de *E. histolytica* Importina 9, Profilina y Exportina 6, proteínas indispensables para el transporte nuclear (Treisman., 2013) (Anexo 1)

El análisis de las proteínas identificadas mostró que las proteínas *EHI_164480* y *EHI_092320* presentaron una identidad del 99% debido a que solo existe un cambio de una sola base entre ambos genes (Figura 1) lo que genera el cambio de un solo aminoácido en la posición 25 en la secuencia de ambas proteínas (Figura 2) por lo cual se concluyó que *E. histolytica* tiene 9 proteínas cofilinas diferentes.

Se realizó además un alineamiento múltiple entre las 10 proteínas cofilinas, el cual demostró que entre ellas existe una identidad menor al 38% (Tabla 5 y Figura 3). Adicionalmente se analizó la similitud que estas proteínas tienen con la proteína homóloga de humano CFL-1, y sorprendentemente, los porcentajes de identidad resultaron menores al 20% para todas la proteínas, excepto para la proteína codificada por el gen *EHI_197480* que tuvo un 29% de identidad con su proteína homóloga CFL-1 (Tabla 6).

	Proteína	Identidad
EHI_164480	EHI_164480	100.00%
	EHI_035630	34.15%
	EHI_197480	12.20%
	EHI_186840	15.45%
	EHI_186770	10.57%
	EHI_118750	37.40%
	EHI_054800	13.01%
	EHI_152990	13.01%
	EHI_168340	20.33%
	EHI_092320	99.19%

TABLA 5: Identidad de las 10 proteínas cofilinas de *Entamoeba histolytica*. Porcentaje de identidad realizado con el programa Chimera de las 10 proteínas cofilinas de *Entamoeba histolytica*. Como puede observarse el porcentaje de identidad entre la proteína EHI_092320 y EHI_164480 es de 99%

A partir de una base de datos generada en el laboratorio, luego de un extenso análisis bibliográfico, se compararon y analizaron las proteínas cofilinas identificadas en el genoma de *E. histolytica* tomando en cuenta: su identificación por diferentes métodos proteómicos, su ubicación celular, su asociación a diferentes procesos biológicos y los resultados de los análisis *in silico* realizados en este proyecto con lo que se generó la Tabla 7, en la cual se resume la presencia o ausencia de secuencias de localización y exporte nuclear, los dominios proteicos identificados, así como los compartimientos y procesos celulares en los que se han reportado a las cofilinas de *E. histolytica*. Como se puede observar la búsqueda de otros dominios, mostró que únicamente la proteína codificada por el gen *EHI_054800* tiene un dominio SH3 adicional al dominio ADF característico de estas proteínas además identificamos secuencias de exporte nuclear (NES) en 4 cofilinas codificadas por los genes *EHI_118750*, *EHI_152990*, *EHI_164480* y *EHI_092320* (Tabla 7 y Anexo 1C). Desafortunadamente, en este trabajo no se pudo encontrar ninguna secuencia de localización nuclear (NLS) clásica en las

	Proteína	Identidad
CFL1	CFL1	100.00%
	EHI_035630	12.31%
	EHI_197480	28.79%
	EHI_186840	7.75%
	EHI_186770	12.80%
	EHI_118750	12.21%
	EHI_054800	10.07%
	EHI_152990	11.85%
	EHI_168340	17.16%
	EHI_164480	9.76%
EHI_092320	10.57%	

TABLA 6: Identidad de las 10 proteínas cofilinas de *Entamoeba histolytica* y la proteína CFL-1 de humano. Porcentaje de identidad realizado con el programa Chimera entre las 10 proteínas cofilinas de *Entamoeba histolytica* y su proteína homóloga en humanos CFL-1. El porcentaje de identidad más alto corresponde a la proteína codificada por el gen *EHI_197480* (28.79%) y los porcentajes más bajos corresponden a la proteína codificada por los genes *EHI_164480* (9.76%) y *EHI_186840* (7.75%).

proteínas cofilinas a pesar de haber utilizado 5 programas diferentes para su búsqueda (Anexo 2) y resulta importante mencionar que se ha reportado que la proteína CFL-1 de humano si posee NLS (Iida et al., 1992; Munsie., et al; 2012).

Gen	NLS	NES	Clonal	Membrana Celular	Fag/Eritro	Fag/Perlas	Unipol	Con A	Exu/Sec	Domina
<i>EHI_03330</i>	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	ADF-H
<i>EHI_03340</i>	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)	(+)	ADF-H
<i>EHI_04440</i>	(-)	(-)	(+)	(+)	(-)	(+)	(-)	(+)	(+)	ADF-H
<i>EHI_06770</i>	(-)	(-)	(+)	(+)	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)	ADF-H
<i>EHI_11770</i>	(-)	(+)	(+)	(+)	(-)	(+)	(-)	(+)	(+)	ADF-H
<i>EHI_04400</i>	(-)	(-)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	ADF-H SH3
<i>EHI_12290</i>	(-)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	ADF-H
<i>EHI_04440</i>	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)	(+)	(+)	ADF-H
<i>EHI_04440</i>	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	ADF-H
<i>EHI_06330</i>	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	ADF-H

Tabla 7: Análisis *in silico* de las proteínas Cofilinas de *Entamoeba histolytica*. Se muestra la presencia de NLS, NES, así como el resumen bibliográfico de los compartimientos y procesos celulares en el que las proteínas Cofilinas han sido identificadas a través de diferentes análisis proteómicos. En verde se señalan las proteínas seleccionadas. (-): Negativo o Ausente, (+): Positivo o Presente. NLS: Secuencia de Localización Nuclear, NES: Secuencia de Exporte Nuclear, Fag/Eritro: Fagocitosis de Eritrocitos, Fag/Perlas: Fagocitosis de perlas, Con A: Concanavalina A, Exu/Sec: Excreción-Secreción.

A partir de la Tabla 7 las proteínas codificadas por los genes *EHI_164480* y *EHI_197480* se seleccionaron para la siguiente fase de este trabajo con base en las siguientes consideraciones:

- Los análisis por proteómica revisados en nuestra base de datos bibliográfica indican que ambas proteínas se ubican y desempeñan actividades diferentes en *E. histolytica* (Tabla 7).
- El porcentaje de identidad entre la Cofilina codificada por el gen *EHI_197480* y CFL-1 es el más alto entre todas las cofilinas (Tabla 6).
- El porcentaje de identidad entre las proteínas codificadas por los genes *EHI_164480* y *EHI_197480* es del 12.20% (Tabla 5) que es uno de los más bajos entre las 10 cofilinas.

8.2. Generación de las Construcciones *Topo::CoAC / PrSETC::CoAC* y *Topo::COF / PrSETC::COF*

Con la finalidad de contar con una herramienta para la detección de las proteínas seleccionadas en los ensayos a realizar, se consideró prioritario producir anticuerpos policlonales contra cada una de las proteínas seleccionadas. Para alcanzar este objetivo, primero se diseñaron oligonucleótidos (Tabla 2) que se utilizaron para amplificar mediante PCR de punto final el gen de interés de cada proteína (Figura 4A y 4B). Es importante mencionar que para abreviar y facilitar el trabajo se denominó como CoAC a la proteína codificada por el gen *EHI_164480* y como COF a la proteína codificada por el gen *EHI_197480*. Posteriormente los productos de PCR se purificaron y cada uno se ligó en el vector de mantenimiento linearizado TOPO 2.1 generando de esta forma las construcciones *Topo::CoAC* y *Topo::COF*, que se utilizaron para transformar células *E. coli* DH5 α quimio-competentes y posteriormente, las células transformadas se seleccionaron con ampicilina.

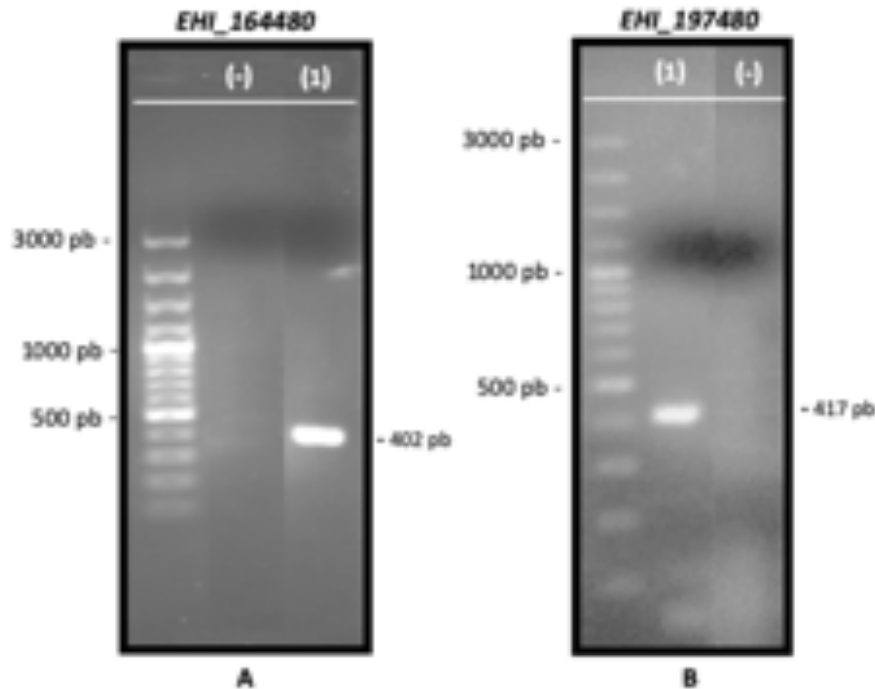


FIGURA 4: Amplificación de los genes *EHI_164480* y *EHI_197480* en *E. histolytica*. Con los oligonucleótidos diseñados (Tabla 2) se amplificaron a partir de DNA genómico de *E. histolytica* los genes *EHI_164480* y *EHI_197480*. **A)** Amplificado del gen *EHI_164480* (CoAC) con un peso esperado de 402pb. **B)** Amplificado del gen *EHI_197480* (COF) con un peso esperado de 417pb. Carriles: (-) Control Negativo de amplificación. (+) Amplificado.

Las posibles colonias que pudieran albergar las construcciones se confirmaron mediante PCR de colonia, se crecieron en cultivo y a partir de éstos, se realizó una purificación plasmídica por lisis alcalina. Una vez obtenidos los plásmidos, nuevamente se corroboró mediante secuenciación y mediante el alineamiento con sus respectivas secuencias en la base de datos del genoma de *E. histolytica* que tuvieran los genes de nuestro interés (Figura 5A y 5B). Con las construcciones comprobadas, se realizó nuevamente una restricción enzimática con la finalidad de liberar los genes que codifican para las proteínas CoAC y COF, ligándolos ahora en el vector de expresión pRSETC previamente linearizado. Se produjeron de esta forma las construcciones pRSETC::CoAC y pRSETC::COF, mismas que fueron comprobadas una vez mas por PCR y por restricción (Figura 6A y 6B).


```

TOPO_CoAC      TPFLVPSDDPLVETASVLEFALBQWVEAAMFVNSLDCPGEYIILDTHQNKLVFRKNG
ERI_144480_CoAC -----MVEAAMFVNSLDCPGEYIILDTHQNKLVFRKNG
*****

TOPO_CoAC      WCITELKHALSDGQVSPVLLALRLLELQGIPOQVRLIFNMGKCPAYKAMVYVKAQGFVQQA
ERI_144480_CoAC -----WCITELKHALSDGQVSPVLLALRLLELQGIPOQVRLIFNMGKCPAYKAMVYVKAQGFVQQA
*****

TOPO_CoAC      LEILSPNMQGLEVIQKHEPTEAIISEKMKFSAGSEVIN-A-KASSADINHTGQRSEK
ERI_144480_CoAC -----LEILSPNMQGLEVIQKHEPTEAIISEKMKFSAGSEVIN
*****
    
```

A

```

TOPO_CoF      SYRAKIN--SPFVCKNSPFLQMACIQLADEVTIVYINDFKLSNKYTYIVYKPDGQHTYVV
ERI_197480    -----KASIQLADEVTVYINDFKLSNKYTYIVYKPDGQHTYVV
*****

TOPO_CoF      EYIAKRNATYDOFLKDLPERIARYAVYDLEYDTFEGLRQKIIFTLNTPGCKIKERMLYS
ERI_197480    -----EYIAKRNATYDOFLKDLPERIARYAVYDLEYDTFEGLRQKIIFTLNTPGCKIKERMLYS
*****

TOPO_CoF      ATRATIRQALVGLSASIQATNAGELNLDDEVIAKYKTIISK-
ERI_197480    -----ATRATIRQALVGLSASIQATNAGELNLDDEVIAKYKTIISK-
*****
    
```

B

FIGURA 5: Las construcciones TOPO:CoAC y TOPO:CoF tienen los genes de interés. Comprobación de las construcciones TOPO:CoAC y TOPO:CoF mediante secuenciación. A) Alineamiento de la construcción TOPO:CoAC con la proteína codificada por el gen *(Eh_144480)* B) Alineamiento de la construcción TOPO:CoF con la proteína codificada por *(Eh_197480)*

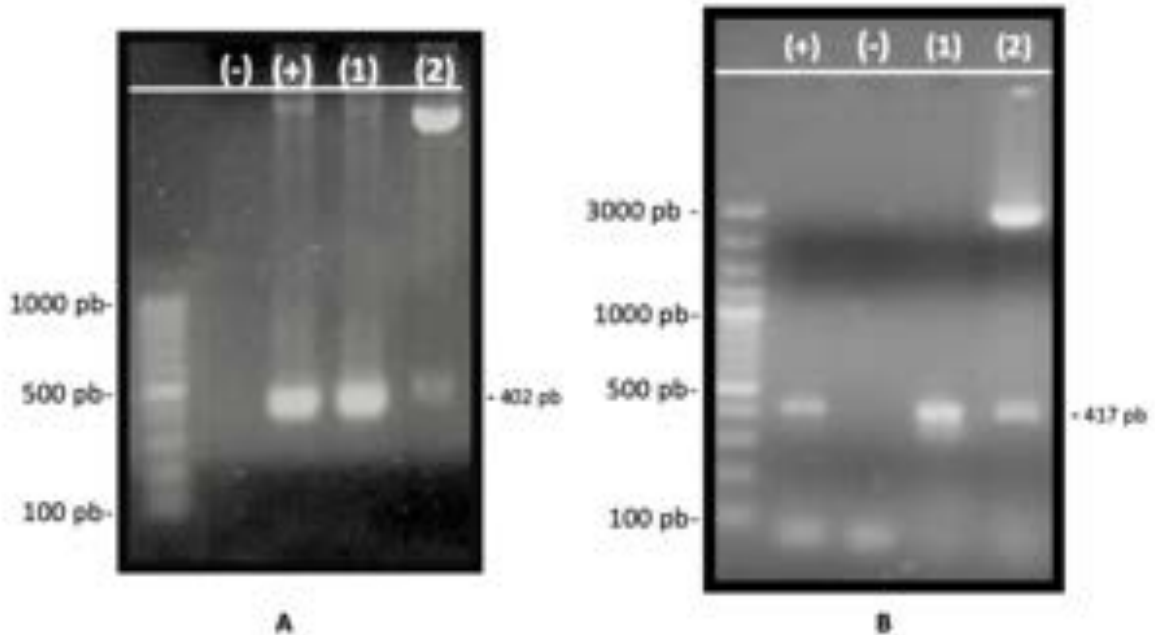


FIGURA 6: Las construcciones PSETC:CoAC y PSETC:CoF tienen los genes de interés. Comprobación de las construcciones PSETC:CoAC y PSETC:CoF mediante PCR y Restricción. A) Análisis de PSETC:CoAC (*Eh_144480*). B) Análisis PSETC:CoF (*Eh_197480*). Los signos corresponden a controles (positivos o negativos) de amplificación. [1] Amplificación del producto por PCR a partir de la construcción correspondiente. [2] Análisis por restricción con las enzimas correspondientes para cada gen.

Adicionalmente, se consideró importante realizar un ensayo preliminar para probar si existía alguna diferencia transcripcional entre los genes *EHI_164480* y *EHI_197480*, por lo que se evaluaron semicuantitativamente los niveles de los RNA mensajeros de estos genes a partir de cDNA obtenido en diferentes periodos de tiempo (6, 12 y 24 h) de cultivos asincrónicos de *E. histolytica*. Como control de carga se utilizó al gen constitutivo *gapdh*, que además sirvió para establecer los valores densitométricos de expresión que se consideraron normales en los diferentes intervalos de tiempo. De manera similar a los resultados de la Tabla 7, los genes que codifican para estas proteínas presentan diferentes perfiles de expresión, lo cual podría tener relación con el proceso fisiológico en que se encuentra este parásito, debido a que existe una caída en el nivel del mensajero de CoAC a las 6 h, mientras que los niveles del mensajero de COF no parecen tener cambios drásticos durante ninguno de los periodos de tiempo evaluados (Figura 7A y 7B).

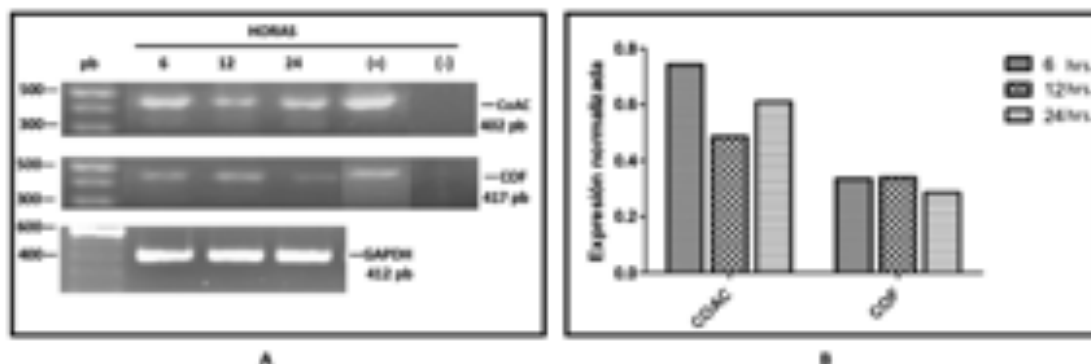


FIGURA 7: Expresión de los genes *EHI_164480* y *EHI_197480* en *Entamoeba histolytica*. A) Análisis del ensayo RT-PCR en gel de agarosa (2%) a diferentes horas de cultivo (6 horas, 12 horas, y 24 horas). B) Análisis densitométrico de la expresión normalizada de los transcritos de CoAC (*EHI_164480*) y COF (*EHI_197480*) empleando como control la expresión del gen GAPDH (+) control positivo de amplificación para cada gen realizado a partir de DNA genómico de *E. histolytica*, (-) control negativo de amplificación (agua en lugar de template).

8.3 Obtención de Anticuerpos Policlonales para CoAC y COF.

Se indujo la producción de las proteínas CoAC y COF recombinantes al transformar las construcciones *pRSETC::CoAC* y *pRSETC::COF* en cepas de *E. coli* BL21 (*DE3*)*p-LysS* y se purificaron mediante cromatografía de afinidad a níquel; esta cromatografía se realizó dos veces y posteriormente se llevó a cabo una electroforesis proteica en condiciones desnaturalizantes (gel de

poliacrilamida-SDS al 15 %) para evaluar el estado de la purificación y de las proteínas. Se logro purificar a las proteínas recombinantes en el peso esperado: 19 kDa para la proteína CoAC (Figura 8) y 20 kDa para la proteína COF (Figura 9).

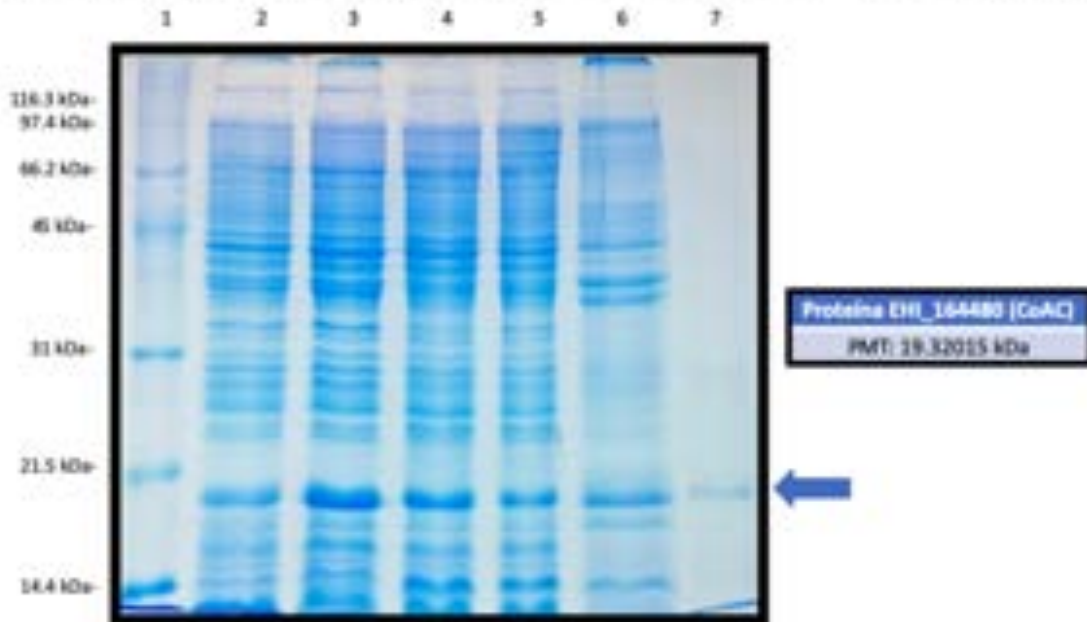


FIGURA 8: Expresión de la proteína recombinante COF. Electroforesis Desnaturalizante en Gel de Poliacrilamida [15%] de la purificación de la proteína CoAC [EHI_164480]. La fecha indica la proteína recombinante CoAC con un peso aproximado de 20 kDa debido a la etiqueta de histidinas. Carriles: 1-Marcador, 2-Sin Inducir, 3-Inducido, 4-Sobrenadante, 5-No unido, 6-Pastilla, 7-Eluido 1

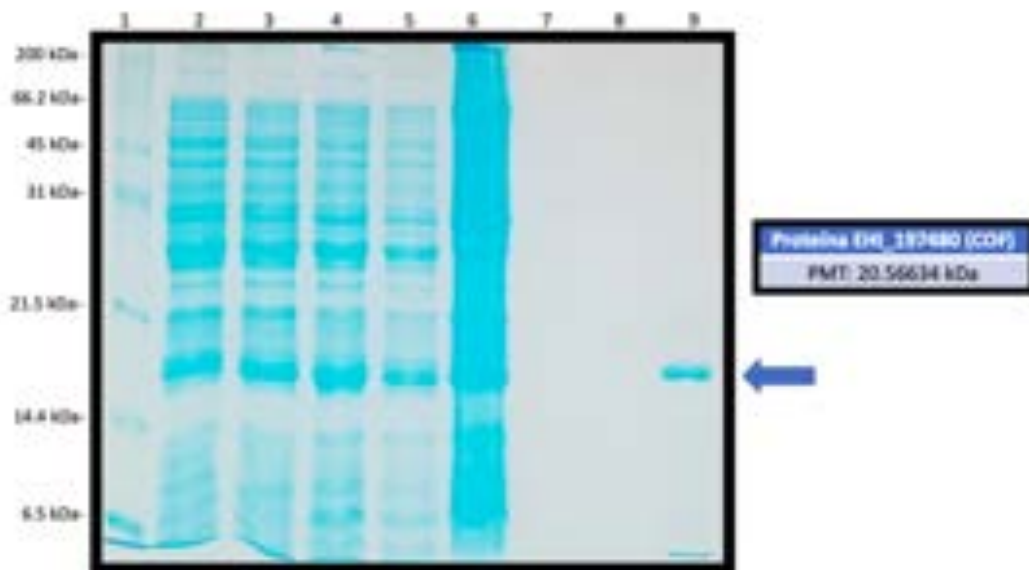


FIGURA 9: Expresión de la proteína recombinante CoAC. Electroforesis Desnaturalizante en Gel de Poliacrilamida [15%] de la purificación de la proteína COF [EHI_197680]. La fecha indica la proteína recombinante CoAC con un peso de 20 kDa debido a la etiqueta de histidinas. Carriles: 1 - Marcador, 2 - Sin Inducir, 3 - Inducido, 4 - Sobrenadante, 5 - No unido, 6 - Pastilla, 7 a 9-Eluidos 1 - 3.

Para comprobar que las proteínas purificadas fueran las de interés para este estudio, se realizó un ensayo de Western Blot con el objetivo de identificar la etiqueta de histidinas de las proteínas recombinantes, para este ensayo se realizó una electroforesis proteica en condiciones desnaturizantes (gel de poliácridamida-SDS al 15 %) y una inmunotransferencia a membranas de nitrocelulosa, para este ensayo se emplearon anticuerpos anti-histidinas en una dilución 1:1000 y para revelar se emplearon anticuerpos anti-IgG de raton acoplados a fosfata alcalina a una dilución 1:5000. Como se puede observarse en la Figura 10A y 10B detectamos señal en el peso esperado para cada una de las proteínas recombinantes (19 kDa para la proteína CoAC y 20 kDa para la proteína COF). Una vez comprobada la purificación de las proteínas, se inició con la producción de anticuerpos policlonales empleando ratones hembras BALB/c y siguiendo el esquema de inmunización de la Tabla 4.

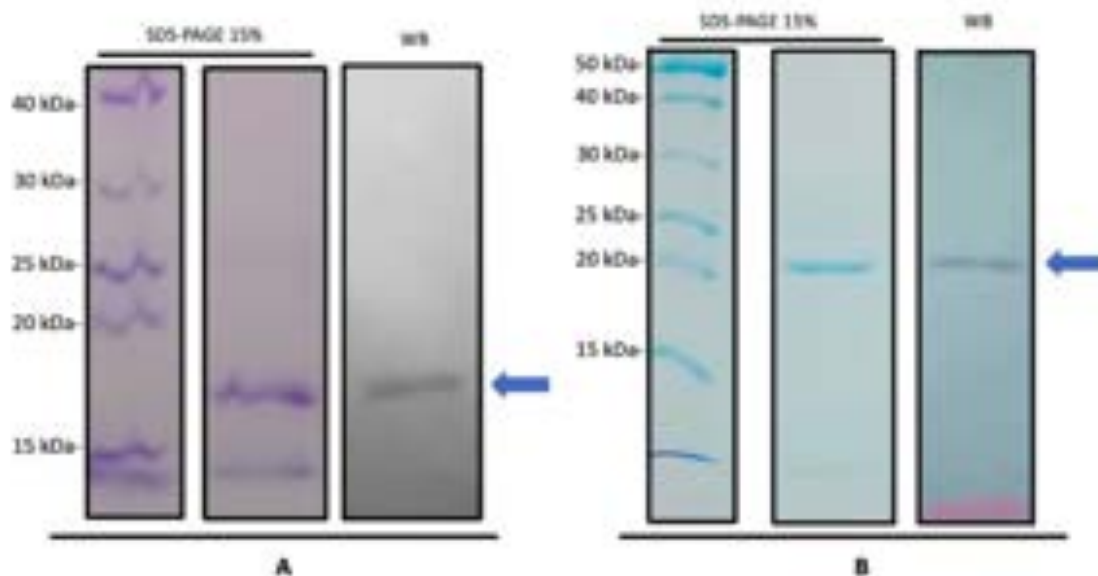


FIGURA 10: Las proteínas recombinantes purificadas tienen etiquetas de histidina. Ensayo de Western Blot a partir de los eluidos obtenidos durante la purificación de las proteínas CoAC y COF utilizando anticuerpos contra la etiqueta de histidinas. **A)** Eluidos de la proteína CoAC (EHI_164480). **B)** Eluidos de la proteína COF (EHI_197680).

Una vez completado el esquema de inmunización, se obtuvo el suero inmune y se evaluó la eficiencia de detección de los anticuerpos, empleando 4 diferentes diluciones: 1:100, 1:1000, 1:5000 y 1:10000, la cuales detectaron a las proteínas recombinantes en el peso esperado (Figura 11).

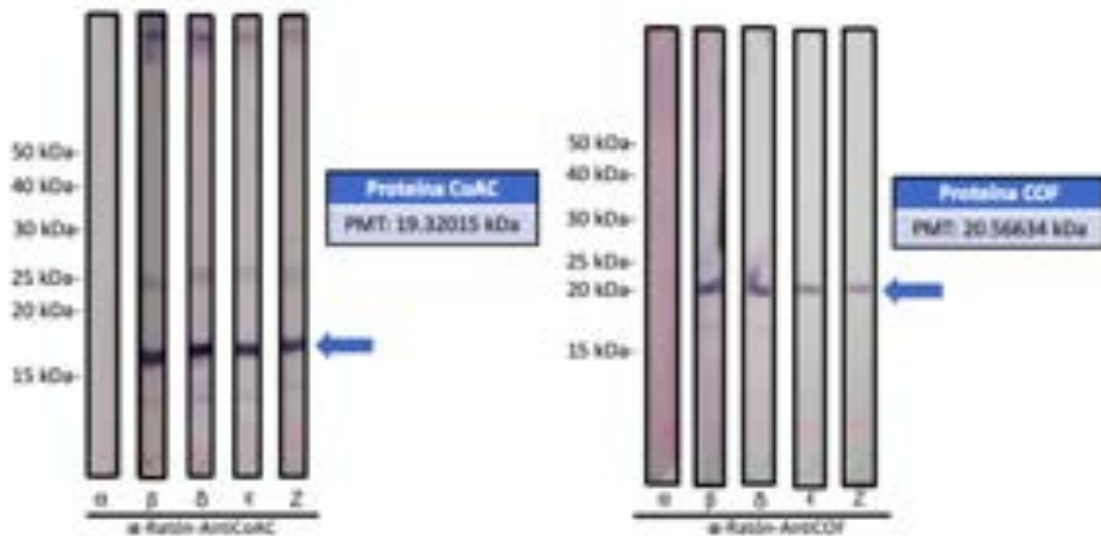


FIGURA 11: Titulación de anticuerpos policlonales. A partir del suero inmune de los ratones, se realizaron titulaciones a diferentes concentraciones de suero con la finalidad de determinar el límite de detección de los mismos. a: Preinmune, b: 1:100, c: 1:1000, e: 1:5000, Z: 1:10000

Posteriormente se evaluó su capacidad para identificar a la proteína nativa en extractos totales de *E. histolytica* utilizando los anticuerpos en una dilución de 1:100. Es importante resaltar que para este ensayo, debido a que se trataba de proteínas silvestres (que no tienen una etiqueta de histidinas) se esperaba un reconocimiento en un peso aproximado de 15 kDa para ambas proteínas. Como puede apreciarse en las Figuras 12A y 12B, los anticuerpos fueron capaces de reconocer una banda del peso esperado, lo que sugiere que se trata de las proteínas de interés.

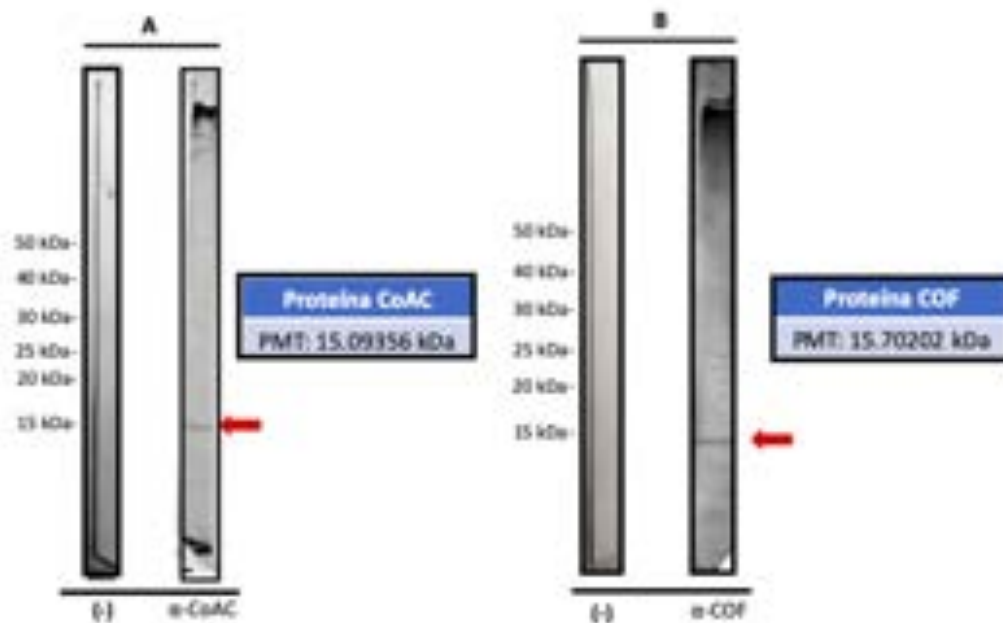


FIGURA 12: Identificación de CoAC y CoF en extractos de proteínas totales de *E. histolytica*. A) WB para la proteína CoAC. B) WB para la proteína COF. Como controles negativos (-) se empalearon membranas sin incluir con el primer anticuerpo.

8.4 Localización subcelular de las proteína CoAC y COF.

Una vez que se corroboró la funcionalidad de los anticuerpos producidos para identificar a las proteínas nativas, se realizaron ensayos de inmunofluorescencia con cultivos asincrónicos de *E. histolytica*. Para estos ensayos, únicamente se fijaron los trofozoitos con paraformaldehído [4 %] durante 60 min y se dejaron incubando con cada anticuerpo (primario y secundario) durante 90 min. Para marcar el núcleo se utilizó Vectashield con Dapi.

Las imágenes obtenidas por microscopía confocal demuestran que ambas proteínas se localizan en el citoplasma de *E. histolytica* (Figura 13 y 14). Resulta interesante observar que la señal de la proteína CoAC se concentra con mayor intensidad en puntos específicos dentro del citoplasma (Figuras 13A y 13B) a diferencia de lo que sucede con la proteína COF en la que no se observan puntos y que parece tener una distribución más uniforme concentrándose con mayor intensidad en la periferia de las parásitos (Figura 14). Adicionalmente se consideró importante determinar y corroborar si las proteínas CoAC y COF se encontraban en la periferia de la membrana celular. Para lograr este objetivo se utilizaron

trofozoítos sin permeabilizar. Como se puede apreciar en la Figuras 15 se detectó marca en la periferia de la membrana citoplasmática, para el caso de la proteína CoAC (*EHI_164480*) se observó una distribución puntiforme en la figura 15 A. Mientras que para la proteína COF se detectó una distribución en forma de "parches" (Figura 15 B).

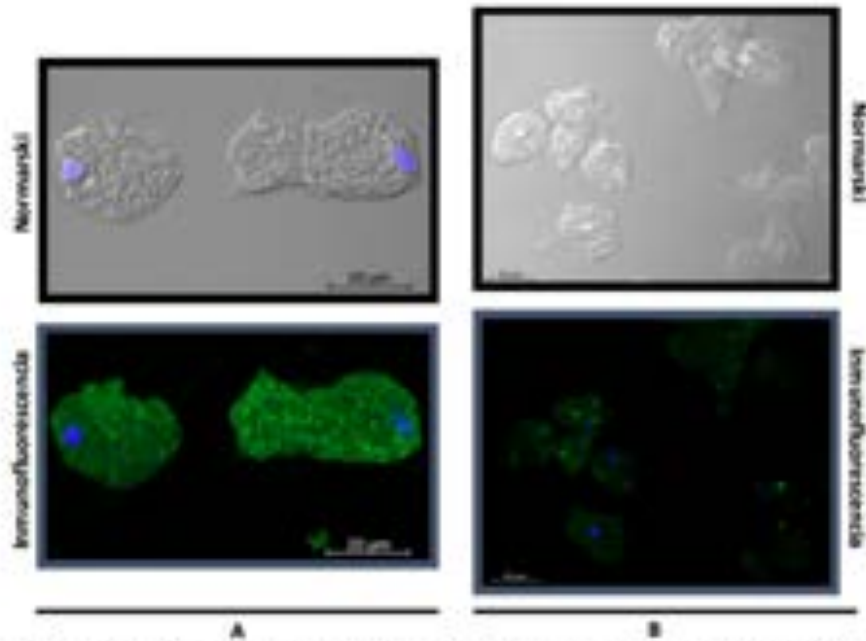


FIGURA 13: La proteína CoAC se concentra en puntos en *E. histolytica*. Identificación de la proteína CoAC *Entamoeba histolytica* utilizando el anticuerpo α -Ratón AntiCoAC [1/50] en cultivos axénicos y asincrónicos de *Entamoeba histolytica*. Como puede observarse en la figura A la proteína se localiza en estructuras puntiformes en el citoplasma del parásito. En la figura B se disminuyó la intensidad con la finalidad de resaltar las estructuras puntiformes.

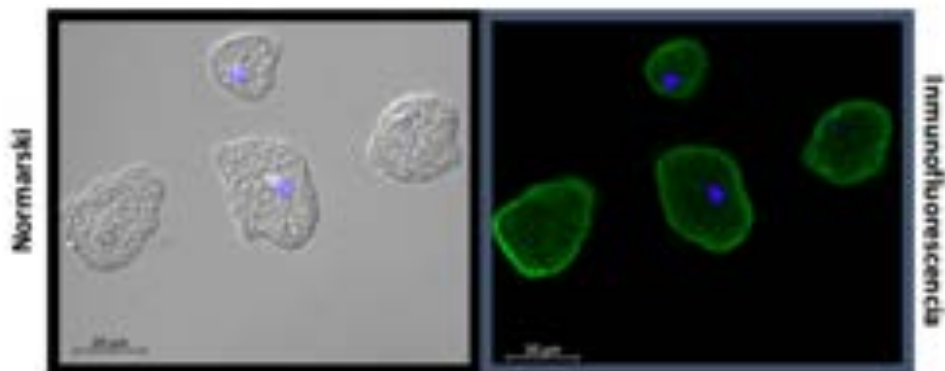


FIGURA 14: La proteína COF se ubica en la periferia celular de *E. histolytica*. Identificación de la proteína COF (*EHI_197480*) en *Entamoeba histolytica* utilizando el anticuerpo α -Ratón AntiCOF [1/50] en cultivos axénicos y asincrónicos de *Entamoeba histolytica*. Como se puede observar la proteína se distribuye por el citoplasma y se concentra con mayor intensidad en la periferia celular del parásito.

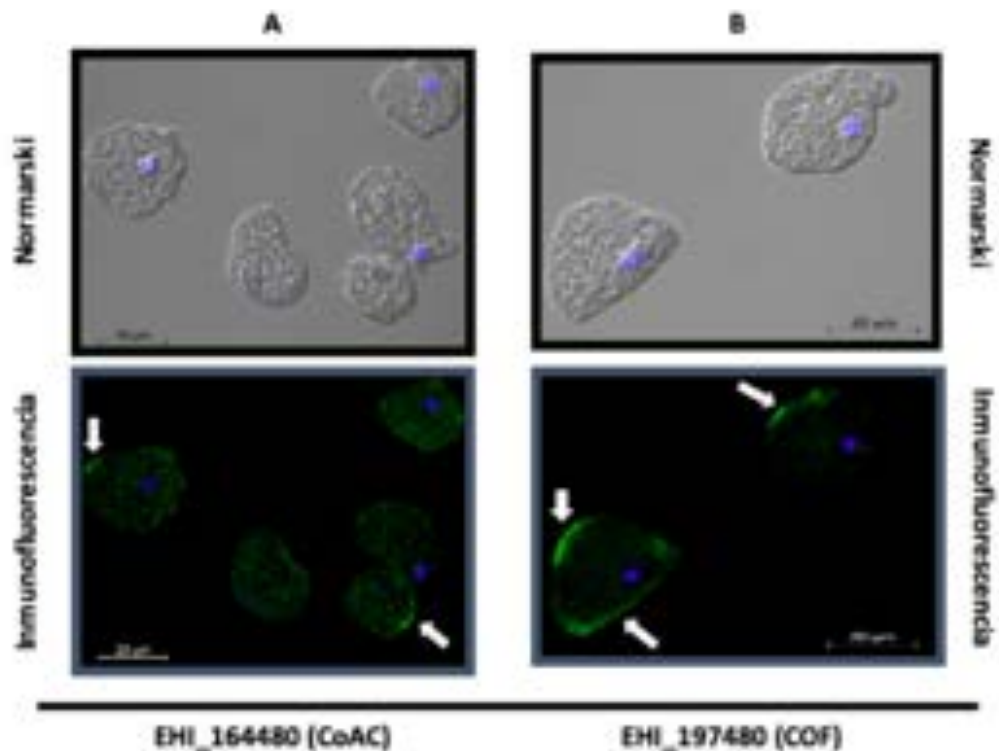


FIGURA 15: Las proteínas CoAC y COF se localizan en la periferia de la membrana celular en *E. histolytica*. Se observó la localización celular de las proteínas CoAC y COF en trofozoitos no permeabilizados de *E. histolytica*. En la figura A se detectó nuevamente a la proteína CoAC en estructuras puntiformes. En la figura B se confirma que la proteína COF se localiza en la periferia del trofozoito.

Por último se decidió evaluar si un estímulo con fibronectina sería capaz de desencadenar la aparición de más estructuras de Cofilina en el citoplasma. Para este ensayo se dejó interactuar trofozoitos de *E. histolytica* con fibronectina durante 1 h. Para el caso de la proteína CoAC no se identificó alteración aparente en la cantidad o localización de esta proteína (Figura 16A) en cambio se observó una concentración de la proteína en algunos pseudópodos (Figura 16B) sugiriendo que esta proteína puede participar en la remodelación de la membrana celular

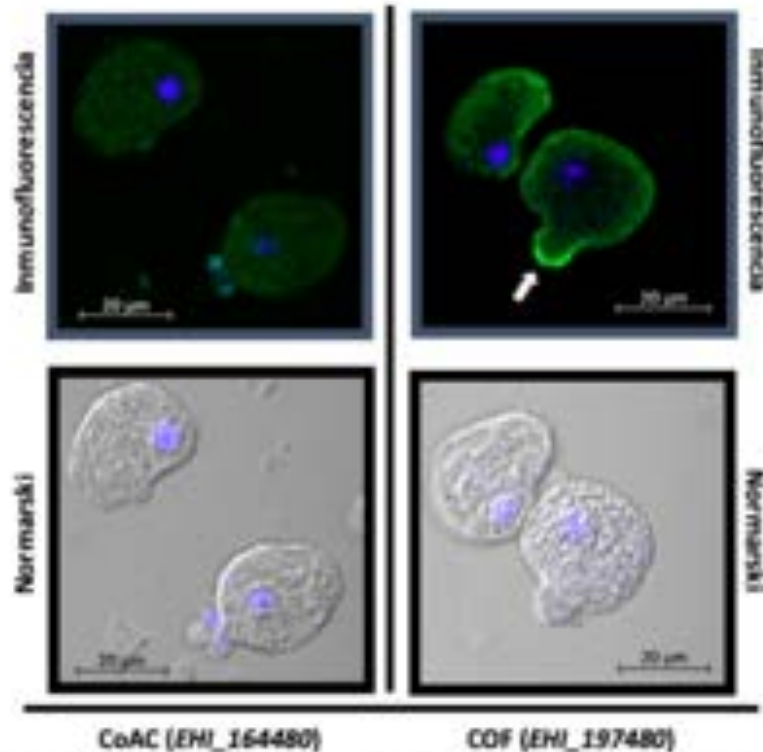


FIGURA 16: Trofozoitos de *Entamoeba histolytica* estimulados con fibronectina. Se determinó si un estímulo con fibronectina incrementaría la formación de nuevas estructuras detectables por los anticuerpos α -Ratón-AntiCoAC y α -Ratón-AntiCOF en trofozoitos estimulados con fibronectina [100 μ g/ μ l] por un periodo de 60 min.

8.5 La proteína COF se identificó mediante WB y Espectrometría de Masas en la Fracción Nuclear de *Entamoeba histolytica*.

Debido al interés del Laboratorio por comenzar con la descripción del transporte nuclear en *E. histolytica*, se decidió iniciar con la caracterización del proteoma presente en las fracciones nucleares de este parásito. Para conseguir este objetivo se separó el contenido proteico de los trofozoitos en dos fracciones una nuclear y otra citoplasmática.

Las fracciones nucleares se analizaron mediante espectrometría de masas MALDI-TOF, los resultados se procesaron y a partir de ellos se generó una tabla (ANEXO 3) en donde se clasifican a las proteínas en 13 categorías con base en su función celular (Figura 16). Es importante mencionar que dentro de la categoría de

las proteínas del citoesqueleto se encontraron las proteínas de Actina (EHI_107290, EHI_164430, EHI_198930) y 4 de las 9 proteínas Cofilinas identificadas en el análisis *in silico* (EHI_197480, EHI_168340, EHI_186770 y EHI_186840). Hasta donde se investigó, nuestro laboratorio es el primer grupo de investigación en iniciar el estudio del nucleoproteoma de *E. histolytica*.

Debido a la identificación de la proteína COF (EHI_197480) en la fracción nuclear mediante espectrometría de masas, se decidió corroborar estos resultados empleando los anticuerpos producidos para identificar a la proteína COF en fracciones Citoplasmáticas y Nucleares. Los resultados mostraron que la proteína COF se encuentra tanto en el núcleo como en el citoplasma (Figura 17A). Donde se detectaron esas proteínas Como control para evaluar la pureza de las fracciones proteínicas del parásito se emplearon anticuerpos contra Histona H1 para la fracción nuclear y Paxilina para la fracción citoplasmática donde se detectaron estas proteínas unicamente en las fracciones correspondientes (Figura

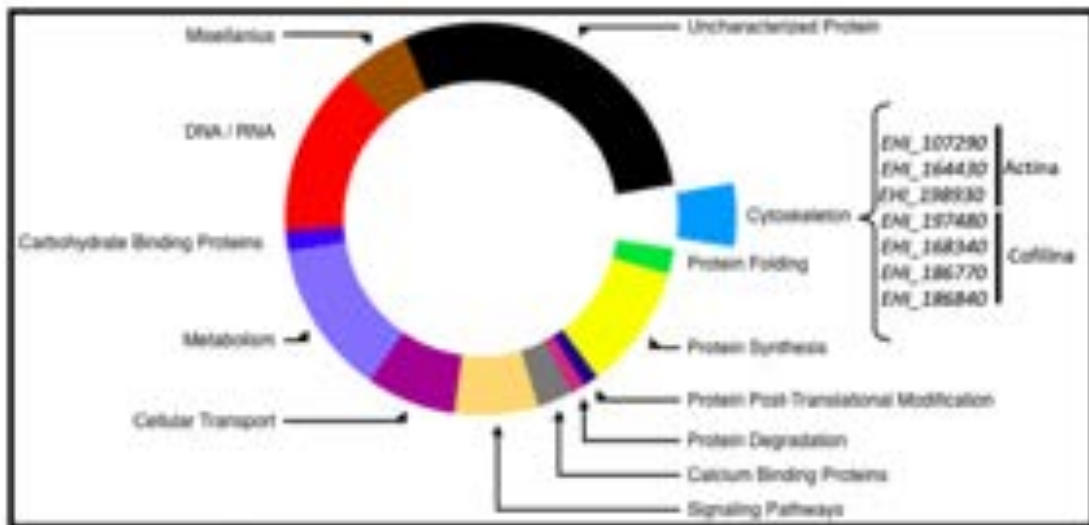


FIGURA 17: Análisis del Nucleoproteoma de *Entamoeba histolytica*. Los datos obtenidos mediante espectrometría de masas de la fracción nuclear de proteínas de *E. histolytica* se analizaron y clasificaron en 13 categorías con base en su función biológica. Dentro de las proteínas agrupadas en el grupo de citoesqueleto encontramos tres proteínas de Actina (EHI_107290, EHI_164430, EHI_198930) y cuatro Cofilinas (EHI_197480, EHI_168340, EHI_186770, EHI_186840).

17B).

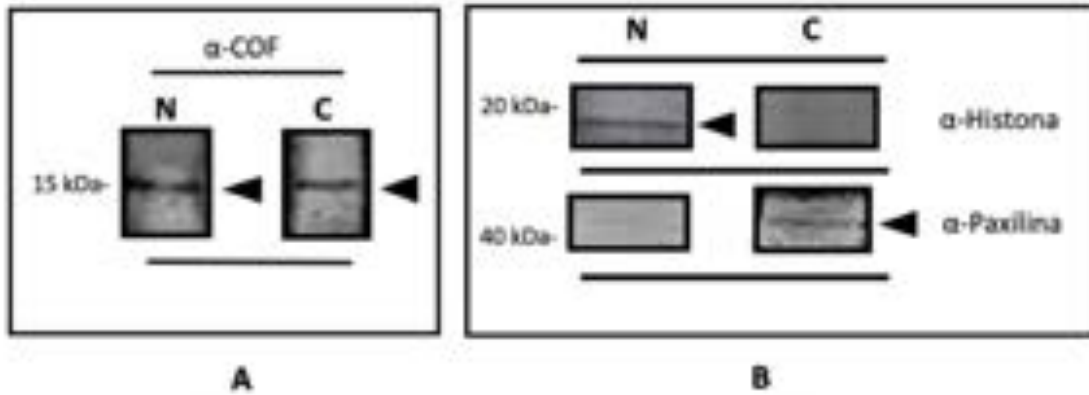


FIGURA 18: La proteína COF, esta presente en la Fracción Nuclear y Citoplasmática de *E. histolytica*. Utilizando anticuerpos específicos α -Cof (1:300) se identificó a la proteína COF (EHL_197480) en las Fracciones Nuclear (N) y Citoplasmática (C) de *E. histolytica*. **A)** Identificación de la proteína COF mediante WB de las fracciones Nucleares y Citoplasmáticas, las flechas indican la detección de la proteína en el peso esperado de 15 kDa. **B)** Ensayo de WB utilizando anticuerpos específicos α -Histona (1:100) y α -Paxilina (1:300) para evaluar la pureza de la fracción Citoplasmática y Nuclear del parásito.

9 DISCUSIÓN

Las proteínas Cofilinas, se encuentran ampliamente distribuidas en la naturaleza y dentro de su secuencia de aminoácidos se encuentra un dominio ADF (actin-depolymerizing factor) el cual le permite a la proteína contribuir a la polimerización y despolimerización de los filamentos de actina, participando de esta manera en la remodelación del citoesqueleto (Bamburg & Bernstein., 2010). Para nuestro laboratorio es de interés iniciar la caracterización de este tipo de proteínas en *E. histolytica* debido a que se ha descrito que se pueden translocar al núcleo (Abe, et al., 1993) y se han identificado como colaboradores en la activación transcripcional de ciertos genes (Obrdlík & Percipalle., 2011), participan en la respuesta al estrés celular (Pendleton, et al., 2003; Munsie, et al., 2012), cooperan en la estructuración del núcleo (Fukui & Katsumaru., 1980) y son parte importante de la maquinaria de translocación nuclear (Miyamoto & Gurdon., 2013; Virtanen & Vartiainen., 2017),

Puesto que en la literatura no existe referencia alguna sobre el transporte nuclear de *E. histolytica*, se decidió comenzar con la caracterización e identificación de cofilinas capaces de entrar en el núcleo celular. A partir del análisis *in silico* se seleccionaron a las proteínas codificadas por los genes *EHI_164480* y *EHI_197480* (CoAC y COF respectivamente) debido a que ambas proteínas han sido identificadas mediante diferentes métodos proteómicos en actividades y ubicaciones diferentes (Tabla 7). En este trabajo se encontró diferencia a nivel de transcriptoma para los transcritos de CoAC y COF (Figura 7 A y 7 B), lo que podría indicar la existencia de una regulación transcripcional diferente entre ambos genes, la cual parece estar relacionada con las horas del cultivo y por lo tanto con su crecimiento. En esta dirección se ha reportado que la expresión de cofilina está relacionada con la migración celular (Yamaguchi & Condeelis., 2007; Popow-Woźniak, et al., 2012) y se ha descrito que la expresión de proteínas con dominios ADF es inversamente proporcional a la cantidad de actina globular disponible en la célula (Minamide, et al., 1997). Por tanto, se puede

hipotetizar que tanto la expresión, como la función de ambas proteínas podría estar asociada a diferentes procesos biológicos en el parásito.

Debido a que las proteínas CoAC y COF poseen dominios ADF es lógico pensar que se distribuyan por el citoplasma, participando de esta forma en el constante remodelamiento de los filamentos de actina (Paavilainen, et al., 2004) permitiendo así la rápida reestructuración del citoplasma y la membrana celular. Gracias a la base de datos bibliográficas generada en el Laboratorio, se pudo comprobar que la proteína COF (*EHI_197480*) se localiza en el citoplasma y en la membrana celular (Tabla 7) tal y como se puede apreciar en la figura 14, en donde la señal de la proteína se distribuye de manera uniforme por todo el citoplasma concentrándose con mayor intensidad en la periferia celular. Este resultado es similar al reportado por Kumar, et al., (2014), quienes caracterizaron a otra proteína con dominio ADF (Coactosina, *EHI_168340*), la cual, además de distribuirse en el citoplasma y en la periferia de la membrana celular, co-localiza con la señal de actina. Por otro lado, los resultados de la proteína CoAC (*EHI_164480*) demuestran que además de distribuirse por el citoplasma se concentra en focos específicos (Figura 13 A y 13 B), similar a los parches de actina identificados en *S. cerevisiae* que sirven como centros de remodelación para los filamentos de actina (Lappalainen & Drubin., 1997). Los resultados sugieren que los puntos de mayor tamaño observados en la figura 13 B podrían ser focos de adhesión en donde el trofozoito ha establecido contacto con la superficie del cubre objetos de manera similar a los descritos por Vázquez, et al., 1995. Además, se identificaron otros puntos de menor tamaño dentro del citoplasma (Figura 13 A), que son similares a los "Actin Dot like structures", los cuales son estructuras que han sido descritas en otros trabajos y cuya ubicación ha sido reportada como ventral en las amibas (Grebecka, et al., 1997; Manich, et al., 2018). Estos "Actin Dot like structures" son parte importante de los invadosomas, estructuras que dependen de la proteína Rab21 para formarse (Emmanuel, et al., 2015), y que se caracterizan por ser estructuras de corta duración y estar involucradas en el proceso de invasión tisular (Hasan, et al.,

2018). Debido a su distribución y su homología estructural, estos "Cofilin Dots" podrían ser similares a los puntos de actina, donde la cofilina podría estar colaborando con la reestructuración de los filamentos de actina. Además, es importante mencionar que se identificaron estos puntos de cofilina en trofozoitos que no fueron estimulados con fibronectina, lo que es necesario para la formación de los puntos de actina (Emmanuel, et al., 2015; Hasan, et al., 2018), y debido a que en ninguno de los ensayos de microscopía se realizó marcaje específico para actina no podemos asegurar ni descartar que en estos puntos se esté llevando a cabo la remodelación de actina.

Ya que la proteína CoAC (*EHI_164480*) no se identificó en la membrana celular (Tabla 7), pero debido a que las imágenes de confocal mostraron que los puntos de cofilina se observaron en las cercanías de la membrana celular (figura 13 A), se decidió comprobar si esta proteína se ubica en la periferia de la membrana celular, y para ello se utilizaron trofozoitos no permeabilizados con la finalidad de conservar la integridad de la membrana celular. Los resultados obtenidos demuestran que tanto la proteína CoAC como la proteína COF se encuentran en zonas específicas de la membrana celular (Figura 15). Además, cabe mencionar que nuevamente se detectaron puntos de cofilina para la proteína CoAC (*EHI_164480*) como se aprecia en la figura 15 A, lo cual fortalece la propuesta de que estas estructuras son independientes de las *Actin Dot like structures* propias de los invadosomas, ya que al tratarse de trofozoitos no permeabilizados la señal de los puntos de cofilina están en la superficie y la periferia de la membrana celular. Resulta oportuno mencionar que esta señal puntiforme observada en este trabajo es similar a la distribución de la señal de Ehformin-2, que se observa en el trabajo de Majumder & Lohia (2008), al ayunar durante 12 h. trofozoitos de *E. histolytica* en medio incompleto y posteriormente colocándolos en medio completo con suero durante 30 min., cabe resaltar que la conclusión de este trabajo es que existe una asociación entre la proteína (Ehformin-2) con filamentos de actina.

Como se ha reportado que la interacción de trofozoitos de *E. histolytica* con fibronectina es un fuerte inductor de la remodelación del citoesqueleto (Talamás-Rohana & Meza., 1988; Vázquez, et al., 1995), se decidió comprobar si este tipo de estímulo podría intensificar la formación de estructuras en el citoplasma. Debido a que en la literatura se han empleado diferentes intervalos de tiempo, que van de 10 minutos a 36 h. en la interacción Trofozoito-Fibronectina (Talamás-Rohana & Meza., 1988; Soid-Raggi, et al., 1998; Franco, et al., 2002; Emmanuel, et al., 2015; Sierra-López, et al., 2018; Hasan, et al., 2018;), se decidió poner a interactuar a trofozoitos de *E. histolytica* en cubreobjetos con fibronectina durante 60 minutos. Es importante señalar que los resultados no mostraron un incremento en la formación de estructuras previamente descritas en este trabajo, ni se observó ningún tipo de reestructuración intensa del citoplasma en la mayoría de la amibas observadas. Únicamente se identificó que la señal de la proteína COF se ubicó con mayor intensidad en la periferia de la membrana (figura 16 B) y contrariamente a lo observado en las figuras 13 y 15 A, para la proteína CoAC no se identificó señal de ninguna estructura puntiforme (Figura 16 A). Estos resultados son atribuidos a la posibilidad de que el tiempo de interacción fue excesivo y que probablemente la actividad de estos puntos de cofilina tienen picos de actividad cortos, de manera similar a los resultados reportados por Javier-Reyna, et al., 2012, quienes en uno de sus experimentos evaluaron la distribución de la proteína Rab7 (proteína involucrada en el tráfico vesicular) en diferentes periodos de tiempo (0, 5, 15, 30, 60 y 300 minutos) al poner a interactuar trofozoitos de *E. histolytica* con fibronectina y reportaron que a los 60 min. de interacción el patrón de distribución de Rab7 (que a los 30 min. se ubica en la periferia de la membrana celular) regresaba a valores basales (cuando la proteína Rab7 se ubica de manera uniforme en citoplasma) observados en periodos de interacción iniciales (0–15 min.).

La presencia de proteínas citoplasmáticas en el núcleo celular es un tema que ha adquirido importancia en los últimos años, siendo Fukui., (1978) uno de los primeros autores en describir la formación de microfilamentos de actina dentro del núcleo celular de *Dictyostelium* al emplear dimetil sulfoxido para inducir la

formación de estos filamentos, llegando a la conclusión de que dentro del núcleo celular hay actina y que de alguna manera, las proteínas involucradas en el remodelamiento y formación de los filamentos de actina (como Cofilina, Profilina y ABP) deberían poder entrar al núcleo mediante un mecanismo hasta ese momento desconocido.

Actualmente se sabe que dentro de la secuencia aminoacídica de la proteína COF-1 de humano se encuentra presente una secuencia de localización nuclear clásica bipartita (Munsie., et al.,2012), la cual le otorga la capacidad de entrar al núcleo celular sin la necesidad de requerir de una importina alfa, como sucede en las vías de importe nuclear clásico, en donde se requiere de la formación de un complejo ternario que involucra, a la proteína cargo con NLS, una importina alfa que funciona como adaptador, y una importina beta que media el paso a través del poro nuclear (Okada, et al., 2008).

Este mecanismo de importe nuclear no clásico se lleva a cabo gracias a que las importinas beta (que pertenecen a la familia de las proteínas transportadoras beta karioferinas) se caracterizan por tener dominios HEAT en tándem, que les permiten interactuar directamente con proteínas que tengan NLS sin la necesidad de un adaptador (De Corte., et al.,2004). Los análisis bioinformáticos realizados en este trabajo sobre las proteínas *EHI_164480* (CoAC) y *EHI_197480* (COF) fueron negativos en la identificación de posibles secuencias clásicas de localización nuclear bipartitas o monopartitas (Tabla 7), lo cual indicaría que estas proteínas son incapaces de permear al núcleo celular. No obstante, es importante mencionar que la translocación nuclear que depende de transportadores de la familia de las karioferinas beta (como es el caso del transporte de cofilina al núcleo celular) no necesita exclusivamente de secuencias clásicas de localización nuclear, debido a que las proteínas de esta familia pueden reconocer secuencias alternativas denominadas como "Non Classical Nuclear Localisation Signals" (ncNLS) o como "Atypical Nuclear Localisation Signals" (Marfori, et al.,2011; Kim, et al., 2017), las cuales no poseen una secuencia

conservada de aminoácidos básicos como en el caso de las secuencias de localización clásicas (Park, et al., 2006; Korlimaria, et al., 2013). Estas secuencias no clásicas han sido identificadas en proteínas involucradas en cascadas de señalización o en proteínas virales, y requieren únicamente de la interacción con proteínas importinas Beta específicas para poder atravesar el poro nuclear (Chook & Blobel., 2001; Chook & Süel., 2011; Flores & Seger., 2013;), y ya se ha reportado que existen proteínas con secuencias no clásicas de importe nuclear capaces de alcanzar el núcleo celular (Cherezova, et al., 2011). Además, existe evidencia experimental que muestra que para que la cofilina pueda translocar al núcleo celular requiere de la participación de la proteína importina 9 (Beta karioferina), ya que el silenciamiento de esta proteína disminuye la presencia de la proteína cofilina (así como de la actina) en el núcleo celular (Dopie., et al., 2012).

Con base en lo expuesto, se decidió realizar inmunodetecciones por WB en fracciones nucleares y citoplasmáticas de proteínas de *E. histolytica*, debido a que no se identificó a la proteína CoAC mediante espectrometría de masas en las proteínas de la fracción nuclear, pero sí a la proteína COF (Figura 17) se realizó únicamente el ensayo de Western Blot para la proteína COF, la cual se identificó en las fracciones citoplasmática y nuclear (Figura 18), estos resultados, en conjunto con los obtenidos mediante espectrometría de masas (Figura 17 y Anexo 3) donde se identificaron también a las cofilinas codificadas por los genes *EHI_168340*, *EHI_186770* y *EHI_186840*, sugieren que en *E. histolytica* estas proteínas poseen secuencias de localización nuclear no clásicas que únicamente requieren de beta karioferinas para poder entrar al núcleo. Además, gracias al análisis *in silico* adicional realizado a las otras 3 proteínas que han sido implicadas en el transporte nuclear (Importina 9, Exportina 6 y Profilina) se logró identificar en el genoma de *Entamoeba histolytica* 10 genes que codifican para proteínas importinas 9 (Anexo 2), las cuales han sido descritas como las beta importinas específicas para el transporte de cofilina y actina al núcleo (Izdebska, et al., 2016).

10 CONCLUSIONES

1. El genoma de *E. histolytica* contiene 10 genes que codifican para proteínas con dominios ADF, pero dos parecen ser alelos de un mismo gen.
2. No se identificaron dominios NLS en ninguna de las cofilinas amebianas.
3. La proteína CoAC se identificó como parte de estructuras puntiformes (Cofilin Dots) ubicadas en las cercanías de la membrana celular.
4. La proteína COF se identificó en el citoplasma y en la periferia de la membrana celular de *E. histolytica*.
5. La fracción nuclear de *Entamoeba histolytica* contiene 4 Cofilinas, entre ellas la proteína COF.

11 PERSPECTIVAS

- Caracterizar bioquímicamente las proteínas CoAC y COF.
- Realizar ensayos de inmunofluorescencia y co-localización empleando los anticuerpos generados en este trabajo (anti-CoAC y anti-COF) y marcaje específico para actina (*Rhodamine Phalloidin*).
- Realizar ensayos de inmunofluorescencia con trofozoitos estimulados con fibronectina en diferentes intervalos de tiempo, empleando marcadores contra actina y los anticuerpos anti-cofilinas generados en este trabajo.
- Realizar ensayos de RT-PCR cuantitativa para evaluar los niveles de expresión de ambas proteínas en diferentes intervalos de tiempo.

- Realizar ensayos de inmunoprecipitación para identificar las proteínas que se encuentran formando complejos con la proteína COF en la fracción nuclear de este parásito.

12 BIBLIOGRAFÍA

- Abe, H., Nagaoka, R., & Obinata, T. (1993). Cytoplasmic localization and nuclear transport of cofilin in cultured myotubes. *Experimental Cell Research*, 206(1), 1-10.
- Aguirre García, M., Gutiérrez-Kobeh, L., & López Vancell, R. (2015). *Entamoeba histolytica*: adhesins and lectins in the trophozoite surface. *Molecules*, 20(2), 2802-2815.
- Bamburg, J. R., & Bernstein, B. W. (2010). Roles of ADF/cofilin in actin polymerization and beyond. *F1000 biology reports*, 2.
- Bamburg, J. R., & Bray, D. (1987). Distribution and cellular localization of actin depolymerizing factor. *The Journal of Cell Biology*, 105(6), 2817-2825.
- Bamburg, J. R., Harris, H. E., & Weeds, A. G. (1980). Partial purification and characterization of an actin depolymerizing factor from brain. *FEBS Letters*, 121(1), 178-182.
- Belin, B. J., Lee, T., & Mullins, R. D. (2015). DNA damage induces nuclear actin filament assembly by Formin-2 and Spire-1/2 that promotes efficient DNA repair. *Elife*, 4, e07735.
- Berdieva, M., Bogolyubov, D., Podlipaeva, Y., & Goodkov, A. (2016). Nucleus-associated actin in *Amoeba proteus*. *European Journal of Protistology*, 56, 191-199.
- Campos-Parra, A. D., Hernández-Cuevas, N. A., Hernández-Rivas, R. and Vargas, M. (2010). EhNCABP166: A nucleocytoplasmic actin-binding protein from *Entamoeba histolytica*. *Molecular & Biochemical Parasitology* 172, 19–30.
- Cherezova, L., Burnside, K. L., & Rose, T. M. (2011). Conservation of complex nuclear localization signals utilizing classical and non-classical nuclear import pathways in LANA homologs of KSHV and RFHV. *PLoS One*, 6(4), e18920.
- Chhabra, D., & dos Remedios, C. G. (2008). Actin: An overview of its structure and function. In *Actin-Binding Proteins and Disease* (pp. 1-15). Springer, New York, NY.
- Chook, Y. M., & Süel, K. E. (2011). Nuclear import by karyopherin-βs: recognition and inhibition. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1813(9), 1593-1606.
- Chook, Y., & Blobel, G. (2001). Karyopherins and nuclear import. *Current Opinion in Structural Biology*, 11(6), 703-715.
- Chua, B. T., Volbracht, C., Tan, K. O., Li, R., Victor, C. Y., & Li, P. (2003). Mitochondrial translocation of cofilin is an early step in apoptosis induction. *Nature Cell Biology*, 5(12), 1083.
- Clark, T. G., & Merriam, R. W. (1977). Diffusible and bound actin in nuclei of *Xenopus laevis* oocytes. *Cell*, 12(4), 883-891.
- Cooke, R. (1975). Role of the bound nucleotide in the polymerization of actin. *Biochemistry*, 14(14), 3250-3256.

- de Boor, S., Kryphausen, P., Kuhlmann, N., Wroblowski, S., Brenig, J., Scislowski, & Lammers, M. (2015). Small GTP-binding protein Ran is regulated by posttranslational lysine acetylation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(28), E3679-E3688.
- De Corte, V., Van Impe, K., Bruyneel, E., Boucherie, C., Mareel, M., Vandekerckhove, J., & Gettemans, J. (2004). Increased importin- β -dependent nuclear import of the actin modulating protein CapG promotes cell invasion. *Journal of Cell Science*, 117(22), 5283-5292.
- 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. doi: 10.1016/0035-9203(78)90144-X
- Dominguez, R., & Holmes, K. C. (2011). Actin structure and function. *Annual Review of Biophysics*, 40, 169-186.
- Dopie, J., Skarp, K. P., Rajakylä, E. K., Tanhuanpää, K., & Vartiainen, M. K. (2012). Active maintenance of nuclear actin by importin 9 supports transcription. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(9), E544-E552.
- Egly, J. M., Miyamoto, N. G., Moncollin, V., & Chambon, P. (1984). Is actin a transcription initiation factor for RNA polymerase B?. *The EMBO Journal*, 3(10), 2363-2371.
- Emmanuel, M., Nakano, Y. S., Nozaki, T., & Datta, S. (2015). Small GTPase Rab21 mediates fibronectin induced actin reorganization in *Entamoeba histolytica*: implications in pathogen invasion. *PLoS pathogens*, 11(3), e1004666.
- Flores, K., & Seger, R. (2013). Stimulated nuclear import by β -like importins. *F1000prime reports*, 5.
- Franco, E., Manning-Cela, R., & Meza, I. (2002). ORIGINAL ARTICLE Signal Transduction in *Entamoeba histolytica* Induced by Interaction with Fibronectin: Presence and Activation of Phosphokinase A and Its Possible Relation to Invasiveness. *Archives of Medical Research*, 33(4), 389-397.
- Freitas, N., & Cunha, C. (2009). Mechanisms and signals for the nuclear import of proteins. *Current Genomics*, 10(8), 550.
- Fukui, Y. (1978). Intranuclear actin bundles induced by dimethyl sulfoxide in interphase nucleus of *Dictyostelium*. *The Journal of Cell Biology*, 76(1), 146-157.
- Fukui, Y., & Katsumaru, H. (1980). Dynamics of nuclear actin bundle induction by dimethyl sulfoxide and factors affecting its development. *The Journal of Cell Biology*, 84(1), 131-140.
- Gómez, J., Cortés, J. A., Cuervo, S. I., & López, M. C. (2007). Amebiasis intestinal. *Infection?*, 11(1), 36-45.
- González Vázquez, M. C., Carabarin Lima, A., Baylon Pacheco, L., & Rosales Encina, J. L. (2012). De amibas y amebiasis: *Entamoeba histolytica*. *Elementos* 87, 13-18
- Grebecka, L., Pomorski, P., Gre, A., & Łopatońska, A. (1997). Adhesion-Dependent F-Actin pattern In *Amoeba proteus* as a common feature of amoebae and the metazoan motile Cells. *Cell Biology International*, 21(9), 565-573.
- Gunning, P. W., Ghoshdastider, U., Whitaker, S., Popp, D., & Robinson, R. C. (2015). The evolution of compositionally and functionally distinct actin filaments. *Journal of Cell Science*, jcs-165563.

- Hasan, M. M., Teixeira, J. E., & Huston, C. D. (2018). Invadosome-mediated human extracellular matrix degradation by *Entamoeba histolytica*. *Infection and Immunity*, 86(9), e00287-18.
- Iida, K., Matsumoto, S., & Yahara, I. (1992). The KKRKK sequence is involved in heat shock-induced nuclear translocation of the 18-kDa actin-binding protein, cofilin. *Cell Structure and Function*, 17(1), 39-46.
- Izdebska, M., Grzanka, D., Gagat, M., Halas-Wisniewska, M., & Grzanka, A. (2016). Downregulation of importin-9 protects MCF-7 cells against apoptosis induced by the combination of garlic-derived alliin and paclitaxel. *Oncology Reports*, 35(5), 3084-3093.
- Javier-Reyna, R., Hernández-Ramírez, V. I., González-Robles, A., Galván-Mendoza, I., Osorio-Trujillo, C., & Talamás-Rohana, P. (2012). Rab7 and actin cytoskeleton participate during mobilization of β 1EHFNR in fibronectin-stimulated *Entamoeba histolytica* trophozoites. *Microscopy Research and Technique*, 75(3), 285-293.
- Jockusch, B. M., Becker, M., Hindennach, I., & Jockusch, H. (1974). Slime mould actin: homology to vertebrate actin and presence in the nucleus. *Experimental Cell Research*, 89(2), 241-246.
- Kalab, P., & Heald, R. (2008). The RanGTP gradient—a GPS for the mitotic spindle. *Journal of Cell Science*, 121(10), 1577-1586.
- Kalendová, A., Kalasová, I., Yamazaki, S., Uličná, L., Harata, M., & Hozák, P. (2014). Nuclear actin filaments recruit cofilin and actin-related protein 3, and their formation is connected with a mitotic block. *Histochemistry and Cell Biology*, 142(2), 139-152.
- Kanellos, G., & Frame, M. C. (2016). Cellular functions of the ADF/cofilin family at a glance. *Journal of Cell Science*, 129(17), 3211-3218.
- Kanellos, G., Zhou, J., Patel, H., Ridgway, R. A., Huels, D., Gurniak, C. B., & Brunton, V. G. (2015). ADF and Cofilin1 control actin stress fibers, nuclear integrity, and cell survival. *Cell Reports*, 13(9), 1949-1964.
- Kim, Y. H., Han, M. E., & Oh, S. O. (2017). The molecular mechanism for nuclear transport and its application. *Anatomy & Cell Biology*, 50(2), 77-85.
- Klamt, F., Zdanov, S., Levine, R. L., Pariser, A., Zhang, Y., Zhang, B., & Shacter, E. (2009). Oxidant-induced apoptosis is mediated by oxidation of the actin-regulatory protein cofilin. *Nature Cell Biology*, 11(10), 1241.
- Korimarla, A., Bhandary, L., Prabhu, J. S., Shankar, H., Sankaranarayanan, H., Kumar, P. & Sridhar, T. S. (2013). Identification of a non-canonical nuclear localization signal (NLS) in BRCA1 that could mediate nuclear localization of splice variants lacking the classical NLS. *Cellular & Molecular Biology Letters*, 18(2), 284.
- Kremneva, E., Makkonen, M. H., Skwarek-Maruszewska, A., Gateva, G., Michelot, A., Dominguez, R., & Lappalainen, P. (2014). Cofilin-2 controls actin filament length in muscle sarcomeres. *Developmental Cell*, 31(2), 215-226.
- Kudryashov, D. S., & Reister, E. (2013). ATP and ADP actin states. *Biopolymers*, 99(4), 245-256.
- Kumar, N., Mazumder, M., Dutta, P., Maiti, S., & Gourinath, S. (2014). EhCoactosin stabilizes actin filaments in the protist parasite *Entamoeba histolytica*. *PLoS Pathogens*, 10(9), e1004362.
- Lappalainen, P., & Drubin, D. G. (1997). erratum: Cofilin promotes rapid actin filament turnover in vivo. *Nature*, 389(6647), 211.

- Lesh, F. A. (1975). Massive development of amebas in the large intestine. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 24(3), 383-392.
- Macara, I. G. (2001). Transport into and out of the nucleus. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 65(4), 570-594.
- Majumder, S., & Lohia, A. (2008). *Entamoeba histolytica* encodes unique formins, a subset of which regulates DNA content and cell division. *Infection and Immunity*, 76(6), 2368-2378.
- Manich, M., Hernandez-Cuevas, N., Ospina-Villa, J. D., Syan, S., Marchat, L. A., Olivo-Marin, J. C., & Guillén, N. (2018). Morphodynamics of the actin-rich cytoskeleton in *Entamoeba histolytica*. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 8, 179.
- Marfori, M., Mynott, A., Ellis, J. J., Mehdi, A. M., Saunders, N. F., Curmi, P. M., ... & Kobe, B. (2011). Molecular basis for specificity of nuclear import and prediction of nuclear localization. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1813(9), 1562-1577.
- Mi-ichi, F., Yoshida, H., & Hamano, S. (2016). *Entamoeba* Encystation: New Targets to Prevent the Transmission of Amebiasis. *PLoS Pathogens*, 12(10), e1005845.
- Minamide, L. S., Painter, W. B., Schvezov, G., Gunning, P., & Bamburg, J. R. (1997). Differential regulation of actin depolymerizing factor and cofilin in response to alterations in the actin monomer pool. *Journal of Biological Chemistry*, 272(13), 8303-8309.
- Miyamoto, K., & Gurdon, J. B. (2013). Transcriptional regulation and nuclear reprogramming: roles of nuclear actin and actin-binding proteins. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 70(18), 3289-3302.
- Moncada, D., Keller, K., & Chadee, K. (2003). *Entamoeba histolytica* cysteine proteinases disrupt the polymeric structure of colonic mucin and alter its protective function. *Infection and Immunity*, 71(2), 838-844.
- Moncada, D., Keller, K., & Chadee, K. (2005). *Entamoeba histolytica*-secreted products degrade colonic mucin oligosaccharides. *Infection and Immunity*, 73(6), 3790-3793.
- Munsie, L. N., Desmond, C. R., & Truant, R. (2012). Cofilin nuclear-cytoplasmic shuttling affects cofilin-actin rod formation during stress. *Journal of Cell Science*, 125(17), 3977-3988.
- Nishida, E., Maekawa, S., & Sakai, H. (1984). Cofilin, a protein in porcine brain that binds to actin filaments and inhibits their interactions with myosin and tropomyosin. *Biochemistry*, 23(22), 5307-5313.
- Obrdlík, A., & Percipalle, P. (2011). The F-actin severing protein cofilin-1 is required for RNA polymerase II transcription elongation. *Nucleus*, 2(1), 72-79.
- Oka, M., & Yoneda, Y. (2018). Importin α : functions as a nuclear transport factor and beyond. *Proceedings of the Japan Academy, Series B*, 94(7), 259-274.
- Okada, N., Ishigami, Y., Suzuki, T., Kaneko, A., Yasui, K., Fukutomi, R., & Isemura, M. (2008). Importins and exportins in cellular differentiation. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 12(5b), 1863-1871.
- Ossareh-Nazari, B., Gwizdek, C., & Dargemont, C. (2001). Protein export from the nucleus. *Traffic*, 2(10), 684-689.
- Paavilainen, V. O., Bertling, E., Falck, S., & Lappalainen, P. (2004). Regulation of cytoskeletal dynamics by actin-monomer-binding proteins. *Trends in Cell Biology*, 14(7), 386-394.

- Park, H., Seo, Y., Kim, J. I., Kim, W. J., & Choe, S. Y. (2006). Identification of the nuclear localization motif in the ETV6 (TEL) protein. *Cancer Genetics and Cytogenetics*, 167(2), 117-121.
- Peifer, M., Berg, S., & Reynolds, A. B. (1994). A repeating amino acid motif shared by proteins with diverse cellular roles. *Cell*, 76(5), 789-791.
- Pendleton, A., Pope, B., Weeds, A., & Koffler, A. (2003). Latrunculin B or ATP depletion induces cofilin-dependent translocation of actin into nuclei of mast cells. *Journal of Biological Chemistry*, 278(16), 14394-14400.
- Percipalle, P. (2013). Co-transcriptional nuclear actin dynamics. *Nucleus*, 4(1), 43-52.
- Pollard, T. D. (2016). Actin and actin-binding proteins. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, a018226.
- Popow-Woźniak, A., Mazur, A. J., Mannherz, H. G., Małicka-Błaszczkiewicz, M., & Nowak, D. (2012). Cofilin overexpression affects actin cytoskeleton organization and migration of human colon adenocarcinoma cells. *Histochemistry and Cell Biology*, 138(5), 725-736.
- Pumroy, R. A., & Cingolani, G. (2015). Diversification of importin- α isoforms in cellular trafficking and disease states. *Biochemical Journal*, 466(1), 13-28.
- Ralston, K. S., & Petri, W. A. (2011). Tissue destruction and invasion by *Entamoeba histolytica*. *Trends in Parasitology*, 27(6), 254-263.
- Sateriale, A., & Huston, C. D. (2011). A sequential model of host cell killing and phagocytosis by *Entamoeba histolytica*. *Journal of Parasitology Research*, 2011.
- Sen, B., Xie, Z., Uzer, G., Thompson, W. R., Styner, M., Wu, X., & Rubin, J. (2015). Intranuclear actin regulates osteogenesis. *Stem Cells*, 33(10), 3065-3076.
- Sharili, A. S., Kenny, F. N., Vartiainen, M. K., & Connelly, J. T. (2016). Nuclear actin modulates cell motility via transcriptional regulation of adhesive and cytoskeletal genes. *Scientific Reports*, 6, 33893.
- Sierra-López, F., Baylón-Pacheco, L., Espirita-Gordillo, P., Lagunes-Guillén, A., Chávez-Munguía, B., & Rosales-Encina, J. L. (2018). Influence of Micropatterned Grill Lines on *Entamoeba histolytica* Trophozoites Morphology and Migration. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 8, 295.
- Soid-Raggi, L. G., Torres-Marquez, M. E., & Meza, I. (1998). *Entamoeba histolytica*: Identification of Functional Gs and Gi Proteins as Possible Signal Transduction Elements in the Interaction of Trophozoites with Fibronectin. *Experimental Parasitology*, 90(3), 262-269.
- Straub, F. B. (1943). Actin, II. *Stud. Inst. Med. Chem. Univ. Szeged*, 3, 23-37.
- Szent-Györgyi, A. G. (2004). The early history of the biochemistry of muscle contraction. *The Journal of General Physiology*, 123(6), 631-641.
- Talamás-Rohana, P., & Meza, I. (1988). Interaction between pathogenic amebas and fibronectin: substrate degradation and changes in cytoskeleton organization. *The Journal of Cell Biology*, 106(5), 1787-1794.
- Tewari, R., Bailes, E., Bunting, K. A., & Coates, J. C. (2010). Armadillo-repeat protein functions: questions for little creatures. *Trends in Cell Biology*, 20(8), 470-481.
- Tillack, M., Biller, L., Imer, H., Freitas, M., Gomes, M. A., Tannich, E., & Bruchhaus, I. (2007). The *Entamoeba histolytica* genome: primary structure and expression of proteolytic enzymes. *BMC Genomics*, 8(1), 170.

- Treisman, R. (2013). Shedding light on nuclear actin dynamics and function. *Trends in Biochemical Sciences*, 38(8), 376-377.
- Ullman, K. S., Powers, M. A., & Forbes, D. J. (1997). Nuclear export receptors: from importin to exportin. *Cell*, 90(6), 967-970.
- Vázquez, J., Franco, E., Reyes, G., & Meza, I. (1995). Characterization of adhesion plates induced by the interaction of *Entamoeba histolytica* trophozoites with fibronectin. *Cell motility and the cytoskeleton*, 32(1), 37-45.
- Virtanen, J. A., & Vartiainen, M. K. (2017). Diverse functions for different forms of nuclear actin. *Current Opinion in Cell Biology*, 46, 33-38.
- Woland, H., Guichard, B., Senju, Y., Myram, S., Lappalainen, P., Jégou, A., & Romet-Lemonne, G. (2017). ADF/cofilin accelerates actin dynamics by severing filaments and promoting their depolymerization at both ends. *Current Biology*, 27(13), 1956-1967.
- Yamaguchi, H., & Condeelis, J. (2007). Regulation of the actin cytoskeleton in cancer cell migration and invasion. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1773(5), 642-652.
- Yonezawa, N., Nishida, E., Koyasu, S., Maekawa, S., Ohta, Y., Yahara, I., & Sakai, H. (1987). Distribution among tissues and intracellular localization of cofilin, a 21kDa actin-binding protein. *Cell Structure and Function*, 12(5), 443-452.
- Zhu, B., Fukada, K., Zhu, H., & Kyprianou, N. (2006). Prohibitin and cofilin are intracellular effectors of transforming growth factor β signaling in human prostate cancer cells. *Cancer Research*, 66(17), 8640-8647.

