



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

UNIDAD ZACATENCO

**DEPARTAMENTO DE INFECTÓMICA Y PATOGÉNESIS
MOLECULAR**

**Caracterización de la metiltransferasa de arginina 1a y de las
metiltransferasas de lisina 1, 2, 3 y 4 en *Entamoeba histolytica***

T E S I S

Que presenta

M. en C. Jessica Borbolla Vázquez

Para obtener el grado de
Doctora en Ciencias

En Infectómica y Patogénesis Molecular

Directores de la tesis

Dra. María Esther Orozco Orozco
Dr. Mario Alberto Rodríguez Rodríguez

Ciudad de México

Julio, 2016.

El presente trabajo fue desarrollado en el laboratorio 2 del departamento de Infectómica y Patogénesis Molecular del centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV), bajo la dirección de la Dra. María Esther Orozco Orozco y el Dr. Mario Alberto Rodríguez Rodríguez, y con apoyo financiero de CONACYT con número de becario 245118.

AGRADECIMIENTOS

Dra. María Esther Orozco Orozco, por su dirección de tesis excepcional y por sus valiosos consejos académicos y personales.

Dr. Mario Alberto Rodríguez Rodríguez, por compartir sus conocimientos que me permitieron concluir satisfactoriamente este trabajo, y por su enorme calidad humana.

Agradezco enormemente a mis asesores: Dra. Abigail Betanzos Fernández, Dra. Dra. Rossana Arroyo Verástegui, Dr. Fidel de la Cruz Hernández Hernández, Dr. Juan Pedro Luna Arias y la Dra. Elisa Azuara Liceaga. Por su infinita paciencia, consejos y apoyo académico y personal.

A la Dra. Guillermina García Rivera, Biol. Raúl Bonilla Moreno, Q.B.P. Tomas Sánchez Maldonado, Biol. Magda Miranda Sánchez. Biol. exp. Leticia Cortés Martínez, Biol. Anel Lagunes Guillen y al Q.B.P. Carlos Vázquez Calzada. A cada uno les agradezco infinitamente por su asesoramiento en diversas técnicas empleadas, por su apoyo con material biológico y ayuda experimental que me permitió la conclusión satisfactoria del presente estudio.

Alejandrina Reyes Vivar Por su valioso apoyo técnico brindado durante la realización de este trabajo.

A Rocío Guerrero por su enorme apoyo secretarial.

Los desafíos hacen la vida interesante y superarlos hace la vida significativa (Joshua J. Marine)...

DEDICATORIAS

A mi Mama, por estar conmigo siempre, por recordarme constantemente que no existen metas imposibles y por sus ejemplos de perseverancia y constancia que siempre he admirado.

A mis familiares:

A mis hermanas Luisa y Elizabeth gracias por estar siempre conmigo y por el apoyo incondicional. A Ivonne, Emanuel, Gerardo, Fernando y Laura gracias primos por su apoyo y fuerza. A mi novio Job por sus consejos, paciencia y apoyo con el que siempre he contado.

A mis amigos:

Que nos hemos apoyado mutuamente en nuestra formación profesional y que hasta ahora seguimos siendo amigos: Hugo Sánchez, Marcos Muñís, Sarai Mendoza, Iris Nava y Cecilia Rodríguez.

Para tener éxito, tu deseo de éxito debe ser mayor que tu miedo al fracaso (Bill Cosby)...

INDICE

ABREVIATURAS	8
LISTA DE FIGURAS	11
LISTA DE TABLAS	12
RESUMEN	13
ABSTRACT	15
INTRODUCCIÓN	
Características generales de <i>Entamoeba histolytica</i>	16
Mecanismos de patogenicidad de <i>E. histolytica</i>	19
Genoma de <i>E. histolytica</i>	22
Transcripción y regulación transcripcional en eucariontes superiores	24
Regulación de la transcripción en <i>E. histolytica</i>	29
Cromatina	30
Epigenética	33
Modificaciones post-traduccionales en las histonas	33
Metiltransferasas de arginina o PRMTs	38
Metiltransferasas de lisina o HKMTs	43
ANTECEDENTES	
Epigenética en protozoarios parásitos.	47
Antecedentes directos.	50
JUSTIFICACIÓN	53
HIPÓTESIS	55
OBJETIVO GENERAL	56
Objetivos particulares	56
ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	57
MATERIALES Y MÉTODOS	
Cultivo de trofozoítos de <i>E. histolytica</i>	60
Extracción y cuantificación de DNA genómico	60
Extracción de RNA total	60
Tratamiento del RNA total con DNasa I	61
Electroforesis en geles de agarosa	61

Síntesis de DNA complementario	61
Diseño de primers	62
Reacción en cadena de la polimerasa	62
Preparación de bacterias competentes de <i>E. coli</i> de la cepa <i>DH5α</i>	63
Transformación de células competentes	63
Aislamiento de los plásmidos	63
Digestión de los fragmentos de PCR y de los plásmidos	67
Purificación del DNA a partir de geles de agarosa	67
Ligación	67
Inducción de las proteínas recombinantes	68
Análisis de la solubilidad de las proteínas recombinantes	68
Purificación de las proteínas recombinantes	69
Diseño de péptidos sintéticos	70
Obtención de anticuerpos	70
Extracción de proteínas totales de <i>E. histolytica</i>	70
Fraccionamiento núcleo y citoplasma	70
Electroforesis de proteínas	71
Western blot	72
Ensayos de inmunofluorescencia indirecta y microscopía confocal	72
Inmunolocalización de las EhHKMTs durante la eritrofagocitosis	73
Ensayo de inmunoprecipitación	74
Ensayo de inmunoelectromicroscopía	74
Ensayo de entrecruzamiento con glutaraldehído	75
Ensayo de actividad enzimática	75
Silenciamiento de EhPRMT1a generando por ds-RNA	76
Transfección de <i>pSA8 /Ehprmt1a</i> en trofozoítos amibianos	76
Ensayo citopático	78
Ensayo de migración celular	78
Ensayos de estrés	78
RESULTADOS	
<i>E. histolytica</i> tiene una marca epigenética equivalente a H4R3 me2.	79
La proteína recombinante EhPRMT1a es reconocida por el anticuerpo α-	832

HsPRMT1.	
La proteína recombinante EhPRMT1a tiene actividad de metiltransferasa.	86
Silenciamiento de EhPRMT1a en trofozoítos de <i>E. histolytica</i> .	88
El silenciamiento de EhPRMT1a afecta la respuesta al choque térmico.	90
El silenciamiento de EhPRMT1a afecta la destrucción de células blanco por los trofozoítos.	92
El silenciamiento de EhPRMT1a afecta la migración de los trofozoítos.	92
Obtención de anticuerpos específicos contra las cuatro HKMTs de <i>E. histolytica</i> .	94
EhHKMT1, EhHKMT2 y EhHKMT4 se localizan en el núcleo y en el citoplasma de los trofozoítos.	95
La localización celular de las EhHKMTs cambia durante la fagocitosis	100
EhHKMT2 y 4 interaccionan con la adhesina EhADH durante la fagocitosis.	100
<i>E. histolytica</i> posee las marcas epigenéticas H3K4 me3, H4K20 me2 y H4K20 me3.	104
Las EhHKMTs recombinantes tienen actividad de metiltransferasa.	106
DISCUSIÓN	109
CONCLUSIONES	115
PERSPECTIVAS	116
BIBLIOGRAFÍA	117
APÉNDICE	125

ABREVIATURAS

μCi	Micro curies
5-azaC	5-azacitidina
A	Adeninas
aa	Aminoácidos
ADH	Adhesina 112
ADP	adenosín difosfato
As	Trofozoítos de <i>E. histolytica</i> transfectados con <i>pSA8/Ehprmt1</i>
ATP	Adenosin trifosfato.
BSA	Albumina
C	Citosinas
cDNA	DNA complementario
CPs	Cisteína-proteasas
DAPI	4',6'-diamino-2'-fenilindol
DMTs	Desmetilasas
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DNMTs	Metiltransferasa de DNA
dNTPs	Deoxinucléotidos trifosfato.
DO	Densidad óptica
DPE	Elemento promotor río arriba
ds-RNA	RNA de doble cadena (<i>double strand RNA</i>)
DTT	Dithiothreitol
Eh	<i>Entamoeba histolytica</i>
EhCPADH	Complejo proteico de la cisteína proteasa EhCP112 y la adhesina EhADH
EhADH	Adhesina
G	guaninas
G418	Geneticina
GSNO	S-Nitrosoglutation
GST	Glutation - S- transferasa.
H2A	Histona 2 A
H2B	Histona 2 B
H3	Histona 3
³ H	Tritio
H4	Histona 4
HATs	Acetiltransferasas de histonas
HDAC	Desacetilasas de histonas
HKMTs	Metiltransferasas de lisina
HMTs	Metiltransferasas
HP1	Proteína de heterocromatina 1
Hs	<i>Homo sapiens</i>

IF	inmunofluorescencia
Inr	Iniciador de la transcripción
Ipp	Inmunoprecipitación
IPTG	Isopropil- β -D-tio-galactósido
kb	Kilo-bases
kDa	Kilo-daltones
K	lisina
LB	Medio Luria-Broth.
lectina Gal/GalNac	Lectina de <i>E. histolytica</i> que une residuos de galactosa y de N-acetil-D-galactosamina
M	Molar
mA	Miliamperes
Mb	Mega-bases
MBDs	proteínas de unión a lisinas metiladas
me	Metilos
MET	Microscopía de transmisión electrónica
mM	Milimolar
MOCK	Trofozoítos de <i>E. histolytica</i> transfectados con pSA8 vacío
MTE	Motif ten element
P	Fosforilación
pAS8	Vector de 9.0 kb usado para el silenciamiento de genes en <i>E. histolytica</i> .
pb	Pares de bases
PBS	Solución amortiguadora salina de fosfatos.
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa.
PFGE	Pulsed Field Gel Electrophoresis
pGEX-6P-1	Vector de expresión en bacterias de 4.9 kb.
PRMTs	Metiltransferasas de arginina
R	Arginina
RNA	Ácido ribonucleico
RNA pol	Polimerasa de RNA
RNA _m	RNA mensajero
RNA _r	RNA ribosomal
RNA _{sn}	RNA nucleares pequeños
RNA _t	RNA de transferencia
rpm	Revoluciones por minuto
RT-PCR	Retotranscripción acoplada a la reacción en cadena de la polimerasa
SAM	S-adenosil-L-metionina
Sc	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SDS-PAGE	Electroforesis en geles de poliacrilamida con dodecyl sulfato de sodio (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis)
shRNA	Small harpin RNA
Sp	<i>Saccharomyces pombe</i>
STIRP	Proteína rica en serina-treonina-isoleucina
T	Timinas
TAE	Solución amortiguadora de Tris, ácido acético glacial y EDTA

TEMED	N,N,N'-Tetrametiletilendiamina
TF	Factores de transcripción
TSA	Tricostatina A
Ub	Ubiquitinación
UPE	Elemento promotor río arriba
URE	Elemento regulador río arriba
V	volts
WB	Western blot
WT	Trofozoítos de <i>E. histolytica</i> sin transfectar
XCP1	X core promoter element 1
μM	Micromolar

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 Ciclo de vida de *E. histolytica*.
- Figura 2 Estructura de la cromatina en las células eucariotas superiores.
- Figura 3 Mecanismo de activación y represión génica que involucra modificaciones en los extremos N-terminal de las histonas.
- Figura 4 Código de modificaciones en los extremos amino y carboxilo de las histonas.
- Figura 5 PRMTs.
- Figura 6 Estructura terciaria de la PRMT-3 de humano.
- Figura 7 Alineamiento de las cinco familias de PRMTs en humano.
- Figura 8 Metilación de lisinas y alineamiento del dominio SET de las HKMTs.
- Figura 9 Estructura terciaria de los dominios pre-SET, SET y post-SET de las HKMTs.
- Figura 10 Comparación de las marcas de metilación en el N-terminal de las histonas H3 y H4 en eucariontes unicelulares y humano.
- Figura 11 Vector pGEX-6P-1.
- Figura 12 Vector (modificado).
- Figura 13 Maquinaria que es reclutada para la degradación de miRNA y ds-RNA.
- Figura 14 Identificación de la marca epigenética equivalente a H4R3 me2 en *E. histolytica*.
- Figura 15 Localización celular de la marca epigenética H4R8 me2 en *E. histolytica*.
- Figura 16 Purificación, detección de la EhPRMT1a y oligomerización de la proteína recombinante EhPRMT1a.
- Figura 17 Actividad enzimática de EhPRMT1a y colocalización de EhPRMT1 y H4R8 2me en trofozoítos amibianos.
- Figura 18 Silenciamiento de la EhPRMT1a en trofozoítos de *E. histolytica*.
- Figura 19 Efecto del silenciamiento de EhPRMT1a en trofozoítos sometidos a diferentes condiciones de estrés.
- Figura 20 El silenciamiento de EhPRMT1a afecta la destrucción de células blanco y la migración de los trofozoítos.
- Figura 21 Inmunodetección de los anticuerpos específicos contra las EhHKMTs.
- Figura 22 Localización celular de EhHKMT1, 2 y 4.
- Figura 23 Inmunomicroscopía electrónica de las EhHKMT1, 2 y 4.
- Figura 24 Localización celular de EhHKMT1, 2 y 4 durante la eritrofagocitosis.
- Figura 25 Interacción de EhADH con EhHKMT2 y con EhHKMT4 después de 20 minutos de fagocitosis.
- Figura 26 Localización de las marcas epigenéticas H3K4 3me, H4K20 2me y H4K20 3me en trofozoítos de *E. histolytica*.
- Figura 27 Actividad enzimática de EhHKMT1, 2, 3 y 4 sobre histonas comerciales.

LISTA DE TABLAS

Tabla 1 péptidos sintéticos utilizados para producir anticuerpos específicos contra las EhHKMTs

RESUMEN

La epigenética es el estudio de factores no genéticos que implican cambios en la arquitectura de la cromatina y conduce a la expresión o silenciamiento de genes, estos cambios son heredables y le dan plasticidad al genoma. Estudios previos han demostrado la presencia de componentes de la maquinaria de remodelación de la cromatina en *E. histolytica*, no obstante, hasta el momento se conoce poco acerca de las metiltransferasas de lisina (HKMT) y de las metiltransferasa arginina (PRMT), encargadas de transferir grupos metilo a los extremos N-terminal de las histonas. En el trabajo de tesis de maestría encontramos que este parásito tiene cinco genes que codifican metiltransferasas del tipo PRMT (EhPRMT1a, EhPRMT1b, EhPRMT1c, EhPRMT5 y EhPRMT-A), todos los cuales se expresan en los trofozoítos amibianos. Además, encontramos cuatro genes que codifican enzimas del tipo HKMT (EhHKMT1 a EhHKMT4). En el presente estudio encontramos que *E. histolytica* también expresa los cuatro genes del tipo HKMT. Además, se demostró que las proteínas recombinantes de EhPRMT1a y de las cuatro EhKMTs tienen actividad enzimática en ensayos *in vitro* utilizando histonas comerciales; también se identificaron algunos de los residuos que son modificados por estas enzimas. Por otra parte, el uso de anticuerpos comerciales contra PRMT1 de *H. sapiens* y de anticuerpos generados en el laboratorio contra EhKMT1, 2 y 4 permitió detectar a estas enzimas en el núcleo y citoplasma de los trofozoítos. Además, se observó que durante la fagocitosis las enzimas EhKMT2 y 4 se relocalizan en vesículas que rodean a los eritrocitos ingeridos, sugiriendo que la metilación mediada por estas enzimas es un evento importante en la fagocitosis. Finalmente, se encontró que el silenciamiento transitorio de EhPRMT1a afecta negativamente el efecto citopático, la movilidad y resistencia al choque térmico, lo cual nos sugiere un papel relevante de la metilación mediada por EhPRMT1a en esos eventos.

ABSTRACT

Epigenetics is the study of nongenetic factors involving changes in chromatin architecture and leads to the expression or silencing of genes; these changes are heritable and give elasticity to the genome. Earlier studies have been demonstrated the presence of machinery components of chromatin remodeling in *E. histolytica*, but far little is known about lysine methyltransferases (HKMT) and arginine methyltransferases (PRMT), responsables to transfer methyl groups to the N-terminal ends of histones. In our previous work of master degree, we found that this parasite has five genes encoding methyltransferases of the PRMT type (EhPRMT1a, EhPRMT1b, EhPRMT1c, EhPRMT5 y EhPRMT-A), all of them expressed by trophozoites. In addition, we detected four genes encoding enzymes of the HKMT type (EhHKMT1 a EhHKMT4). In this study we found that *E. histolytica* also expresses the four HKMTs. Furthermore, we shown that the recombinant proteins of EhPRMT1a and of the four EhKMTs have enzymatic activity in *in vitro* assays using commercial histones; some of the residues modified by these enzymes were also identified. Moreover, the use of commercial antibodies against human PRMT1 and of antibodies generated in the laboratory against EhKMT1, 2 and 4 allowed us to detect these enzymes in the nucleus and cytoplasm of trophozoites. In addition, we observed that during phagocytosis, EhKMT2 and 4 are relocated surrounding some ingested erythrocytes, suggesting that methylation mediated by these enzymes is an important event in phagocytosis. Finally, we found that the silencing of EhPRMT1a negatively affects the cytopathic effect, mobility and resistance to heat shock of trophozoites, suggesting an important role of methylation mediated by EhPRMT1a in these events.

INTRODUCCIÓN

Características generales de *Entamoeba histolytica*

Entamoeba histolytica es un protozoo parásito microaerófilo que pertenece a la familia Entamoebidae, al orden Amoebida, a la clase Lobosea, y al phylum Sarcomastigophora (Stanley, 2003). *E. histolytica* es el agente causante de la amibiasis en el humano, una de las parasitosis más importantes a nivel mundial, ya que es considerada la cuarta causa de muerte en el mundo debida infecciones por protozoarios. Además, es la tercera causa de morbilidad después del paludismo y la tricomoniasis (Stanley, 2003).

E. histolytica tiene una amplia distribución en el mundo; sin embargo, las infecciones son más frecuentes en los países y regiones en vías de desarrollo como América Latina, Sudamérica, Asia y África; siendo las zonas con mayor endemia los países tropicales y subtropicales (Stanley, 2003). Se calcula que cada año ocurren 50 millones de casos sintomáticos de amibiasis, de los cuales 100,000 son mortales (Tovy et al., 2010). En México, la amibiasis es uno de los problemas de salud pública más importantes, ya que refleja el rezago en las condiciones higiénicas de la población (Stanley and Reed, 2001). Un estudio seroepidemiológico reportó que 8.41% de la población mexicana tiene anticuerpos anti-amibianos, lo que demuestra la elevada frecuencia de infección por este parásito, así mismo, se considera que el 10% de la población está infectada y de estos el 90% es asintomática (Stanley, 2003; Ximénez C., 2007).

E. histolytica infecta a los seres humanos de cualquier edad, siendo más frecuente en niños y adultos jóvenes (Stanley and Reed, 2001). La transmisión de *E. histolytica* es por vía fecal-oral, siendo la ingesta de bebidas y alimentos contaminados, la forma más frecuente de contagio, el hombre es el único huésped conocido de *E. histolytica*. La infección se localiza en la mucosa del intestino grueso y se manifiesta principalmente como colitis amibiana (Stanley, 2003). Esto es debido a que *E. histolytica* se alimenta del bolo alimenticio, bacterias intestinales, líquidos intracelulares y de las células del huésped que destruye y fagocita (Stanley, 2003).

La amibiasis se manifiesta de diferentes formas produciendo disentería aguda fulminante con cuadros febriles o disentería amibiana con diarrea sanguinolenta/mucoide. El diagnóstico de amibiasis intestinal es sugerido por el cuadro clínico y epidemiológico y se confirma mediante la demostración de quistes de *E. histolytica* en las heces o en los tejidos (Stanley, 2003). El tratamiento consiste en medidas higiénico-dietéticas básicas, promoción de la salud y tratamiento antiparasitario (Fernández., 2007; Stanley, 2003). La forma clínica más frecuente de amibiasis extraintestinal es el absceso hepático amibiano, cuya incidencia en México es alta, aunque en las tres últimas décadas la morbilidad por absceso hepático amibiano ha disminuido en algunas áreas geográficas de México, particularmente en donde los servicios públicos (drenaje, agua potable y pavimentación de calles) y de salud han mejorado en calidad y en accesibilidad para sus habitantes (Fernández., 2007).

E. histolytica consta de dos estadios de vida consecutivos: una forma móvil que es el trofozoíto y una resistente que es el quiste (Fig. 1). La primera forma de vida es denominada forma móvil o trofozoíto y es la fase invasiva. Esta forma de vida es muy sensible a los cambios de temperatura, pH y osmolaridad, su citoesqueleto está formado por actina, miosina y tubulina (Ximénez C., 2007); coloniza la mucosa intestinal del colon, donde se multiplican por fisión binaria, su tamaño oscila entre 20-40 μm , carece de mitocondrias y de hecho el único organelo típico de esta célula eucariota es el núcleo (Ximénez C., 2007). La segunda forma de vida es la forma infectiva denominada quiste. Los quistes por su parte, se encuentran en las heces sólidas, son cuerpos hialinos redondos o ligeramente ovalados con un diámetro de 8-20 μm y poseen una pared rígida compuesta de quitina que protege al quiste, fuera del conducto intestinal del huésped (Stanley, 2003). El quiste permanece viable y es infectante durante varios días en las heces y puede sobrevivir en la tierra hasta por ocho días a temperaturas entre 24 y 34 °C y durante más de un mes a 10 °C (Ximénez C., 2007).

El ciclo de vida de *E. histolytica* inicia después que el quiste es ingerido en alimentos o bebidas contaminadas (Fig. 1). El desenquistamiento ocurre en el intestino delgado preferentemente en el íleon terminal, los trofozoítos liberados migran al intestino grueso, donde colonizan la mucosa al reproducirse por fisión binaria y posteriormente inicia la producción de quistes que se eliminarán por las heces. En ocasiones el trofozoíto puede atravesar la barrera intestinal diseminándose a diferentes órganos principalmente al hígado,

donde produce los llamados abscesos hepáticos amibianos (Fig. 1) (Stanley, 2003; Ximénez C., 2007)

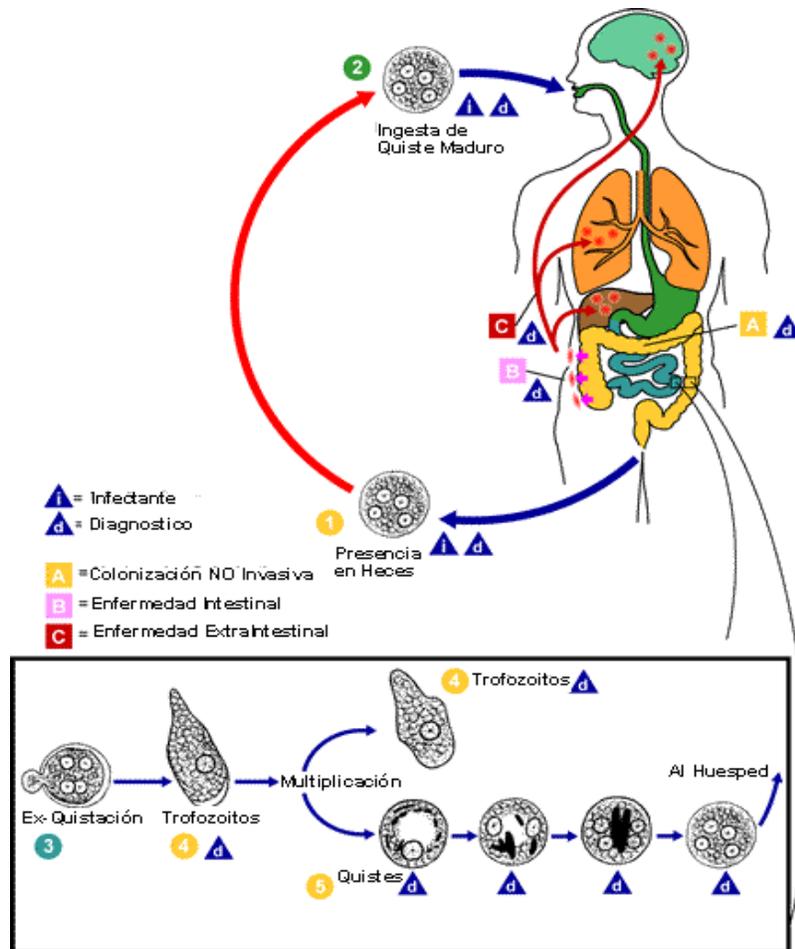


Figura 1. Ciclo de vida de *E. histolytica*. La infección por *E. histolytica* ocurre por ingestión de quistes maduros presentes en alimentos o bebidas contaminadas con heces (1), posteriormente ocurre el desenquistamiento en el intestino delgado (3), los trofozoítos liberados (4) migran al colon, se reproducen por fisión binaria (5) y producen quistes que son eliminados por las heces (6). En muchos casos los trofozoítos permanecen confinados en la luz intestinal de los individuos infectados (A), infección no invasiva. En algunos individuos, los trofozoítos invaden la mucosa intestinal (B), o a través de la circulación invaden hígado, pulmón, cerebro etc. (C). (Modificada de (Lopez R.I., 2010))

Mecanismos de patogenicidad de *E. histolytica*

Recientes avances en el desarrollo de modelos *in vitro* e *in vivo* de la enfermedad, han permitido diseñar estrategias para identificar los principales mecanismos de patogenicidad que utiliza *E. histolytica* para establecer una infección, los cuales son: **adhesión, citólisis y fagocitosis**, eventos que se describirán brevemente a continuación.

Adhesión: el primer paso en la invasión del intestino causado por *E. histolytica* es la adhesión de los trofozoítos a las células epiteliales. Entre las proteínas implicadas en este proceso, se encuentra la lectina que une residuos de galactosa y de N-acetil-D-galactosamina en las glicoproteínas de la célula blanco y es conocida como la lectina Gal/GalNac (Stanley and Reed, 2001). Esta proteína amibiana es un heterodímero formado por una cadena pesada y una ligera; la cadena pesada es además una proteína integral de membrana que bloquea la formación del complejo de ataque a la membrana producido por la cascada del complemento (Stanley and Reed, 2001). Otra proteína implicada en este evento es el complejo EhCPADH, heterodímero de 124 kDa formado por una cisteína proteasa (EhCP112) y una adhesina (EhADH) (Garcia-Rivera et al., 1999). La adhesina presenta un dominio Bro 1 y sitios potenciales de glicosilación (Banuelos et al., 2005; Garcia-Rivera et al., 1999).

Además, una familia de proteínas exclusivamente expresadas en cepas virulentas de *E. histolytica* llamada STIRP (proteína rica en serina-treonina-isoleucina), se sugiere participa en la adhesión debido a que su silenciamiento ocasionado por shRNA produce una disminución del 35% de la capacidad adhesiva del parásito a la célula huésped y una subsecuente reducción de la citotoxicidad del parásito (Singh et al., 2016). Por otro lado, el silenciamiento por shRNA de la serina proteasa ROM1 en *E. histolytica*, reduce significativamente la adhesión de los trofozoítos a las células CHO sanas, en comparación con células CHO apoptóticas, por lo que se ha sugerido que ROM1 está relacionada con la activación y procesamiento de proteínas amibianas involucradas en adherencia y posiblemente fagocitosis (Baxt et al., 2010). Otras proteínas que se ha demostrado que están relacionadas con la adhesión de *E. histolytica* son TMKB1-9, una cinasa transmembranal

(Shrimal et al, 2010), y KERP1, proteína rica en lisina y ácido glutámico (Santi-Rocca et al., 2008).

Por otro lado, el contacto de los trofozoítos amibianos con la matriz extracelular de la célula blanco desencadena una cascada de señalización dentro del parásito que resulta en el reordenamiento del citoesqueleto de la amiba, facilitando su adherencia y su posible invasión (Meza, 2000; Stanley, 2003).

Citólisis: una vez que se produce la adhesión a la célula blanco, el trofozoíto continúa un rápido evento citolítico que puede ser mediado por diversos procesos: I) permeabilización por péptidos formadores de poros; II) inducción de muerte celular; y III) ruptura de la matriz intracelular a través de cisteína proteasas (Boettner and Petri, 2005; Leippe, 1997; Stanley and Reed, 2001).

Los amebaporos, péptidos de 77 aminoácidos (aa), pertenecen a una familia que comprende tres isoformas denominadas A, B y C, que se encuentran en una proporción aproximada de 35:10:1, respectivamente (Leippe, 1997). Los amebaporos son polipéptidos solubles que se insertan en la membrana de la célula blanco por su unión con fosfolípidos aniónicos. A continuación, estos péptidos se difunden en la membrana y forman un canal a través del cual se produce la salida de iones y otras moléculas pequeñas de la célula; en consecuencia, el medio interno de la célula cambia y resulta en muerte celular (Leippe et al., 1991). Se ha postulado que los trofozoítos de *E. histolytica* son resistentes a la actividad de amebaporos, ya que su membrana celular posee fosfolípidos neutros que impiden la unión de estos polipéptidos (Leippe, 1997). Además, se ha demostrado que *E. dispar*, una amiba no patógena que es morfológicamente indistinguible de *E. histolytica*, solo expresa a los amebaporos A y B en una concentración menor y con menor actividad biológica, lo que sugiere un impacto de los amebaporos en la patogenicidad de esta especie (Leippe, 1997).

De igual forma, las cisteína-proteasas (CPs) secretadas por el trofozoíto de *E. histolytica* juegan un papel clave en la citólisis. En la actualidad se conocen más de 50 genes distintos que codifican para las CPs de *E. histolytica* (Ocadiz et al., 2005; Stanley, 2003). Las CPs son secretadas por los trofozoítos de *E. histolytica*, los cuales pueden secretar de 10-10,000

veces más CPs, que *E. dispar* (Que and Reed, 2000). Las CPs son sintetizadas como precursores, con una secuencia péptido señal de 12-14 aminoácidos (aa), un pro-dominio de 78-82 aa y un dominio catalítico de 216-25 aa. Los precursores son posteriormente transformados en enzimas maduras, similares a las catepsinas y papaínas de las células eucariotas superiores (Que and Reed, 2000). Las CPs más estudiadas son ACP1- 3 y EhCP5, las cuales son capaces de degradar los componentes de la matriz extracelular como la laminina, fibronectina, colágeno y elastina, para la obtención de nutrientes (Stanley, 2003). Además, se ha observado que estas proteasas intervienen en el ciclo celular y en la invasión del hospedero (Stanley and Reed, 2001). Otra CP de *E. histolytica* es la EhCP112, la cual se fusiona con una adhesina (EhADH), para formar el complejo EhCPADH (Garcia-Rivera et al., 1999; Ocadiz-Ruiz et al., 2016; Ocadiz et al., 2005).

Fagocitosis: la fagocitosis puede ser de dos tipos, específica y no específica; en la no específica los trofozoítos ingieren partículas como almidón, látex, hierro, u otras, donde el contacto inicial puede estar mediado por fuerzas electrostáticas (Bailey et al., 1990), mientras tanto la fagocitosis específica es dependiente de contacto, a través de esta las amibas ingieren células vivas y lisadas (Arroyo and Orozco, 1987; Orozco et al., 1987). En la fagocitosis también intervienen: componentes del citoesqueleto, como la miosina IB y una proteína semejante a la espectrina, entre otras (Marion et al., 2004), reguladores de la estructuración del citoesqueleto, tales como las GTPasas Rho y RacG (Godbold and Mann, 1998; Guillen et al., 1998); proteasas como la EhCP5, EhCP1, EhCP112, EhCP2 y EhCP3 (Ankri et al., 1998; Garcia-Rivera et al., 1999; Ocadiz-Ruiz et al., 2016; Olivos-Garcia et al., 2004); y cinasas como EhPAK, que controlan la motilidad y la fagocitosis (Labruyere et al., 2003).

Otro proceso que está relacionado con la fagocitosis de *E. histolytica*, es el mecanismo de transporte intracelular. En eucariontes superiores este transporte intracelular es regulado por varias proteínas, como las pequeñas GTPasas de la familia Rab (Rodriguez and Orozco, 2000). En *E. histolytica*, las Rabs se han relacionado con la captura de nutrientes, degradación de microorganismos en el intestino e invasión del epitelio intestinal (Nozaki and Nakada-Tsukui, 2006; Rodriguez and Orozco, 2000). Existen en *E. histolytica* más de 100 proteínas Rabs identificadas hasta la fecha, de las cuales solo se conoce la función de al

menos 12, entre las cuales se encuentran EhRabA, B, 5, 7B 7A, 11A, 11B (Nozaki and Nakada-Tsukui, 2006; Rodriguez and Orozco, 2000; Saito-Nakano et al., 2004) (Welter and Temesvari, 2009) (Nakada-Tsukui et al., 2010).

Genoma de *E. histolytica*

La secuenciación completa del genoma de *E. histolytica* hizo posible la creación de bases de datos de este parásito (Loftus et al., 2005). El genoma de *E. histolytica* es de aproximadamente 24 Mb en tamaño y presenta un bajo contenido de G + C (22.4%), y por tanto es rico en A + T (77.6%), con abundantes palíndromos y repetidos (Bhattacharya et al., 2000; Loftus et al., 2005). Está compuesto por cromosomas lineales y DNA circular de diferentes tamaños. Además, se ha sugerido que en *E. histolytica* hay amplificación génica no programada (AGNP) mediada por la presencia de secuencias palíndromes y repetidas que originan múltiples copias de genes y heterogenidad genética (Dhar et al., 1995; Lioutas et al., 1995; Orozco et al., 1997).

A la fecha, el número, tamaño y estructura de los cromosomas de *E. histolytica* no están completamente definidos, ya que diversos autores reportan números diferentes de cromosomas. La separación de moléculas de DNA de alta talla molecular por electroforesis en geles de campos pulsados (PFGE, por sus siglas del inglés Pulsed Field Gel Electrophoresis), ha ayudado a esclarecer parcialmente la topología del DNA de *E. histolytica* (Riveron et al., 2000). Los patrones obtenidos mediante esta metodología se han denominado cariotipos moleculares, debido a que la técnica permite que los cromosomas permanezcan intactos, por lo que cada una de las bandas resueltas podría corresponder a un cromosoma o a una molécula completa de DNA. Sin embargo, a diferencia de los patrones que se han obtenido en otros organismos, en *E. histolytica* los patrones presentan bandas difusas, debido a las mezclas de moléculas circulares y lineales. Por lo que los cromosomas amibianos no se han podido separar totalmente lo que ha dificultado la interpretación de su cariotipo molecular (Baez-Camargo et al., 1996; Riveron et al., 2000). *E. histolytica* presenta DNA circular de diferentes tamaños y topologías, tanto en el núcleo como en un organelo citoplasmático llamado EhkO (Baez-Camargo et al., 1996; Riveron et al., 2000). A pesar de estos inconvenientes, por medio de microscopía electrónica de transmisión (MET) se

observaron en núcleos en división entre 12 y 16 estructuras que, por su electrodensidad, apariencia de la cromatina, asociación con microtúbulos y movimiento durante el ciclo celular, pudieran ser cromosomas (Marquez-Monter et al., 1990). Sin embargo, por estudios de videomicroscopía y tinciones específicas de DNA se propuso la existencia de seis cromosomas en *E. histolytica* y un centro organizador de microtúbulos (Riveron et al., 2000). Así mismo, por PFGE se logró separar hasta 17 bandas de DNA, de las cuales sólo 6, de 0.22, 0.37, 0.63, 0.85, 1.1 y 1.3 Mb, se sugirieron como cromosomas verdaderos, puesto que son las que hibridan con una sonda telomérica heteróloga (Riveron et al., 2000).

En conjunto, estos datos muestran que *E. histolytica* presenta una organización genómica compleja, por su variación en contenido, naturaleza, topología, tamaño y localización de su DNA. Sin embargo, la poca o nula condensación de los cromosomas de *E. histolytica* durante la mitosis hace difícil la determinación del número exacto de cromosomas (Bhattacharya et al., 2000). Aunque, se necesitan más estudios para definir el número de cromosomas con certeza, lo más aceptado es que en *E. histolytica* existen 14 grupos de ligación, lo cual sugiere la existencia de un genoma haploide con 14 cromosomas (Willhoeft et al., 1999). Se sugiere que la variación de tamaño de cromosomas homólogos puede ser debido a la expansión y contracción de repetidos subteloméricos, como en otros protistas (Bhattacharya et al., 2000; Meza, 2000).

Por otro lado, se pensaba que los intrones eran raros en los genes de *E. histolytica*, pero con ayuda de la secuenciación del genoma de este parásito se determinó que el 25% de los genes hipotéticos presentan al menos un intrón (Loftus et al., 2005). La secuenciación del genoma también permitió detectar una alta redundancia en los genes de virulencia, lo cual se ha visto es característico de varios protozoarios (Loftus et al., 2005).

Los genes que codifican el RNA ribosomal (RNAr) de *E. histolytica* residen en más de 200 moléculas de DNA circular extracromosomales de aproximadamente 25 kb (Bhattacharya et al., 2000). Cada uno de estas moléculas están constituidas por dos unidades transcripcionales de RNAr en posición invertida. Cada unidad transcripcional mide aproximadamente 5.9 kb e incluye los genes 16S, 5.8S y 25S, siguiendo el arreglo eucariótico típico (Ramakrishnan et al., 1996).

El análisis genómico también reveló que el metabolismo de *E. histolytica* sufrió una pérdida secundaria de genes, y se sugiere la transferencia lateral de genes provenientes de cepas bacterianas (Lopez R.I., 2010). *E. histolytica* es un fermentador obligado, el cual utiliza enzimas de fermentación semejantes a las de bacterias y carece de enzimas del ciclo del ácido tricarboxílico y de la cadena de transportadores de electrones mitocondriales (Loftus et al., 2005). La glucosa es su principal fuente de energía, sin embargo, en lugar de los típicos transportadores de glucosa en eucariontes, los de la ameba están relacionados con la familia de acarreadores de glucosa/ribosa de procariontes (Lopez R.I., 2010). Como un residente fagocítico del intestino humano, *E. histolytica* tiene acceso a muchas bacterias y componentes orgánicos preformados derivados del huésped lo que sugiere, que muchas vías de biosíntesis de aminoácidos han sido eliminadas, excepto aquellas para serina y cisteína, asimismo, *E. histolytica* es incapaz de biosintetizar ácidos grasos, aunque sí fosfolípidos (Loftus et al., 2005).

Regulación transcripcional en eucariontes superiores

La transcripción es un punto de control crítico en la regulación de la expresión de genes. En este mecanismo los genes son copiados a moléculas de RNA (Lewin B., 2008). Los eucariontes tienen tres tipos de RNA polimerasas (RNA pol), cada una responsable de la transcripción de las diferentes clases de genes. La RNA pol I se encuentra en el nucléolo y es la encargada de transcribir los genes que codifican para el RNAr (RNAr) 5.8S, 18S y 28S; la RNA pol II se encuentra en el nucleosoma y es la responsable de transcribir los RNA mensajeros (RNAm) y algunos RNA nucleares pequeños (RNAsn), y la RNA pol III localizada en el nucleoplasma es la responsable de transcribir los genes que codifican los RNA de transferencia (RNAt), el RNAr 5S y algunas especies de RNAsn (ALberts B., 2002). Ninguna de las RNA pol reconocen directamente al promotor, por tanto estas se acoplan a proteínas auxiliares o a factores transcripcionales, los cuales reconocen en el DNA a su secuencia blanco que se encuentra en la región regulatoria del promotor y sirven como puente para la unión de la RNA pol en el sitio correcto para el inicio de la transcripción (ALberts B., 2002).

En eucariontes, la transcripción de los genes que codifican proteínas es mediada por una compleja red de factores que incluyen proteínas de unión a DNA específicas de secuencia, co-reguladores transcripcionales que se unen a los factores de unión a DNA, factores de remodelamiento de la cromatina que movilizan los nucleosomas, enzimas que modifican covalentemente a las histonas y a otras proteínas (modificaciones como acetilación, desacetilación, fosforilación, desfosforilación, metilación, desmetilación, ubiquitinación y deubiquitinación, entre otras modificaciones) y la maquinaria basal de transcripción que incluye a la RNA pol II (Lewin B., 2008).

La reacción de transcripción puede ser dividida en cuatro fases: preiniciación, iniciación, alargamiento y terminación (Lewin B., 2008).

Preiniciación: corresponde al reconocimiento del DNA molde y a la unión de los factores basales de transcripción (TFIIA, TFIIB, TFIID, TFIIE, TFIIIF y TFIIH) al promotor, los cuales permiten la interacción de la RNA pol II con el DNA. En esta fase se crea la burbuja de transcripción por el desenrollamiento local de las cadenas de DNA (Lewin B., 2008).

Iniciación: comienza con la síntesis del primer ribonucleótido. La RNA pol II permanece en el promotor mientras se sintetizan los primeros 9 nucleótidos. La fase de iniciación es lenta para evitar un evento abortivo, en el cual la enzima hace un transcrito corto, lo libera e inicia la síntesis de RNA otra vez (Lewin B., 2008). La fase de iniciación termina cuando la enzima avanza para extender la cadena y se libera el promotor. La cadena de RNA sintetizada del 5' al 3' toma como molde la cadena complementaria, por lo que la secuencia de bases de la hebra de RNA recién sintetizada es idéntica a la cadena codificante. El grupo 3'-OH del último nucleótido añadido a la cadena reacciona con el 5'-trifosfato del nucleótido entrante. El nucleótido entrante pierde sus dos grupos fosfato terminales ($\gamma\beta$) y su grupo α es utilizado en el enlace fosfodiéster uniendo la cadena (Lewin B., 2008).

Alargamiento: en esta fase, la burbuja de transcripción que contiene a la RNA pol se mueve a lo largo del DNA y extiende el creciendo de la cadena de RNA. Los nucleótidos son covalentemente añadidos al 3' terminal de la cadena de RNA en crecimiento formando un híbrido DNA-RNA. El RNA emerge como una sola cadena libre (Lewin B., 2008).

Terminación: involucra el reconocimiento del punto en el cual no podrían ser añadidas nuevas bases a la cadena. Para terminar la transcripción, la formación de enlace fosfodiéster se detiene, la burbuja de transcripción se colapsa y el híbrido RNA-DNA se separa, el DNA retorna a su estado de dúplex y la enzima y el RNA son liberados (Lewin B., 2008).

El promotor es la región del DNA que contiene las secuencias necesarias para iniciar la transcripción. Los promotores para la RNA pol II se encuentran río arriba del sitio de inicio de la transcripción (Goodrich et al., 1996). La principal característica que define a un promotor es la localización de los sitios de unión para los factores transcripcionales que facilitan la unión de la maquinaria basal de la transcripción (Goodrich et al., 1996). Cada promotor contiene secuencias cortas conservadas que son reconocidas por una clase determinada de factor de transcripción, siendo las secuencias más alejadas río arriba las que determina si el promotor es expresado en todos los tipos celulares o es regulado específicamente (Goodrich et al., 1996). Los promotores que son expresados constitutivamente contienen secuencias de elementos río arriba que son reconocidos por activadores ubicuos, mientras que los promotores que son expresados solo en ciertos momentos o en ciertos sitios (inducibles) tienen secuencias de elementos que requieren activadores que son accesibles solo en momentos o en sitios específicos (Goodrich et al., 1996).

Un promotor suele constar de dos partes fundamentales: el promotor mínimo (core promoter) y elementos reguladores río arriba, proximales y distales. El promotor mínimo o núcleo de promotor se localiza inmediatamente río arriba del gen y es el sitio al que se une la maquinaria de transcripción basal. Típicamente, el promotor mínimo es de aproximadamente 50 nucleótidos (nt) de longitud, y contiene subregiones funcionales denominadas elementos del núcleo, como la caja TATA, BREu (elemento río arriba de reconocimiento de TFIIB), Inr (iniciador), MTE (motif ten element), DPE (elemento promotor río arriba), DCE (downstream core element) y XCP1 (X core promoter element 1) (Juven-Gershon and Kadonaga, 2010). Cabe señalar que estos elementos no se encuentran presentes en todos los núcleos de promotores, por lo que confieren propiedades específicas a cada núcleo de promotor (Juven-Gershon and Kadonaga, 2010). El promotor mínimo rodea el punto de inicio, extendiéndose a nucleótidos localizados entre -45 a +20 bases con respecto al sitio de inicio de la

transcripción. Esta región es suficiente para iniciar la transcripción, generalmente es rica en G-C y una secuencia corta rica en A-T rodea el sitio de inicio de la transcripción Inr (Lewin B., 2008). Sin embargo, su eficiencia se incrementa por el elemento promotor río arriba (UPE), otra secuencia rica en G-C relacionada al núcleo del promotor, el cual se extiende de -180 a -170 (Lewin B., 2008).

Mientras tanto, los elementos reguladores río arriba se localizan inmediatamente río arriba del promotor mínimo. En los promotores reguladores es posible encontrar diversas secuencias consenso que pueden estar mezcladas y apareadas en combinaciones diferentes (Lewin B., 2008). Las proteínas activadoras de la transcripción se unen a estas secuencias en forma directa o indirecta, las cuales establecen contacto con la maquinaria de transcripción basal afectando la velocidad a la cual se inicia la transcripción (Lewin B., 2008). Estas proteínas también regulan la transcripción al unirse a secuencias distantes llamadas intensificadores (*enhancers*); en donde el DNA comprendido entre el intensificador y el promotor forma un bucle y de esta forma se permite la interacción de las proteínas activadoras de la transcripción unidas al intensificador, con la maquinaria basal de la transcripción unida al promotor mínimo (Lewin B., 2008).

Es difícil estimar el contenido de elementos *cis*-reguladores en el genoma de metazoarios, pero es fácil imaginar que corresponden a aproximadamente a una tercera parte del genoma, un millón de pares de bases; las cuales controlan la replicación, la condensación y la segregación de cromosomas, así como la expresión de genes (Levine and Tjian, 2003). Es también proporcional la complejidad de los elementos que reconocen a los elementos *cis*-reguladores, llamados *trans*-controladores, debido a que del 5 al 10 % del total de la capacidad de DNA codificante de los metazoarios corresponde a proteínas que regulan la transcripción (Levine and Tjian, 2003). Estas proteínas comprenden diferentes clases: a) proteínas de unión a DNA específicas de secuencias que median la activación o expresión transcripcional selectiva de genes; b) proteínas generales, como componentes diversos de la maquinaria de la RNA polimerasa requeridas para el reconocimiento del promotor y la catálisis de la síntesis de RNA; y c) los complejos de remodelación y modificación de la cromatina que apoyan el complejo transcripcional para deslizarse a través de la cromatina (Levine and Tjian, 2003).

Sabemos que las diferencias fenotípicas que distinguen a los diversos reinos de eucariontes superiores es debido, a diferencias en la expresión de los genes que son transcritos por la RNA polimerasa II. Dado que proteínas diferentes se expresan en células distintas y en momentos determinados del desarrollo de un organismo, entonces la activación de los factores de transcripción es controlada por diversas vías (Lewin B., 2008). Por ejemplo, un factor es tejido específico, porque es sintetizado solamente en ese tipo particular de células, esto es típico de los factores que regulan el desarrollo, tales como las hemoproteínas (Lewin B., 2008). La expresión de estos genes puede estar regulada en al menos uno de los cinco puntos de control: 1) activación de la estructura del DNA; 2) inicio de la transcripción; 3) procesamiento del transcrito; 4) transporte del RNA al citoplasma; y 5) traducción del RNA mensajero (Lewin B., 2008).

En eucariontes, la expresión de genes es controlada principalmente en el inicio de la transcripción, la cual involucra cambios importantes en la **estructura de la cromatina** como la acetilación, metilación y/o fosforilación de las histonas, entre otras modificaciones, así como la unión de activadores o represores acompañados por la unión del aparato basal de transcripción al promotor de un gen determinado (Tovy et al., 2010)

Regulación de la transcripción en *E. histolytica*

Los factores que influyen en la expresión génica de *E. histolytica* no son del todo entendidos. La transcripción de varios genes es alterada en respuesta al medio ambiente y a variaciones en los niveles de calcio (Ramakrishnan et al., 1996). El genoma de *E. histolytica* codifica para múltiples copias de genes que han sido implicados en funciones de virulencia, por ejemplo, de 5 a 6 genes están involucrados en la codificación de las subunidades ligeras y pesadas de la lectina Gal/GalNac; más de tres genes están involucrados en la codificación de péptidos formadores de ameboporos, mientras que 50 genes codifican para cisteína proteasas (Loftus et al., 2005). Sin embargo, no todos los genes son expresados en los trofozoítos bajo las mismas condiciones (Lopez R.I., 2010). Por tal razón, la modulación de la transcripción de genes está relacionada con la patogenicidad de *E. histolytica* (Ramakrishnan et al., 1996).

Hasta el momento, el análisis de los promotores de varios genes de *E. histolytica* ha permitido la identificación de tres elementos que tienen un importante impacto sobre la función de los promotores y que pueden regular el sitio de inicio de la transcripción: la secuencia iniciadora (Inr), una secuencia parecida a la caja TATA y un nuevo elemento llamado GAAC (Haque et al., 2007; Purdy et al., 1996). Por otra parte, el estudio del promotor del gen *hgl5*, que codifica para la subunidad pesada de la lectina Gal/GalNac, permitió la identificación de cinco regiones regulatorias río arriba (URE1-URE5) (Purdy et al., 1996) (Pearson and Singh, 2010). Se ha demostrado también mediante un análisis transcripcional, que los genes *Ehpgp1* y *Ehpgp5*, codifican para proteínas involucradas en multi-resistencia a drogas, las cuales presentan secuencias semejantes a los sitios de unión de C/EBP y Hox, sugiriendo que estas secuencias regulatorias participan en la activación transcripcional de los genes *Ehpgp1* y *Ehpgp5* (Gomez et al., 1998; Perez et al., 1998).

Por otro lado, son pocos los elementos *trans*-regulatorios de la transcripción que han sido identificados en *E. histolytica*, entre ellos se encuentran; dos proteínas de unión a la caja TATA (EhTBP y EhTRF1) (Castanon-Sanchez et al., 2010; Luna-Arias et al., 1999), los factores de transcripción EhEBP1 y EhEBP2 que se unen a la secuencia URE4 (Gilchrist et al., 2001), la proteína de unión a URE3 (Gilchrist et al., 2001), la proteína de unión a URE1 (Calixto-Galvez et al., 2011) y una proteína homóloga a p53 (Mendoza et al., 2003).

Cromatina

En células eucariontes, el DNA no se encuentra disperso, por lo contrario, se mantiene compartimentalizado en el interior del núcleo, donde se estructura a través de interacciones proteína-DNA formando el complejo que conocemos como cromatina (Fig. 2) (Vaquero et al., 2003). La unidad fundamental de la cromatina es el nucleosoma, el cual está constituido por un octámero de histonas (dos de cada una de las proteínas H2A, H2B, H3 y H4), alrededor del cual interaccionan 146 pares de bases (pb) de DNA (Fig. 2) (Zhang and Reinberg, 2001). Cada nucleosoma está unido entre sí por el DNA “*linker*” o de unión, que forma una fibra de 10 nm, también conocida como cuentas de rosario (Fig. 2). Estas cuentas se condensan todavía más a través de la histona H1 para formar la estructura de 30 nm denominada solenoide (Vaquero et al., 2003). Por último, el solenoide es fuertemente empaquetado para formar superestructuras que dan origen a los cromosomas. Esta estructura en la cromatina trae como consecuencia una inaccesibilidad de las proteínas reguladoras que reconocen secuencias blanco en el DNA. Por lo tanto, la estructura de la cromatina se vuelve un obstáculo para la actividad transcripcional, es decir para la expresión de los genes. Por lo anterior, es necesario que la cromatina empaquetada se remodele para que las proteínas que regulan la expresión génica tengan acceso al DNA y éste se exprese (Strahl and Allis, 2000).

La cromatina se puede encontrar en dos formas ***heterocromatina*** y ***euromatina***. La ***heterocromatina*** es una forma condensada, y por tanto inactiva, localizada sobretodo en la periferia del núcleo (Vaquero et al., 2003). En 1928 Emil Heitz basándose en observaciones histológicas, definió a la heterocromatina como los segmentos cromosómicos que aparecían muy condensados y oscuros en el núcleo en interfase (Rea et al., 2000). La heterocromatina puede ser de dos tipos diferentes: *constitutiva* y *facultativa*; la constitutiva, es idéntica para todas las células del organismo y carece de información genética codificante, aquí encontramos a los telómeros y centrómeros del los cromosomas, que no expresan su DNA. (Tovy et al., 2010). Este tipo de cromatina contiene un tipo particular de DNA denominado DNA satélite, el cual está formado por un gran número de secuencias cortas repetidas en tándem, además este tipo de cromatina es estable pero polimorfica; sin embargo, conserva

sus propiedades heterocromáticas durante todas las etapas del desarrollo y en todos los tejidos (Rea et al., 2000). Por otro lado, la heterocromatina facultativa, es diferente en los distintos tipos celulares, contiene información sobre aquellos genes que no se expresan o que pueden expresarse en algún determinado momento (Strahl and Allis, 2000). La heterocromatina facultativa se caracteriza por ser reversible, lo cual dependerá de la etapa de desarrollo y tipo celular, y por la presencia de secuencias repetidas del tipo de los elementos intercalados largos (LINEs, del inglés Long Interspersed Elements). Además, esta cromatina no es particularmente rica en DNA satélite, y por ello, no es polimórfica (Lewin B., 2008). En el caso de la **Eucromatina**, o forma activa de la cromatina, la cual está diseminada por el resto del núcleo (en regiones menos condensadas), y es la cromatina que se está transcribiendo de DNA a moléculas de RNAm, por lo que es aquí donde se encuentran la mayoría de los genes activos (Lewin B., 2008)

Como se ha descrito, la cromatina es una estructura dinámica que adapta su estado de compactación y empaquetamiento para optimizar los procesos de replicación, transcripción y reparación del DNA y juega un rol regulatorio fundamental en la expresión génica (Tovy and Ankri, 2010). Los distintos estados de compactación pueden asociarse al grado de transcripción que exhiben los genes localizados en esas zonas (Strahl and Allis, 2000). La cromatina es, en principio, fuertemente represiva para la transcripción, ya que la asociación de DNA con las distintas proteínas dificulta la proyección de las diferentes RNA polimerasas (Vaquero et al., 2003). Por lo tanto, existe una variada cantidad de máquinas remodeladoras de la cromatina y modificadoras de histonas que permiten que se lleve a cabo la transcripción de grupos de genes o la represión de los mismos (Tovy and Ankri, 2010)

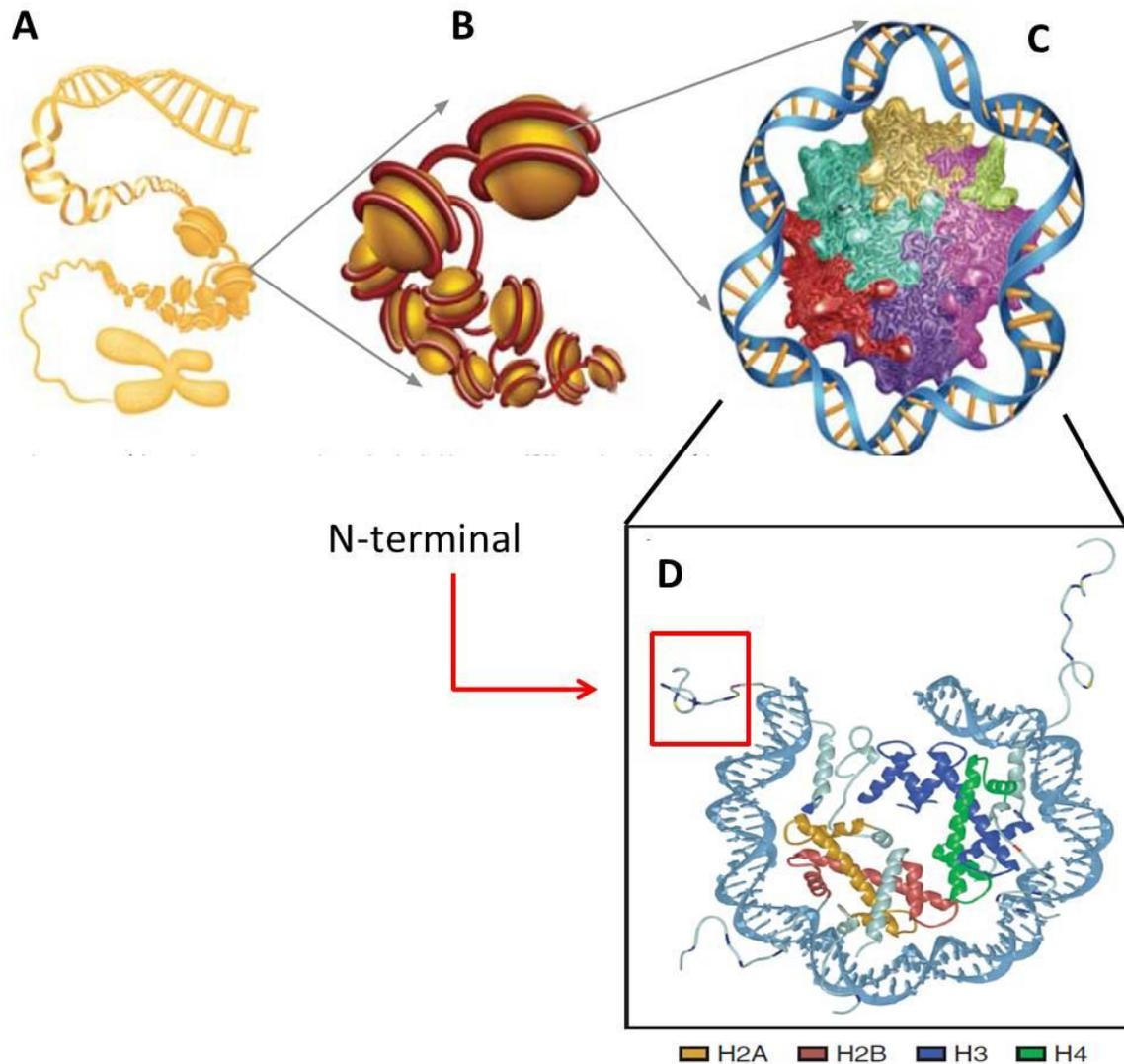


Figura 2. Estructura de la cromatina en las células eucariotas superiores. A) Cromosoma formado con DNA compactado por histonas. El tamaño aproximado del cromosoma es de 1400 nanómetros (nm). B) Estructura conocida como la fibra de 10 nm o “cuentas de rosario”. C) Constitución del nucleosoma, conformado por un octámero de histonas: dos de cada una de las histonas H2A, H2B, H3 y H4 alrededor del cual interaccionan 146 pares de bases (pb) de DNA. D) Estructura cristalizada del nucleosoma, en donde las histonas interaccionan entre ellas a través de su C-terminal, mientras que el N-terminal (rectángulo) se vuelve susceptible a modificaciones post-traduccionales. Tomada y modificada de (Vaquero et al., 2003)

Epigenética

La palabra *epigenética* se deriva del griego “*epi*” (en o sobre) y genética es un término derivado del griego “*gen*” (descendencia). Genética es una rama de la biología que estudia la transmisión de los caracteres hereditarios de una generación a otra (Jenuwein and Allis, 2001). Por lo tanto, la *epigenética* hace referencia al estudio de los elementos que, sin alterar el código genético, interactúan con el DNA permitiendo la activación y/o represión transcripcional de genes (Jenuwein and Allis, 2001; Rea et al., 2000). La epigenética fue definida por Waddington en 1939 como las interacciones casuales entre los genes y sus productos y de las cuales resulta el fenotipo (Jenuwein and Allis, 2001). De nuestro conocimiento actual podemos definir a la epigenética como la herencia de la actividad del DNA que no depende de la secuencia estricta del mismo, refiriéndonos a esto como las modificaciones químicas que ocurren en el DNA y en las proteínas reguladoras del mismo, permitiendo de forma controlada la expresión o represión génica bajo condiciones ambientales específicas (Jenuwein and Allis, 2001). Los mecanismos epigenéticos identificados hasta el momento son básicamente los siguientes (Dalmasso et al., 2011; Jenuwein and Allis, 2001; Tovy and Ankri, 2010)(Fig. 3):

- 1) Adición de grupos metilo directamente al DNA.
- 2) Reclutamiento de proteínas dependientes de ATP encargadas de remodelar la cromatina.
- 3) Reemplazo de las histonas canónicas por variantes especializadas.
- 4) Modificaciones post-traduccionales en las histonas canónicas.

Modificaciones posttraduccionales en las histonas

Las modificaciones posttraduccionales que sufre el N-terminal de las histonas son principalmente la acetilación, fosforilación, ubiquitinación, ADP-ribosilación, sumoilación, desiminación y metilación, entre otras (Roque, 2007; Tovy and Ankri, 2010). Estas modificaciones pueden tener como consecuencia lo siguiente: I) facilidad de que las proteínas se asocian a la cromatina (factores transcripcionales, reguladores dependientes de ATP, etc.); II) generación de combinaciones antagónicas o sinérgicas de diferentes modificaciones en el N-terminal de las histonas dentro de un nucleosoma; III) dinámica en la

euromatina y heterocromatina ocasionada por la abundancia de histonas modificadas en ciertos residuos específicos; IV) modificaciones en las histonas que son heredadas por las células hijas tras la replicación del DNA (Strahl and Allis, 2000; Vaquero et al., 2003). Estos eventos permiten que la cromatina sea modificada y regulada epigenéticamente (Jenuwein and Allis, 2001).

Las modificaciones en las histonas son ocasionadas por enzimas encargadas de modificar posttraduccionalmente el extremo N-terminal de las histonas (Fig. 3) (Grant, 2001; Khorasanizadeh, 2004). La metilación es producida por la adición de uno a tres grupos metilo al extremo N-terminal principalmente de las histonas H3 y H4 (Fig. 4) (Rice and Allis, 2001). La identificación de las enzimas que llevan a cabo esta modificación no ha sido nada sencilla, ya que la metilación, a diferencia de la acetilación y fosforilación, no altera la carga de las histonas. Esta característica ha dificultado que las histonas metiladas se puedan resolver en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE), además hasta hace poco no existían reactivos inmunológicos que ayudaran a su detección (Strahl and Allis, 2000). En los últimos años, esta modificación ha sido objeto de muchos estudios, los cuales han permitido establecer que las metiltransferasas de histonas (HMTs) son las enzimas responsables de adicionar 1, 2 y hasta 3 grupos metilo (1, 2 y 3 me), a residuos de arginina (R) y lisina (K), en el N-terminal de las histonas (Volkel and Angrand, 2007; Zhang and Reinberg, 2001). Por esta razón, las HMTs están divididas en dos grandes familias: las específicas para residuos de arginina (PRMTs) y las que metilan residuos de lisina (HKMTs) (Volkel and Angrand, 2007; Zhang and Reinberg, 2001). En general, las PRMTs están relacionadas con la actividad transcripcional, mientras que las HKMTs están involucradas con el silenciamiento y/o la activación génica (Zhang et al., 2013; Zhang and Zhang, 2015). Ambos tipos de enzimas transfieren los grupos metilo de su donador, el S-adenosil-L-metionina (SAM o también llamado AdoMet), a su proteína blanco (Jenuwein and Allis, 2001; Volkel and Angrand, 2007). El SAM es una coenzima que participa en la transferencia de grupos metilo y se compone de adenosina trifosfatada (ATP) y metionina (Berg M. J., 2008). Las rutas metabólicas que utilizan a SAM son las transmetilaciones, produciéndose la mayoría en el hígado; las reacciones que producen, consumen y regeneran al SAM, conforman al denominado ciclo del SAM (Berg M. J., 2008). En la primera etapa, las metilasas dependientes de SAM lo aprovechan como sustrato y producen AdoHcy, el cual es hidrolizado a homocisteína y adenosina, mediante la

enzima S-adenosil homocisteína hidrolasa. La homocisteína es reciclada de nuevo a metionina por una metionina sintetasa y así la metionina es convertida de nuevo en SAM completándose el ciclo (Berg M. J., 2008).

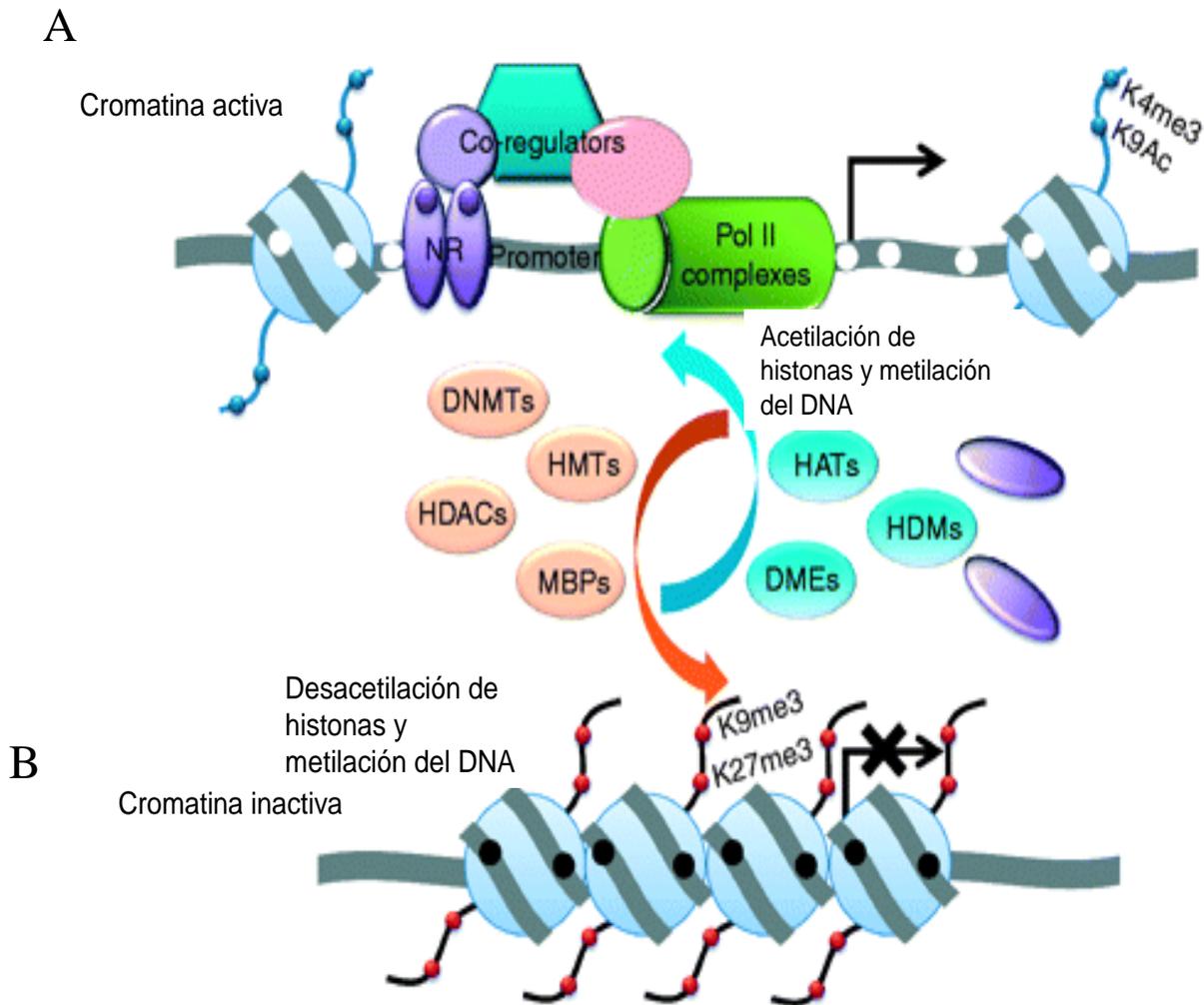


Figura 3. Mecanismo de activación y represión génica que involucra modificaciones en los extremos N-terminal de las histonas. A) Esquema de la cromatina transcripcionalmente activa, donde la acetilación de H3K9 me3 (K9Ac) está mediada por las acetiltransferasas de histonas (HATs) y la metilación de H3K4 (K4me3) está mediada por las metiltransferasas de histonas (HMTs), estas marcas epigenéticas están relacionadas con el relajamiento de la cromatina, lo que permite que se reclute la maquinaria transcripcional y por ende la expresión génica. B) Esquema de la cromatina transcripcionalmente inactiva, donde se muestra como se recluta la maquinaria de silenciamiento epigenético: metiltransferasas de DNA (DNMTs), desacetilasas de histona (HDACs), proteínas de unión a K metiladas (MBDs) y HMTs, las cuales transfieren 3 metilos a los residuos H3K9 y K27, permitiendo de esta manera la represión génica estable, tomada y modificada de (Zhang and Ho, 2011)

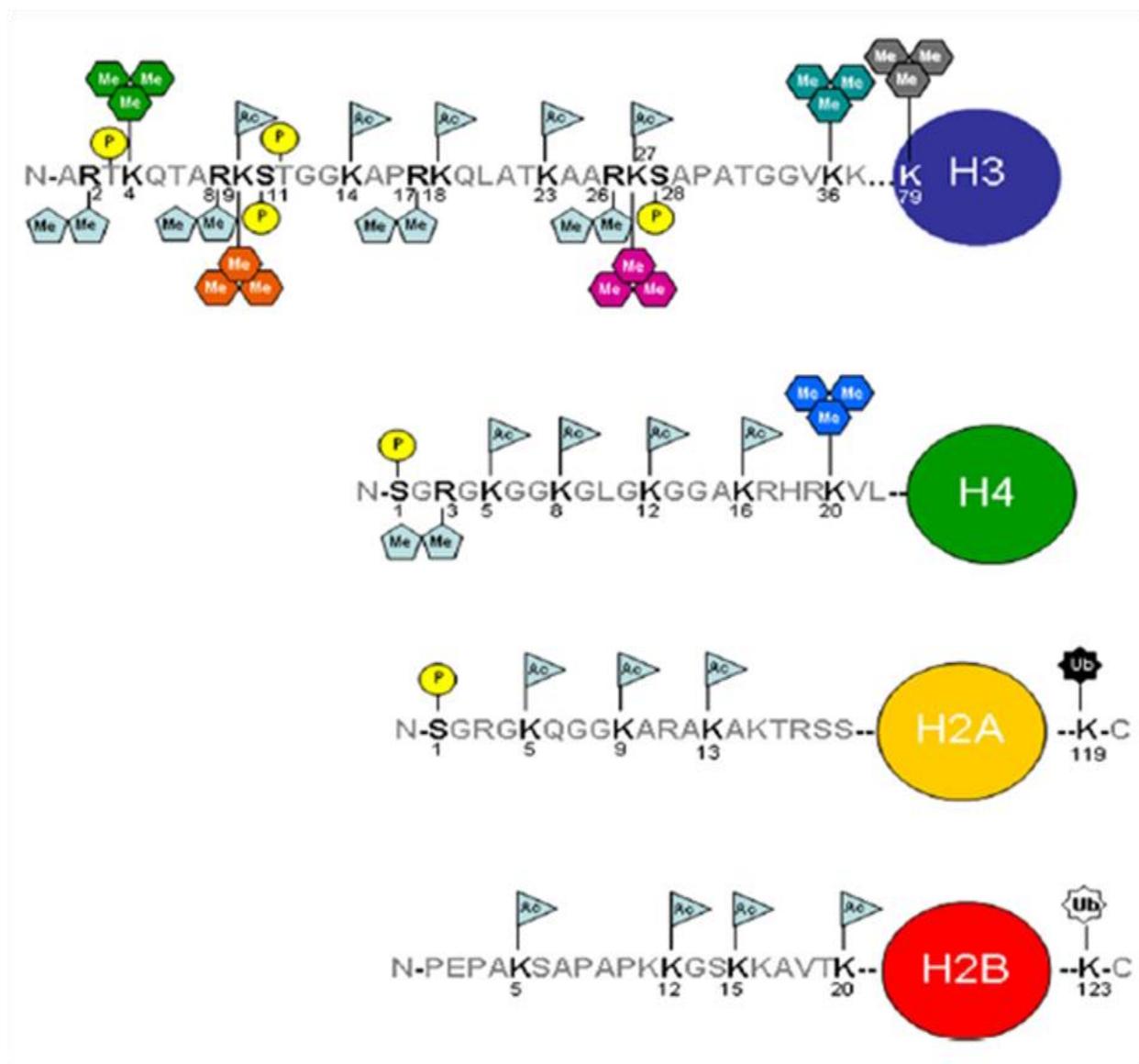


Figura 4. Código de modificaciones en los extremos amino y carboxilo de las histonas. Los extremos N- y C- terminal de las histonas son susceptibles a modificaciones transcripcionales que están relacionadas con la actividad transcripcional. (Ac) acetilación; (P) fosforilación; (Me) metilación y (Ub) ubiquitinación, imagen tomada de (Volkel and Angrand, 2007).

Metiltransferasas de arginina (PRMTs)

Las PRMTs metilan a las histonas H3, H4 y a proteínas no histonas, como los coactivadores P300, CBP y SRC3; además, son coreguladoras de un gran número de factores transcripcionales como: p53, NF- κ B, PPAR γ , RUNX1 y E2F1, entre otros (Roque, 2007). Las PRMTs también están involucradas en el procesamiento del RNAm, incluyendo la transcripción, el *splicing*, el transporte y la traducción (Bedford and Clarke, 2009). Se ha demostrado que el *splicing* puede ser bloqueado si no hay metilación; además de que la PRMT denominada CARM1 metila factores de *splicing* como CA150, SAP49 y Sam68, entre otros (Bedford and Clarke, 2009). La di-metilación en los residuos de arginina en posición 2 y 3 de la histona H3 (H3R2 me2 y H4R3 me2), mediada por las enzimas PRMT6 y PRMT1 respectivamente, están ampliamente relacionadas con la actividad transcripcional y el reclutamiento de proteínas que poseen dominios PHD, cromodominio y Tudor (Bedford and Clarke, 2009).

En existen cuatro tipos de PRMTs (Bedford and Clarke, 2009; Zhang and Reinberg, 2001): las PRMTs de tipo I son aquellas que agregan los grupos metilo en ω - nitrógeno de la arginina, produciendo mono metilación en los residuos de arginina (MMA) y/o di metilación asimétrica en residuos de arginina (ADMA) (Fig. 5). Las PRMTs de tipo II también producen MMA en el ω - nitrógeno de la arginina pero el segundo metilo lo adicionan de manera simétrica (SDMA) (Fig. 5). Mientras que las de tipo III y IV solo producen MMA (Fisk and Read, 2011; McBride et al., 2000). En humanos existen 9 PRMTs (PRMT1-9), PRMT1, PRMT2, PRMT3, PRMT4 PRMT6, PRMT8 pertenecen al tipo I, mientras que PRMT5 y PRMT9 presentan actividad de tipo II y PRMT7 actividad de tipo III (Bedford and Clarke, 2009). Las PRMTs de tipo IV solo se han descrito en hongos (McBride et al., 2000). Las PRMTs varían en longitud, pero mantienen dominios específicos altamente conservados (Fig. 6 y 7) (Zhang and Reinberg, 2001). Uno de estos dominios es el de unión al donador de metilos SAM, este dominio tiene una estructura típica de “*rosman fold*” 6 hojas β plegadas y 2 pares de α hélices (Fig. 6, verde). Además, estas enzimas poseen 2 α hélices en el N-terminal que interactúan con el dominio S-adenosil homocisteina (AdoHcy) (Fig. 6, rojo) (Fisk and Read, 2011; Zhang and Reinberg, 2001). Otro dominio posee forma de barril (Fig. 6, amarillo) (Zhang and Reinberg, 2001). El sitio activo de la proteína es altamente conservado,

se localiza entre los dominios mencionados anteriormente y consta de 12 residuos que conforman las asas denominados THW y E (Fig. 6 y 7), los cuales facilitan la unión a SAM (Bedford and Clarke, 2009). Cuando las PRMTs se encuentran inactivas, el dominio de unión a SAM une cinco moléculas de agua en los sitios I, II y III, evitando así la transmetilación (Fig. 6, en azul) (Bedford and Clarke, 2009; Fisk and Read, 2011)

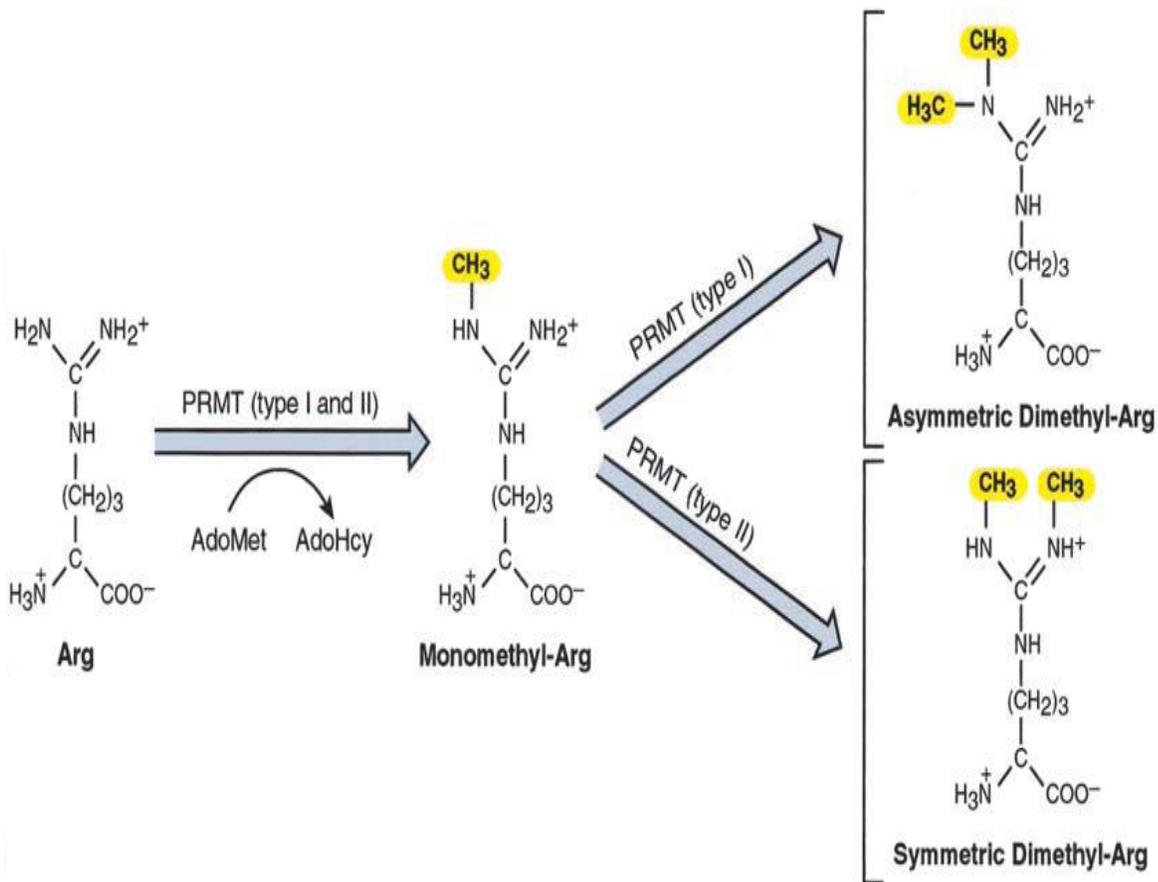


Figura 5. PRMTs. Existen dos tipos principales de PRMTs denominados tipo I y tipo II. El grupo de PRMT I agrega los metilos de manera asimétrica, mientras que el grupo de PRMT II los agrega de forma simétrica (tomado de (Zhang and Reinberg, 2001)).

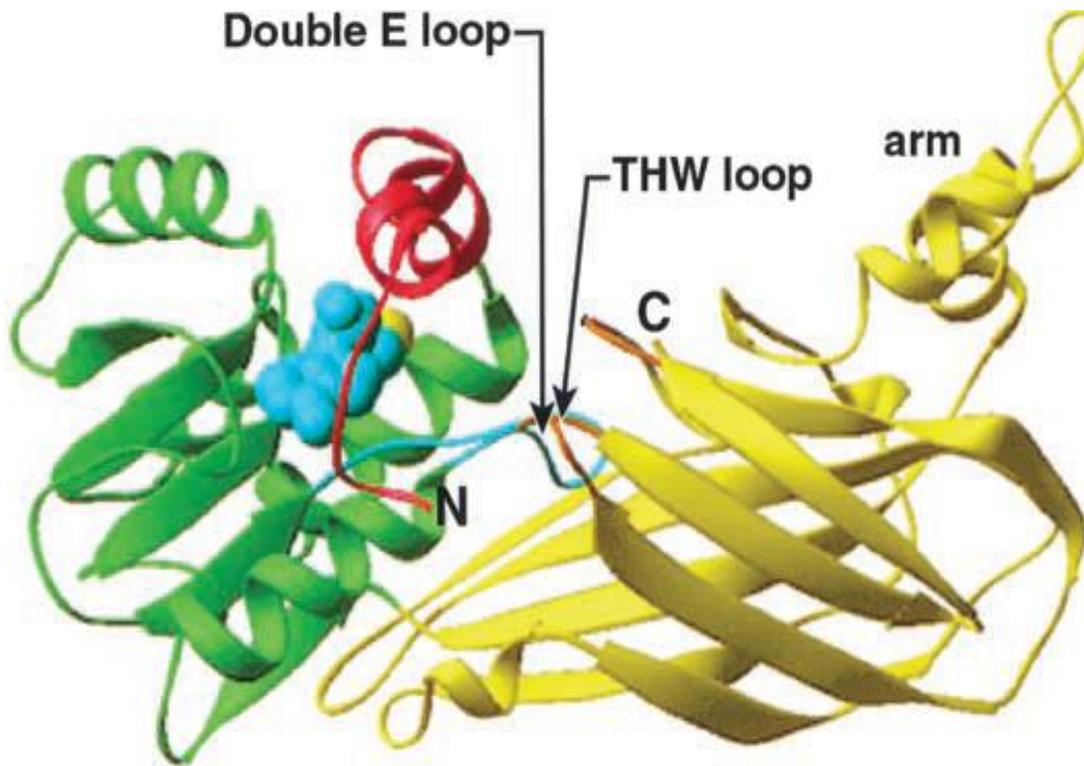


Figura 6. Estructura terciaria de la PRMT 3 de humano. En rojo, dos hélices α ubicadas en el N-terminal de la proteína que se unen a AdoHcy. En verde, el dominio de unión al SAM. En amarillo, la estructura tipo barril. El sitio activo está compuesto por las dos asas THW y E indicados en el centro de dos dominios mencionados anteriormente, en azul las cinco moléculas de H_2O que evitan la transmetilación cuando la enzima está en forma inactiva (tomado de (Zhang and Reinberg, 2001)).

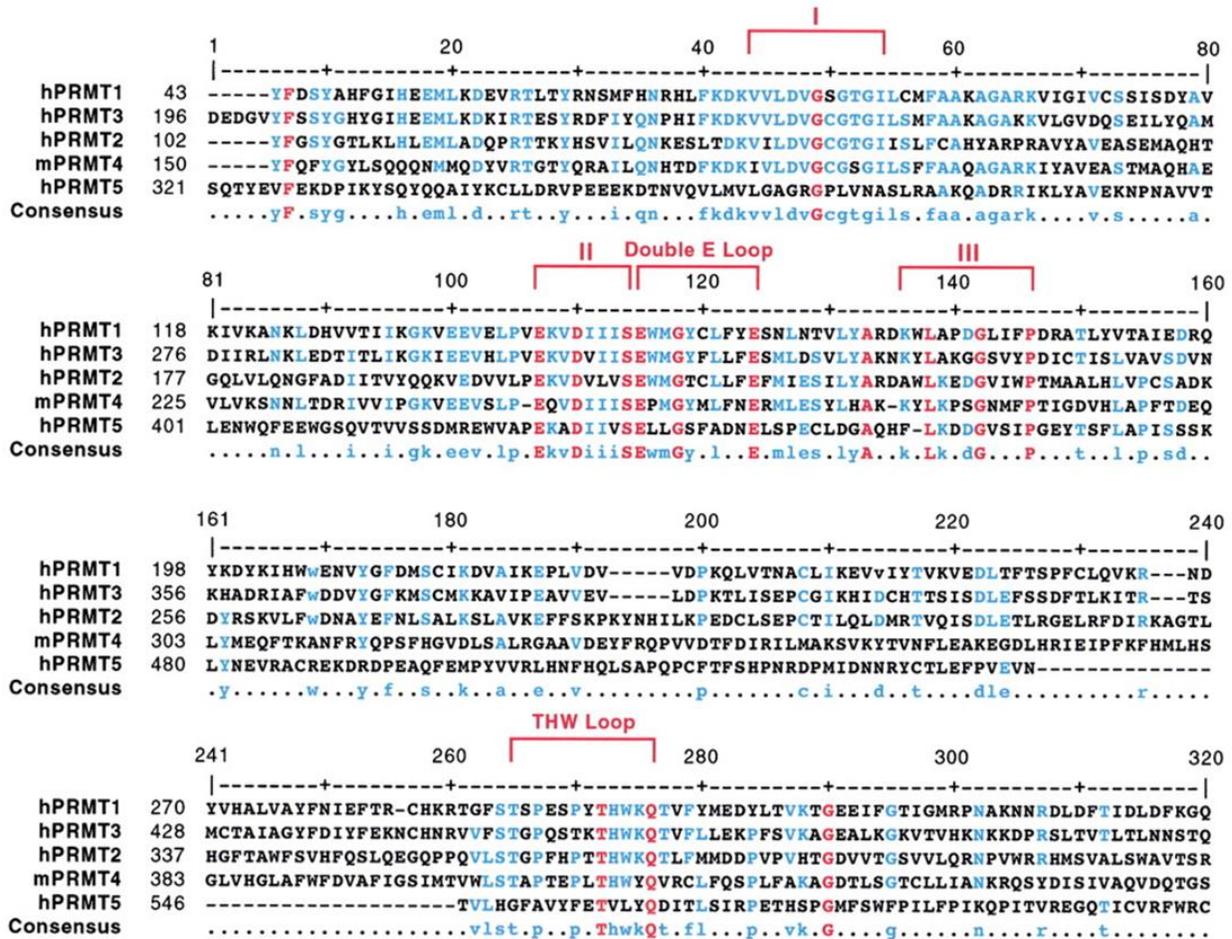


Figura 7. Alineamiento de las cinco familias de PRMTs en humano. En rojo se marcan los aminoácidos (aa) idénticos y en azul los aa similares. Los dominios I, II y III son importantes para la actividad catalítica y las dos asas representan el sitio activo de la proteína (tomado de (Zhang and Reinberg, 2001)).

Metiltransferasas de lisina (HKMTs)

Las HKMTs transfieren de uno a tres grupos metilo a los residuos de lisina (K) (Fig. 8). La metilación de las K presentes en las histonas ocasionada por las HKMT comienza después de la formación de los nucleosomas y es máxima durante la mitosis (Cheng et al., 2005; Volz et al., 2012). Durante la interfase, se metilan preferentemente las histonas H3 y H4. El N-terminal de la H3 se metila en varios residuos, de los cuales la adición de tres metilos en los residuos de lisina 4, 36 y 79 (H3K4 me3, K36 me3 y K79 me3), son propias de zonas transcripcionalmente activas en la cromatina (Iizuka and Smith, 2003; Strahl and Allis, 2000). Otra función importante de la metilación ocasionada por las HKMT es la demarcación de los dominios de eucromatina y heterocromatina (Zhang and Reinberg, 2001). Las fronteras de la heterocromatina se mantienen con la presencia de los dominios adyacentes de eucromatina (Fig. 3) (Grant, 2001; Jenuwein and Allis, 2001). Por otra parte, se sabe que H3K27 me3 está relacionada con el silenciamiento del cromosoma X en humanos, mientras que la trimetilación en H3K9 (H3K9 me3) está relacionada con el mantenimiento de la heterocromatina pericentromérica, además, se ha demostrado que esta marca epigenética es importante para el reclutamiento de la proteína de heterocromatina HP1 (Zhang and Zhang, 2015). Por otro lado, la marca epigenética H4K20 me3 está relacionada con el daño al DNA, ya que esta marca es reconocida por los complejos de reparación del DNA y además está relacionada con la formación de heterocromatina constitutiva presente en centrómeros y telómeros (Rice and Allis, 2001; Roque, 2007).

Las HKMTs se caracterizan por tener un dominio conservado evolutivamente de aproximadamente 130 aminoácidos (aa) (Fig. 8) que permite la transferencia de 1, 2 ó 3 metilos al N-terminal de las histonas. Este dominio se le conoce como dominio SET (Dillon et al., 2005) y presenta multimotivos característicos involucrados en el reconocimiento de los sustratos proteicos, de esta forma la enzima puede identificar las colas de las histonas (Iizuka and Smith, 2003; Zhang and Reinberg, 2001). El dominio SET es un dominio rico en conformaciones β plegadas, donde la región C-terminal juega un rol importante en la unión a su sustrato y en la catálisis (Fig. 9). Dentro de esta región se encuentra un residuo de tirosina (Y238 en las proteínas SET 7/9), que remueve un protón del grupo amino del residuo de lisina de la histona, originando el ataque nucleofílico ocasionado por el grupo metilo del

sustrato SAM (Zhang and Reinberg, 2001). De hecho, las estructuras tridimensionales de las HKMTs muestran que el donador de metilos SAM se une a la hendidura, lo que permite su intercambio del producto de reacción SAM por AdoHcy, sin soltar a la histona, conduciendo a la metilación del N- terminal de las histonas H3 y H4 (Iizuka and Smith, 2003; Zhang and Reinberg, 2001)

Las HKMTs han sido clasificadas con base en los dominios que las constituyen, a la posición en la que se encuentra el dominio SET y a la presencia o no de secuencias ricas en cisteínas que flanquean el dominio SET, denominadas preSET y postSET, las HKMTs han sido agrupadas en cuatro familias (Iizuka and Smith, 2003; Zhang and Reinberg, 2001):

A) SET 1: sus miembros presentan un dominio SET hacia el extremo C- terminal, seguido de un dominio postSET.

B) SET 2: los miembros de esta familia poseen un dominio SET central, siempre seguido de un post-SET y precedido por un dominio rico en cisteínas denominado AWS.

C) RIZ: los representantes de esta familia tienen el dominio SET hacia el N- terminal, no presentan dominios pre/o postSET y poseen motivos para dedos de zinc agrupados en el extremo N- terminal.

D) SUV39: presentan un cromodominio y un dominio SET central precedido por un dominio preSET.

Se ha descubierto en los últimos años una quinta familia de HKMTs, la cual no posee un dominio SET y es estructuralmente más parecida a los motivos catalíticos de las PRMTs. Esta nueva familia está representada por la enzima DOT1 (disruptor of telomeric silencing -1) (Zhang and Reinberg, 2001). Reportes recientes han demostrado que DOT1 tiene actividad de metiltransferasa de la histona H3 en el residuo K79, modificación que se ha asociado con el silenciamiento de los telómeros y además está relacionada con la meiosis (Zhang and Reinberg, 2001).

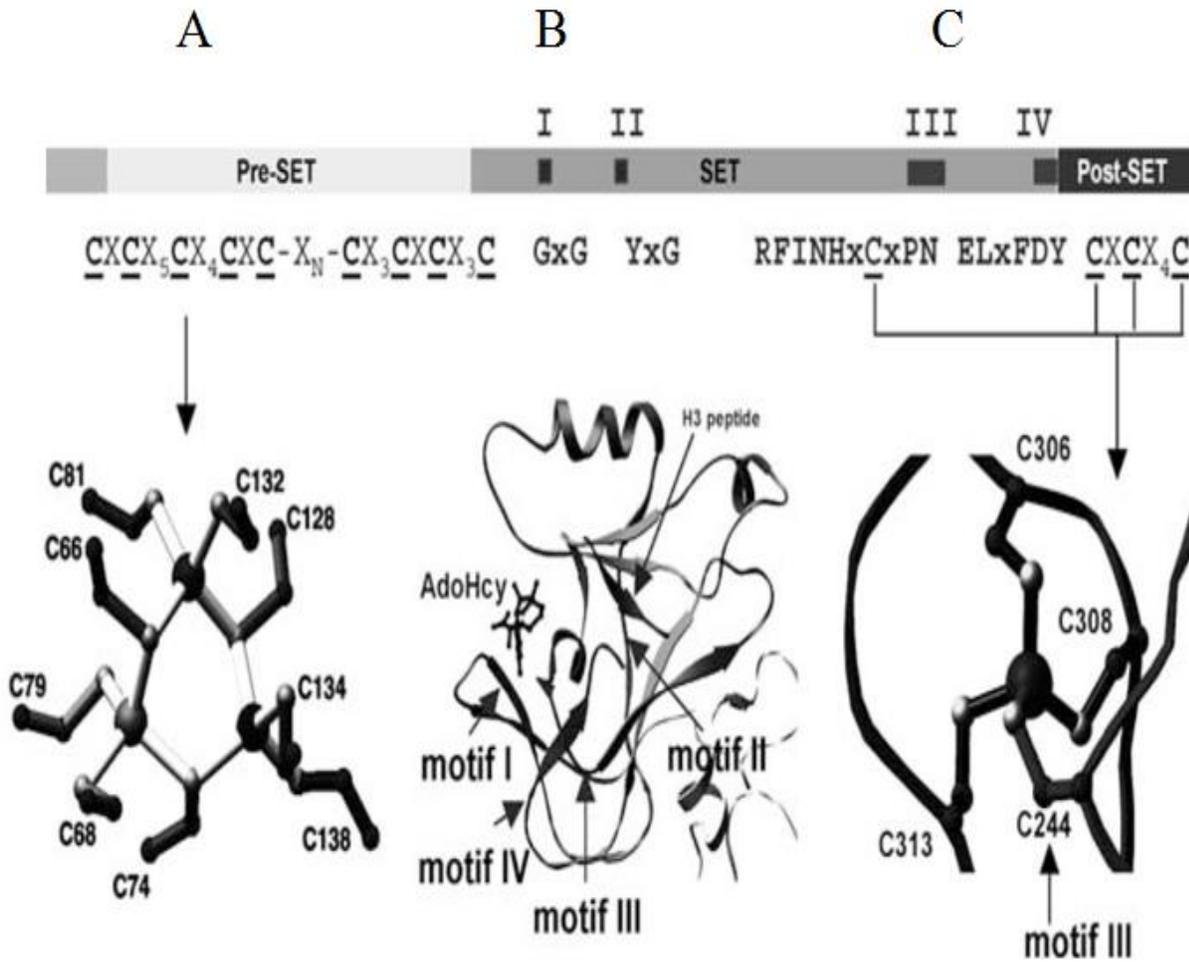


Figura 9. Estructura terciaria de los dominios preSET, SET y postSET de las HKMTs. A) Dominio preSET, posee 9 cisteínas que contribuyen a la actividad catalítica de la enzima. B) Dominio SET, que contiene multimotivos que permiten la unión del AdoMet. C) Dominio postSET que posee cuatro cisteínas que facilitan la interacción con su donador y sustrato, imagen tomada y modificada de (Cheng et al., 2005)

ANTECEDENTES

Epigenética en protozoarios parásitos.

El estudio de la cromatina en eucariontes unicelulares ha permitido comprobar que los mecanismos epigenéticos están involucrados en la regulación transcripcional de estos organismos. Estudios epigenéticos realizados en parásitos protozoarios causantes de diversas enfermedades en mamíferos, han permitido el desarrollo de estrategias y modelos para entender mejor su biología. La secuenciación de los genomas de *Toxoplasma gondii*, *Plasmodium falciparum* y *Trypanosoma brucei* reveló que estos organismos poseen un amplio repertorio de la maquinaria necesaria para remodelar la cromatina, sugiriendo que la regulación epigenética juega un papel importante en la expresión génica de estos protozoarios (Fig. 10) (Hakimi and Deitsch, 2007).

T. gondii, *P. falciparum* y *T. brucei* poseen ciclos de vida complejos que incluyen a más de un huésped y pasan por diferentes estadios morfológicos. Estos eventos se llevan a cabo gracias a que la regulación génica es estricta, específicamente en los siguientes puntos clave (Hakimi and Deitsch, 2007):

1. Activación y/o silenciamiento de genes específicos durante la diferenciación celular del parásito.
2. Expresión exclusiva de algunos genes que participan en la virulencia del parásito, evadiendo la respuesta inmune de sus hospederos y en proceso de variación antigénica que requieren de la expresión génica controlada y coordinada de proteínas de superficie.

En *T. gondii* se han identificado y caracterizado diversas proteínas pertenecientes a la regulación epigenética como: acetiltransferasas (HATs) (TgGCN5-A, TgGCN5-B, TgMYST-A y TgMYST-B) (Jeffers and Sullivan, 2012; Smith et al., 2005), desacetilasas de histonas (HDACs) (TgHDAC3 y TgSir2) (Bougdour et al., 2008); PRMTs (TgPRMT1 y TgCARM1) (Fisk and Read, 2011; Saksouk et al., 2005); HKMTs (TgSET1, TgSET2, TgSET3 y TgSET8) (Bougdour et al., 2008; Dixon et al., 2010) y desmetilasas (HDMTs) (TgJMJD6 y

TgJARIDI/LSD1) (Bougdour et al., 2008; Sullivan Jr et al., 2009). Por otro lado *T. gondii* contiene las cuatro histonas canónicas, pero la H2B posee dos proteínas canónicas adicionales. También contiene dos variantes de H2A (H2AZ y H2AX), una de H2B (H2Bv) y una de H3 (H3.3), pero no presenta variantes de la H4 y carece de la H1 (Dalmaso et al., 2011; Dixon et al., 2010).

Mientras tanto, *P. falciparum* codifica para las cuatro histonas canónicas y cuatro variantes (H2A.Z, H2Bv, H3.3 y CenH3) (Dalmaso et al., 2011; Trelle et al., 2009). La H1 no ha sido identificada, lo cual explica la carencia de compactación del DNA en el núcleo (Cui and Miao, 2010). Se ha visto que el reemplazo de histonas canónicas por las variantes influye en la estabilidad de los nucleosomas y por ende en los patrones de remodelación de la cromatina (Volz et al., 2012). Las histonas canónicas y las variantes sufren modificaciones covalentes en su N- y C-terminal, facilitando la estabilidad de la cromatina, lo que se ve reflejado en los procesos biológicos del parásito (Cui and Miao, 2010). En este organismo también se han identificado y caracterizado proteínas como las HATs (PfGCN5 y PfMYST) (Fan et al., 2004; Miao et al., 2010); HDACs (PfHDAC I, PfSir2-A y PfSir2-B) (French et al., 2008; Joshi et al., 1999); PRMTs (PfPRMT1) (Fan et al., 2009); HKMTs (PfSET1, PfSET2, PfSET3 y PfSET8) (Cui et al., 2008); HDMTs (PfLSD1, PfJHDM1 y 2) (Cui et al., 2008); PfSWI2/SNF2 (Cui and Miao, 2010) y las proteínas encargada de ubiquitinar a las histonas (Ubls, PfSUMO y PfNedd8) (Cui and Miao, 2010)

T. brucei no posee los promotores transcripcionales tradicionales presentes en otros eucariontes, sino que la RNA Pol II transcribe al RNAm en policistrones que maduran a monocistrones mediante *trans-splicing* (Rudenko, 2010). Al no presentar promotores tradicionales se sugiere que la regulación epigenética es muy importante en la regulación de la expresión genética de este parásito (Wright et al., 2010). *T. brucei* codifica para las cuatro histonas canónicas y posee las variantes H2A.Z, H2Bv y H3V (Rudenko, 2010). Las proteínas de la maquinaria de regulación epigenética que se han identificado son: PRMTs (TbPRMT1 y TbPRMT5) (Fisk and Read, 2011) y HKMTs (TbDOT1- B y TbSWI2/SNF2) (Rudenko, 2010).

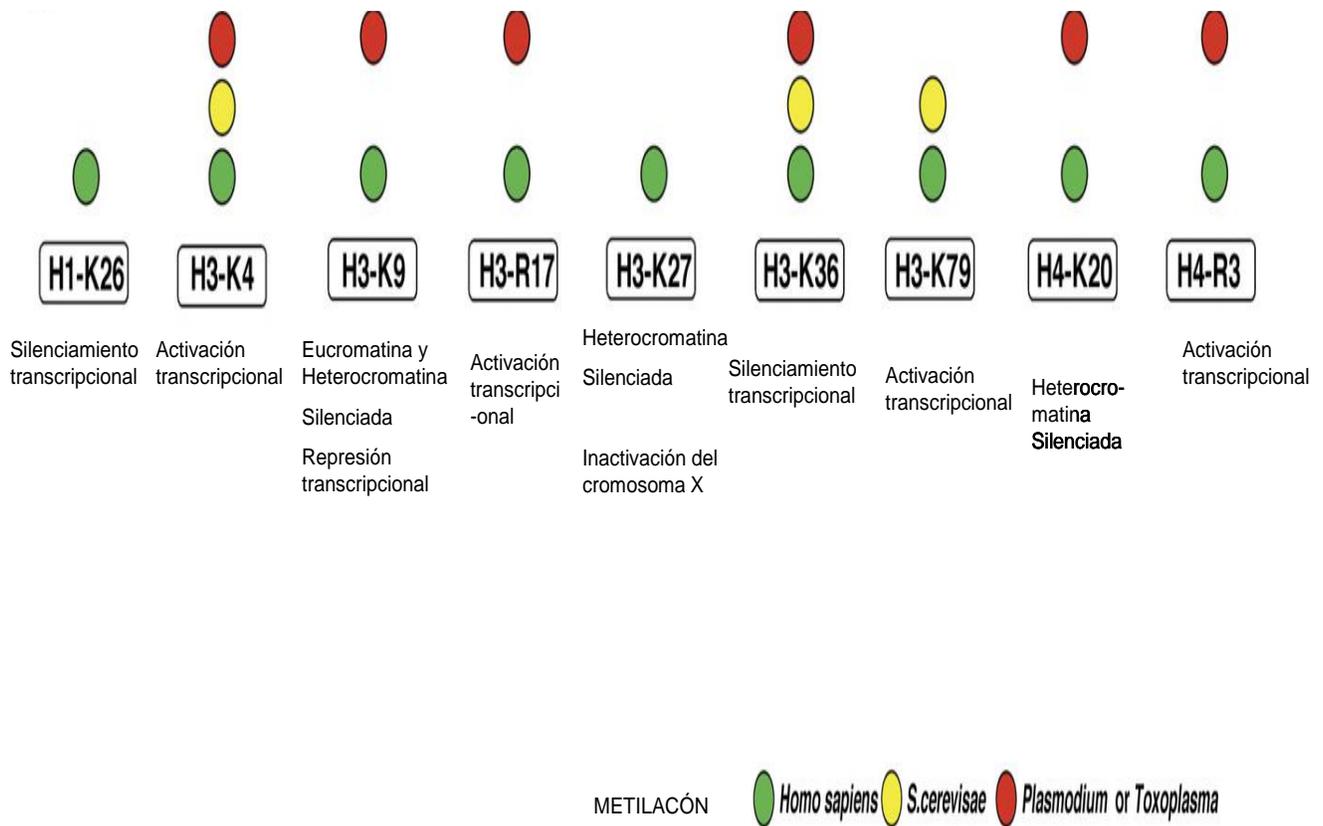


Figura 10. Comparación de las marcas de metilación en el N-terminal de las histonas H3 y H4 en eucariontes unicelulares y humano. Las marcas de metilación en las histonas H3 y H4 que están involucradas en la regulación transcripcional han sido reportadas en humano (verde), *Saccharomyces* (amarillo), *P. falciparum* y *T. gondii* (rojo), tomada de (Hakimi and Deitsch, 2007)

Antecedentes directos.

La cromatina en amiba es empaquetada en estructuras semejantes a nucleosomas, aunque de forma irregular (Meza, 2000; Torres-Guerrero et al., 1991). Se han encontrado varios genes en *E. histolytica* que codifican para las cuatro histonas canónicas H2A, H2B, H3 y H4 (Dalmaso et al., 2011). Sin embargo, el DNA-*linker* que separa a cada nucleosoma exhibe una irregularidad en su longitud comparada con la encontrada en eucariontes superiores que es de 40 pares de bases (pb) (Torres-Guerrero et al., 1991); además, se ha encontrado que el N-terminal de las histonas de la amiba es altamente divergente en comparación con el de otros eucariontes (Ramakrishnan et al., 2004). A pesar de esas diferencias, se ha demostrado que *E. histolytica*, como otros protozoarios, posee proteínas involucradas en la regulación epigenética (Binder et al., 1995; Lozano-Amado et al., 2016; Ramakrishnan et al., 2004).

Mediante ensayos de western blot utilizando anticuerpos específicos contra residuos de lisina acetilados se confirmó que las histonas de *E. histolytica*, en particular H3 y H4, pueden sufrir acetilación (Ramakrishnan et al., 2004). Además, mediante ensayos de PCR y RT-PCR se confirmó la presencia de los genes y los transcritos de las HATs, *Ehgcn5* y *Ehmyst*, indicando su expresión *in vivo* (Ramakrishnan et al., 2004). Así mismo, la producción de la proteína recombinante EhMYST demostró la capacidad de acetilar específicamente a la EhH4 (Ramakrishnan et al., 2004). Por otro lado, se identificó el gen que codifica para la desacetilasa EhHDAC I y se evaluó su actividad catalítica en trofozoítos previamente tratados con el inhibidor específico de las desacetilasas tricostatina A (TSA), encontrando diferencias significativas entre el control y los trofozoítos tratados con el inhibidor (Ramakrishnan et al., 2004).

Previamente se demostró la presencia de un gen en *E. histolytica* que codifica para una metiltransferasa de DNA (Ehmeth) homólogo a la DNMT2 de humano y mediante RT-PCR se observó la presencia del transcrito en los trofozoítos (Fisher et al., 2004). Así mismo, por ensayos de inmunofluorescencia se localizó a Ehmeth en citoplasma y núcleo de trofozoítos amibanos y adicionalmente se demostró que la proteína recombinante tiene actividad catalítica *in vitro*. Interesantemente, los trofozoítos tratados con el inhibidor específico para

las DNMTs 5-Azacytidina (5-azaC) inducen menor formación de absceso hepático en hámster, con respecto a los trofozoítos control (Fisher et al., 2004). Estos resultados sugieren que los procesos epigenéticos mediados por la metilación del DNA son importantes para la virulencia del parásito. Estudios adicionales indican que Ehmeth posee una actividad dual al ser capaz de metilar al DNA y al RNA (Lavi et al., 2006), sugiriendo que en *E. histolytica* la metilación de DNA no está restringida a las islas CpG. Así mismo, Ehmeth es capaz de interaccionar con la enolasa (metaloenzima que cataliza la transformación de 2-fosfoglicerato a fosfoenolpiruvato durante la glucólisis), la cual se une al sitio activo de la Ehmeth y evita la transferencia de grupos metilos al DNA y al RNA (Tovy et al., 2010). La actividad inhibitoria de la enolasa puede ser antagonizada por 2-fosfoglicerato (Tovy et al., 2010), lo cual sugiere que el metabolismo de la glucosa está fuertemente relacionado con la actividad enzimática de Ehmeth.

Por otro lado, en células de eucariontes superiores se sabe que la metilación en las islas CpG es reconocida por proteínas denominadas *methyl-binding domain proteins (MBD)*. Estas proteínas son responsables del silenciamiento transcripcional al interferir físicamente con la unión de la maquinaria transcripcional sobre el promotor; además, están involucradas en el reclutamiento de proteínas HDACs o complejos proteicos relacionados con los estados de compactación de la cromatina (Lavi et al., 2006). No se han encontrado homólogos de MBD en la amiba, sin embargo, mediante ensayos de inmunoprecipitación de la cromatina (CHIP) y dirigiendo anticuerpos anti-CpG metilados se identificó en *E. histolytica* una proteína con afinidad a LINEs metilados, la cual fue denominada EhMLBP (Lavi et al., 2006). Esta proteína presenta una localización nuclear y perinuclear en *E. histolytica*. Los resultados sugieren que EhMLBP puede participar en la unión al DNA metilado como lo hacen las MBD en eucariontes superiores, y de esta forma contribuir a la regulación transcripcional en este parásito (Lavi et al., 2006).

Por otro lado, cuando se silenció epigenéticamente los genes de amebaporo a (*ap-a*) (Anbar et al 2005) y *cpA5* (Huguenin et al., 2010) en *E. histolytica*, se encontró que este silenciamiento correlaciona con la ausencia de la di- y tri-metilación de la lisina 4 de la histona H3 (H3K4 me2, H3K4 me3) (Huguenin et al., 2010). Sugiriendo de esta forma que la

di- y tri-metilación de H3K4 en *E. histolytica* es necesaria para la expresión de esos genes relacionados con la virulencia del parásito.

Además, se ha demostrado por ensayos de western blot e inmunofluorescencia que la histona H4 de *E. histolytica* puede estar acetilada en las lisinas (K) en posición 5, 8, 12 y 16 y que la arginina (R) en la posición 3 puede ser mono-metilada (Lozano-Amado et al., 2016). Sin embargo, en este estudio no se detectó la tri-metilación en la K20 de H4 (H4K20). Además, ellos sugirieron que el núcleo de la amiba no está compartimentalizado como en otros eucariontes, pero sí contiene dos tipos de cuerpos nucleares: el nucléolo y los “speckles” (Lozano-Amado et al., 2016)

En *E. histolytica*, el silenciamiento transcripcional de genes (*transcriptional gene silencing*, TSG) dependiente de RNA de interferencia (RNAi) está estrechamente relacionado con la marca epigenética de represión transcripcional H3K27 me2 (Foda and Singh, 2015), la cual en otros eucariontes se sabe que se encuentra presente en la heterocromatina y participa en su ensamblaje, además de ser una de las marcas epigenéticas de memoria y/o heredables junto con H4K20 me3 y H3K9 me3 (Foda and Singh, 2015). Este estudio proporciona la primera evidencia de marcas epigenéticas de represión transcripcional asociadas con un mecanismo de silenciamiento en *E. histolytica*.

Mediante un análisis *in silico* se identificó la presencia de cinco PRMTs hipotéticas en *E. histolytica*, de las cuales cuatro presentaron una relación filogenética con la familia de PRMT1 y una con la de PRMT5 (Fisk and Read, 2011). En nuestro trabajo previo de maestría (Borbolla V. J., 2012) también se identificaron las mismas cinco PRMTs putativas. Nuestros análisis *in silico* confirmaron la asociación filogenética de una de ellas a los miembros de la familia PRMT5, por lo que se le denominó EhPRMT5 (Borbolla V. J., 2012). Sin embargo, de las restantes cuatro, sólo tres mostraron relación significativa con PRMT1, las cuales se denominaron EhPRMT1a, EhPRMT1b y EhPRMT1c, mientras que la otra no presentó cercanía filogenética significativa con alguna de las enzimas analizadas, por lo que se denominó como una PRMT atípica (EhPRMT-A) (Borbolla V. J., 2012). Mediante ensayos de PCR y RT-PCR se demostró la presencia de los cinco genes y transcritos de las EhPRMTs y, utilizando ensayos de western blot con un anticuerpo heterólogo contra la PRMT1 de humano, se identificaron de dos a tres bandas de 36-38 kDa en los extractos

totales de trofozoítos de *E. histolytica*, sugiriendo la expresión de proteínas similares a PRMT1 en este microorganismo (Borbolla V. J., 2012). Además, por ensayos de inmunofluorescencia se localizó a la(s) EhPRMT1 en el citoplasma y en el núcleo de trofozoítos amibianos (Borbolla V. J., 2012).

Por otro lado, mediante un análisis *in silico* se demostró que *E. histolytica* posee cuatro genes que codifican para proteínas que contienen un dominio SET, por lo que se sugiere que corresponden a HKMTs y se denominaron de EhKMT1 a EhKMT4 (Borbolla V. J., 2012). El análisis filogenético de los dominios SET de estas proteínas reveló que EhKMT1, EhKMT2 y EhKMT3 están relacionadas filogenéticamente con SMYD3 y SUV420H2 de mamíferos, mientras que EhKMT4 está relacionada con PRDM de mamíferos (Borbolla V. J., 2012). Experimentos por PCR y RT-PCR mostraron la presencia de los cuatro genes y de los cuatro transcritos (Borbolla V. J., 2012). Estos resultados sugieren que *E. histolytica* posee enzimas del tipo HKMTs y PRMTs que podrían estar involucradas en la regulación de la expresión génica en este parásito, así como en su ciclo de vida y/o su patogenicidad. Sin embargo, hasta el momento se desconoce si estas proteínas hipotéticas poseen actividad enzimática y si existen sustratos específicos para cada una de ellas, como sucede en otros eucariontes.

JUSTIFICACIÓN

En las células eucariotas, el DNA está enrollado alrededor de un octámero de histonas que constituyen al nucleosoma, el cual es la unidad fundamental de la cromatina. Existen claras evidencias acerca de la remodelación de la cromatina, ocasionada por mecanismos epigenéticos, los que controlan varios eventos celulares como: regulación transcripcional, replicación del DNA, impronta genómica, estabilidad de la cromatina, reparación del DNA, control del ciclo celular, procesamiento del RNA, envejecimiento celular etc. Estos mecanismos epigenéticos crean en la célula una alta plasticidad que le permite expresar un fenotipo distinto para adaptarse a los cambios ambientales.

En *E. histolytica*, el mecanismo de regulación epigenética es escasamente entendido. Estudios previos han identificado y caracterizado a enzimas como HATs, HADC I, Ehmeth y EhMLBP, responsables de la modificación de la estructura de la cromatina. No obstante, hasta el momento sólo se ha demostrado la presencia *in silico* de las EhPRMTs y EhHKMTs, y se ha caracterizado parcialmente a las EhPRMT1. Sin embargo, no se han caracterizado las EhHKMTs y no se ha demostrado la actividad enzimática de ninguna EhPRMT o EhHKMT. Por lo tanto, el caracterizar estas enzimas ayudaría a entender el mecanismo de regulación epigénica en *E. histolytica*, principalmente de aquellos genes involucrados en la virulencia y diferenciación de la amiba, este conocimiento permitirá eventualmente combatir la amibiasis, enfermedad causada por este parásito.

HIPÓTESIS

E. histolytica expresa enzimas del tipo PRMT y HKMT, las cuales tienen actividad de metiltransferasa de histonas.

OBJETIVO GENERAL

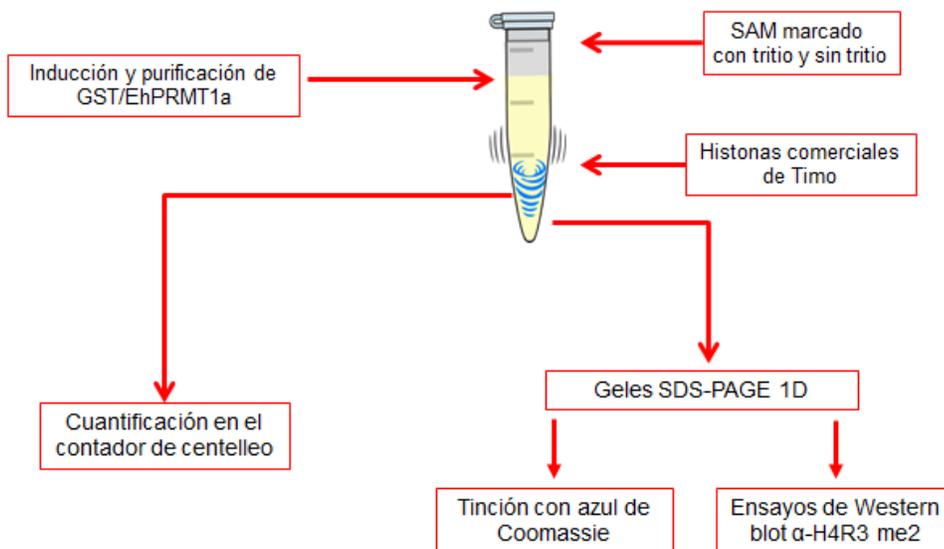
Caracterizar a la metiltransferasa de arginina 1a (EhPRMT1a) y a las metiltransferasas de lisina (EhHKMTs) de *E. histolytica*.

Objetivos particulares:

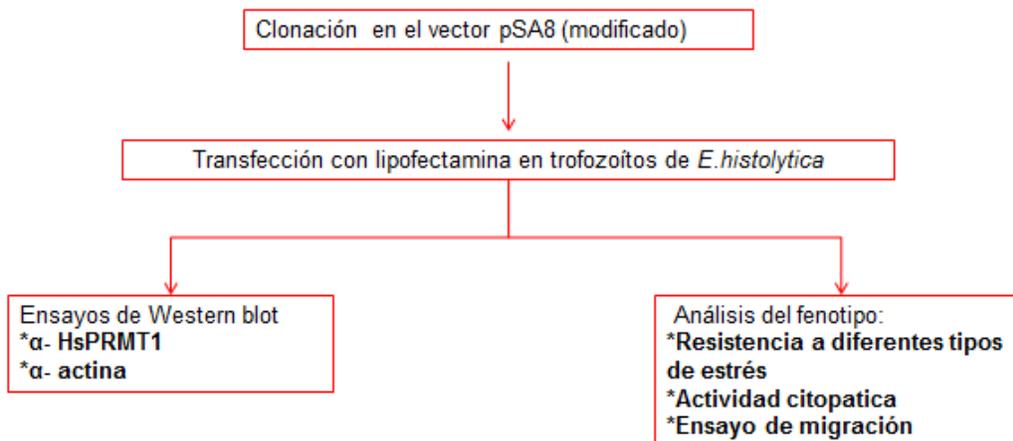
- 1- Demostrar que EhPRMT1a es una metiltransferasa de arginina
- 2- Identificar posibles blancos de metilación por EhPRMT1a
- 3- Analizar el papel de la EhPRMT1a en trofozoítos sometidos a diferentes condiciones de estrés y en la virulencia de *E. histolytica*, mediante el silenciamiento de esta proteína
- 4- Localizar a las EhHKMTs en trofozoítos amibianos
- 5- Analizar la participación de las EhHKMTs en la fagocitosis de los trofozoítos amibianos
- 6- Demostrar que las EhHKMTs son metiltransferasas de lisina
- 7- Identificar posibles blancos de metilación por las EhHKMTs en histonas

ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

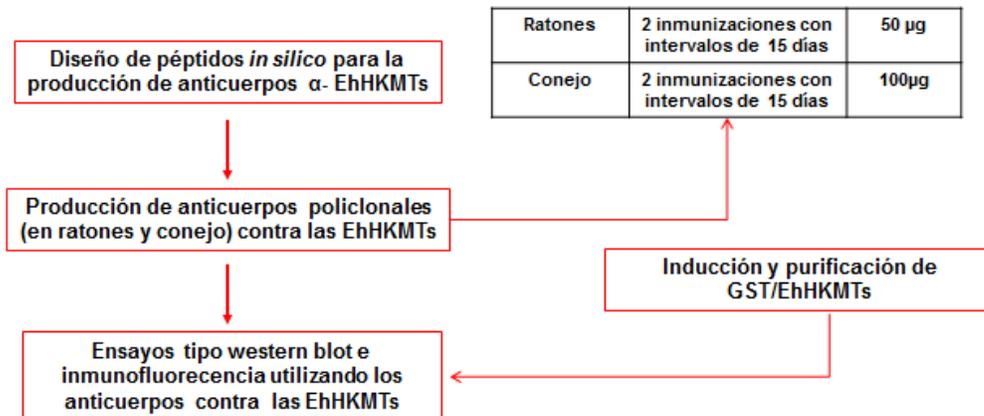
Objetivo 1 y 2



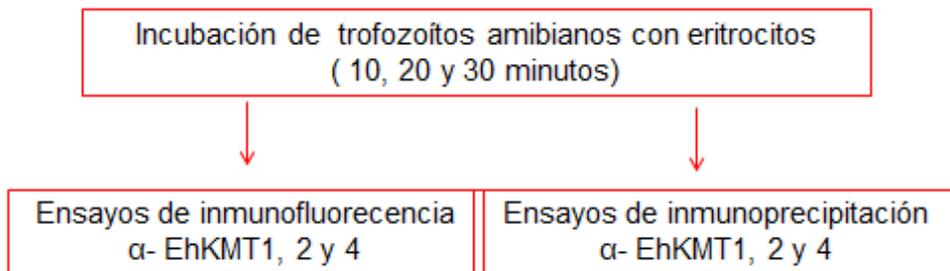
Objetivo 3



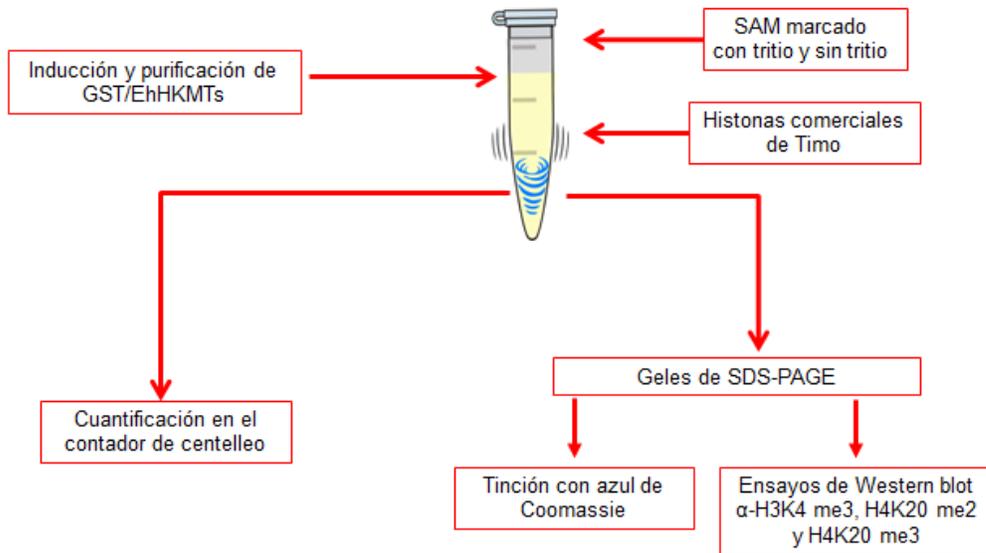
Objetivo 4



Objetivo 5



Objetivo 6 y 7



MATERIALES Y METODOS.

Cultivo de trofozoítos de *E. histolytica*

Trofozoítos de la clona A, cepa HM1: IMSS (Orozco et al., 1983) se cultivaron axénicamente a 37 °C en medio TYI-S-33 (Diamond et al., 1978) suplementado con suero bovino al 15% e inactivado por calentamiento a 56°C durante 30 minutos, 3% de mezcla de vitaminas de Diamon (KC Biologica), 40 UI de penicilina/ml (Lakeside) y 57 µg/ml de estreptomicina (Lakeside). Los trofozoítos fueron cosechados a partir de cultivos confluentes de aproximadamente 5×10^7 células y se enfriaron por 10 min a 4 °C con el fin de remover las células de la caja de cultivo. Entonces, los parásitos se colectaron en tubos y se centrifugó a 1000 x g por 5 min. El medio de cultivo se desechó y el paquete celular se resuspendió en el mismo volumen con PBS (NaCl 137 mM; KCl 2.7 mM; Na₂HPO₄ 10 mM y KH₂PO₄ 10 mM a un pH de 6.8) frío y estéril. Este paso se repitió dos veces más.

Extracción y cuantificación de DNA genómico

La obtención del DNA genómico de *E. histolytica* se realizó mediante *el kit Wizard Genomic DNA Purification* (Promega) de acuerdo al protocolo sugerido por el fabricante. El DNA obtenido se cuantificó por espectrofotometría a una longitud de onda de 260/280 nm. La integridad del DNA genómico se confirmó en geles de agarosa al 1%.

Extracción de RNA total

Los trofozoítos se cosecharon y la pastilla celular se resuspendió en 1 ml de trizol (Invitrogen) por cada 10^7 células. La mezcla se incubó por 10 min a temperatura ambiente. Posteriormente, se adicionaron 200 µl de cloroformo, se mezcló vigorosamente por 30 s y se incubó 10 min a temperatura ambiente. Después se centrifugó a 9,000 x g por 15 min a 4 °C, la fase acuosa se transfirió a otro tubo y se le adicionaron 0.5 ml de isopropanol frío para precipitar el RNA. El tubo se mezcló suavemente por inversión y enseguida se incubó por 10

min a temperatura ambiente. Posteriormente, las muestras se centrifugaron a 9,000 x g por 10 min a 4°C, la pastilla hialina conteniendo el RNA se lavó con etanol al 75% y se centrifugó a 10,000 x g durante 5 min a 4 °C. La pastilla se secó y se resuspendió en 100 o 200 µl de agua de ampolleta y se guardó a -20 °C hasta su uso. Para la cuantificación del RNA se realizó una dilución y se cuantificó por espectrofotometría a una longitud de onda de 260/280 nm. La integridad del RNA fue confirmada en geles de agarosa al 1%.

Tratamiento del RNA total con DNasa I

Para eliminar una posible contaminación del RNA con DNA genómico se llevó a cabo el siguiente tratamiento: al RNA se le añadieron 2 µl de la enzima DNasa libre de RNasa (Ambion) y una solución amortiguadora para la DNasa al 10% (inivtrogen). Posteriormente, la mezcla se incubó a 37 °C durante 45 min. A continuación, se agregó el reactivo de inactivación al 10% (inivtrogen), y el tubo se incubó por 2 min a temperatura ambiente. Después de una centrifugación a 10,000 x g por 1 min, el sobrenadante se pasó a un tubo limpio.

Electroforesis en geles de agarosa

La visualización del DNA y del RNA se realizó mediante electroforesis en geles de agarosa al 1% preparados con amortiguador TAE (40 mM tris acetato y 1mM EDTA, pH 8.0). A las muestras se les adicionó amortiguador de carga (azul de bromofenol al 0.25%, xilencianol 0.25% y glicerol 30%) y la electroforesis se llevó a cabo manteniendo un voltaje constante de 90-100 volts por 60 min. Los geles se tiñeron en una solución de bromuro de etidio 0.5 µg/ml durante 2 min, se lavaron con agua bidestilada y el DNA y/o RNA se visualizó utilizando un transiluminador de luz UV (UVP, USA)

Síntesis de DNA complementario

La reacción de retro-transcripción se llevó a cabo en una mezcla de reacción que contenía 4 µl de oligo-dT 10 µM (Sigma) y 6 µg de RNA. La mezcla se incubó a 70 °C durante 10 min y posteriormente se añadieron 8 µl de amortiguador 5X (Tris-HCL 250 mM, pH 8.3, KCl 375

mM y MgCl₂ 15 mM), 4 µl de dithiothreitol 0.1 M, 4 µl de desoxiribonucleótidos (dNTP`s) 200 µM, 2 µl de transcriptasa reversa (200 U/µl, *SuperScript II*, Invitrogen) y agua libre de nucleasas y se llevó la reacción a un volumen final de 40 µl. La mezcla se incubó a temperatura ambiente durante 10 min y posteriormente a 42 °C durante 2 h. Para inactivar a la *SuperScript II*, la reacción se incubó a 70°C por 15 min y el cDNA obtenido se guardó a -20°C hasta su uso.

Diseño de iniciadores

Para clonar el gen *Ehhkmt3* en el vector de expresión pGEX-6P-1 se diseñaron cebadores con la ayuda del sitio de internet <http://www.idtdna.com/Home/Home.aspx> y del programa Oligo Explore. Los cebadores se diseñaron con las siguientes características:

- 1) El cebador sentido contiene el codón de inicio de la traducción, la secuencia de corte reconocida por la enzima *Bam H1* y cuatro bases más, para el adecuado posicionamiento de la polimerasa (5'-**CCCC GGATCC** ATGCAATCATTTAAATTTATTAAC-3').
- 2) El cebador anti-sentido incluye el codón de paro del gen, el sitio de reconocimiento para la enzima de restricción *Xho I* y cuatro bases más para el posicionamiento de la enzima (5'-**CCCC CTCGAG** CTAATATTCATCATATTCTACAAA-3').

Para realizar el silenciamiento de la EhPRMT1a usando el vector *pSA8* (Ankri et al., 1998), se diseñaron los cebadores con las siguientes características:

- 1) El cebador sentido contiene el codón de inicio de la traducción, la secuencia de corte reconocida por la enzima *not I* y cuatro bases más, para el adecuado posicionamiento de la polimerasa (5'-**CCCC GCGGCCGC** ATGTCAATGGAACAACACTC-3').
- 2) El cebador anti-sentido incluye el codón de paro del gen, el sitio de reconocimiento para la enzima de restricción *Bgl II* y cuatro bases más para el posicionamiento de la enzima (5'-**CCCC AGATCT** ATTTAAATGATATTCTATTTT-3').

Reacción en cadena de la polimerasa

La amplificación por PCR de los genes de interés se realizó a partir de DNA genómico o de cDNA. Se utilizaron 300 ng de DNA o cDNA (dependiendo del ensayo), 300 ng de

oligonucleótido sentido y 300 ng de oligonucleótido anti-sentido (10 μ M), 300 ng de dNTP's 10 mM (dATP, dTTP, dGTP y dCTP), 300 ng de MgCl 50 mM (Invitrogen), 5 μ l de solución amortiguadora 10X (Invitrogen), 1.25 U de enzima *Taq* polimerasa recombinante (Invitrogen) y agua libre de nucleasas para un volumen final de 50 μ l. Como control negativo se utilizó la misma mezcla de reacción, pero sin DNA molde o en presencia de RNA como molde (sin la reacción de retro-transcripción). La amplificación se realizó en un termociclador, con las condiciones adecuadas para cada gen.

Preparación de bacterias competentes de *E. coli* de la cepa *DH5 α*

Una colonia de bacterias *DH5 α* o BL21(DE3) se creció en 5 ml de medio LB a 37° C, con agitación vigorosa toda la noche. Entonces, 500 μ l de ese cultivo se inocularon en 100 ml de medio LB y se incubaron a 37° C con agitación a 180 rpm, hasta que las células alcanzaron una DO de 0.4 a 0.5, a 600 nm. El cultivo se sembró en tubos y se mantuvo en hielo por 10-15 min. Posteriormente, se centrifugó a 800 x *g* por 5 min a 4°C, y la pastilla fue resuspendida en 20 ml de CaCl₂ 50 mM frío y se incubó por 20 min a 4°C. Posteriormente, la mezcla se centrifugó a 800 x *g* por 5 min a 4 °C y se resuspendió en 4 ml de CaCl₂ 50 mM frío. Las células se almacenaron a 4°C hasta por una semana, o en alícuotas con 10% de glicerol a -70°C hasta su uso.

Transformación de células competentes

Para la transformación se utilizaron 50 μ l de células competentes y se les añadió el volumen total de la reacción de ligación o 20-50 ng de la construcción deseada, entonces se incubaron en hielo por 30 min. Posteriormente, se dio un choque térmico a 42°C durante 1 min e inmediatamente se incubaron en hielo por 2-3 min. Al término de este tiempo, se añadieron 400 μ l de medio LB y las células se incubaron en agitación constante (250 rpm), durante 1 h a 37 °C. Después de esta incubación, las células recién transformadas se sembraron por espatulación en cajas de Petri con medio LB adicionado con ampicilina (100 μ g/ml) y se incubaron durante toda la noche a 37 °C.

Aislamiento de los plásmidos

El vector de expresión *pGEX-6P-1* (Fig. 11, Amersham), y el vector para silenciar pSA8 (Ankri et al., 1998) modificado (Fig. 12), cordialmente proporcionado por el Dr. Serge Ankri de la Facultad de Medicina del Technion de Haifa, Israel, se obtuvieron mediante el método de midipreparación de plásmidos (Qiagen). Para ello, una colonia de la cepa *DH5 α* de *Escherichia coli* fue transformada para cada plásmido y fueron sembradas en 5 ml de medio Luria Broth (LB) más ampicilina (50 mg/ml) y se incubó a 37°C toda la noche en agitación. Después, se realizó una dilución 1:500 en 100 ml de medio LB y se incubó a 37°C por 12-16 h en agitación constante, hasta obtener una densidad óptica (DO) de aproximadamente 0.4-0.6 a 600 nm. Posteriormente, las bacterias se cosecharon por centrifugación a 6,000 x *g* por 20 min a 4 °C, el paquete celular se resuspendió en 4 ml del amortiguador PI (Tris-HCl 50mM pH 6.8, EDTA 10mM y 100 μ g/ml de RNasa) y se añadieron 4 ml de amortiguador de lisis P2 (NaOH 200 mM y SDS 1%). La muestra fue mezclada suavemente por inversión y fue incubada a temperatura ambiente por 5 min. Después se añadieron 4 ml de amortiguador de neutralización P3 (acetato de potasio 3M pH 5.5), y se dejó reposar por 15 min a 4 °C transcurrido el tiempo se centrifugó a 3,800 x *g*, durante 30 min a 4 °C. El sobrenadante se colocó en la columna de afinidad previamente equilibrada con 4 ml de amortiguador QBT (NaCl 1.25 M, MOPS 50 mM pH 7.0, isopropanol 15% y Triton X-100 0.15%). Posteriormente, se realizaron dos lavados con 10 ml de amortiguador QC (NaCl 1M, MOPS 50 mM e isopropanol 15%) para eliminar carbohidratos, proteínas y DNA no asociado a la columna. El DNA plasmídico se eluyó con 5 ml de amortiguador QF (NaCl 1.25 M, Tris 50 mM pH 8.5 e isopropanol 15%) y se precipitó el DNA plasmídico con 3.5 ml de isopropanol. La muestra se centrifugó a 15,000 x *g* por 30 min, a 4 °C. El sobrenadante fue decantado y la pastilla se lavó en 10 ml de etanol al 70%, se centrifugó a 15,000 x *g* por 20 min a 4 °C para finalmente dejar secar la pastilla y resuspenderla en 300 μ l de agua estéril. El plásmido obtenido fue distribuido en alícuotas y se almacenó a -20°C hasta su uso.

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

PreScission™ Protease

```
Leu Glu Val Leu Phe Gln↓Gly Pro Leu Gly Ser Pro Glu Phe Pro Gly Arg Leu Glu Arg Pro His
CTG GAA GTT CTG TTC CAG GGG CCC CTG GGA TCC CCG GAA TTC CCG GGT CGA CTC GAG CCG CCG CAT
          BamH I      EcoR I      Sma I      Sal I      Xho I      Not I
```

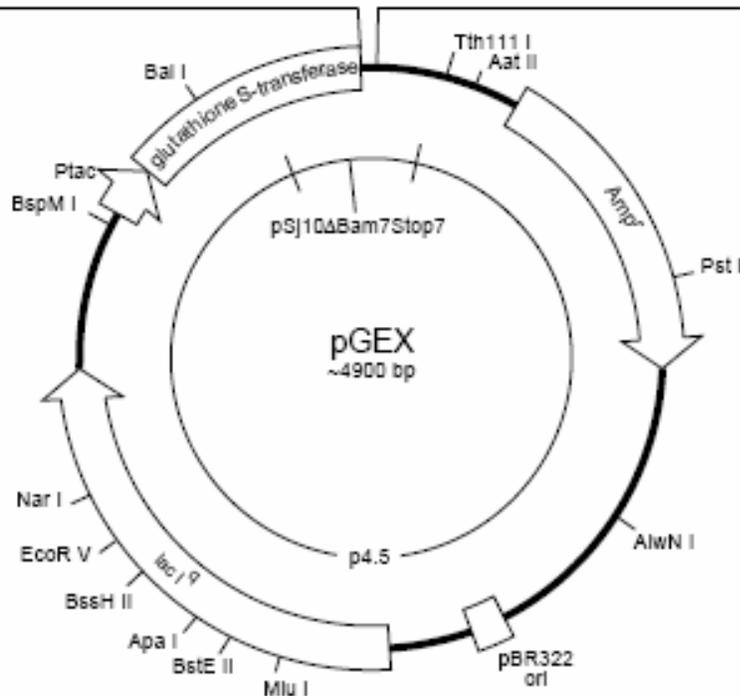


Figura 11. Vector pGEX-6P-1. Mapa del vector pGEX-6P-1 (Amersham) que se utilizó para la clonación del gen *Ehhkmt3*. Ptaq, promotor inducible por IPTG. Amp^r, gen de resistencia a ampicilina, pBR322 ori, origen de replicación del plásmido pBR322. Lac I^q, gen represor del gen *lac*.

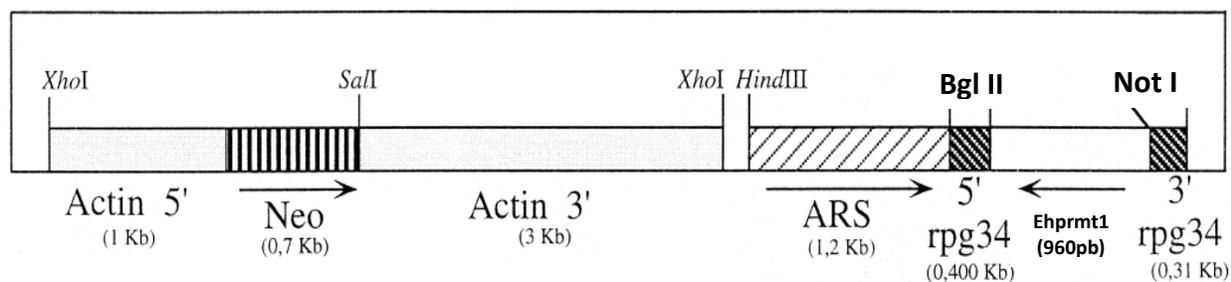


Figura 12. Vector *pSA8* (modificado). Mapa del vector *pSA8* (Ankri et al., 1998) que se utilizó para el silenciamiento de *EhPRMT1a*. Actin 5' y Actin 3', región ría arriba y río abajo, respectivamente, del gen de actina de *E. histolytica*. Neo, gen de resistencia a neomicina. ARS, sitio de replicación autónoma. rpg34 5'y rpg34 3', región ría arriba y río abajo, respectivamente, del gen de la proteína ribosomal rpL21 (copia rpg34) de *E. histolytica*.

Digestión de los fragmentos de PCR y de los plásmidos

Los fragmentos amplificados por PCR correspondientes a los genes amibianos seleccionados y los plásmidos correspondientes se sometieron a una doble digestión con las enzimas *Bam* *H* *I* y *Xho* *I* para la clonación en el vector *pGEX6-P-1* y las enzimas *Bgl* *II* y *Not* *I* para la clonación en el vector *pSA8*. La doble digestión se realizó en un volumen de 50 μ l, utilizando 10 μ l de DNA plasmídico (0.5 mg), 1 μ l (10 unidades) de *Bam* *H* *I* y *Xho* *I* (Invitrogen), *Bgl* *II* y *Not* *I* (NEB), 5 μ l de amortiguador número 2 ó 3 (NEB), según correspondiera, 1 μ l de BSA 100X (NEB) y 33 μ l de agua estéril. La mezcla se incubó por 6 h a 37°C y los productos digeridos se analizaron por electroforesis en geles de agarosa al 1 %.

Purificación del DNA a partir de geles de agarosa

Las bandas correspondientes a los fragmentos de DNA ya digeridos se purificaron por el método de *Qiaquick Gel Extraction Kit* (Qiagen). Los fragmentos de DNA fueron cortados del gel de agarosa y se pesaron dentro de un tubo eppendorf de 1.5 ml. Posteriormente se añadieron tres volúmenes de amortiguador QG por cada volumen de gel y las muestras fueron incubadas a 50°C por 10 min para disolver la agarosa. Después, se añadió un volumen de isopropanol igual al volumen del gel, se mezcló y se transfirió dentro de una columna *Qiaquick spin column* (Qiagen), para centrifugar durante 60 s a 18,000 x *g*. La columna se lavó con 0.5 ml de amortiguador QG, se centrifugó y se añadieron 0.75 ml de amortiguador PE para lavar la columna, este paso se repitió dos veces para remover los residuos de etanol y amortiguador PE. El DNA fue eluido con 50 μ l de agua estéril y centrifugado a 18,000 x *g*. Finalmente, el DNA se cuantificó por espectrofotometría y se almacenó a -20°C hasta su uso.

Ligación

Los fragmentos de DNA digeridos y purificados, tanto del inserto de interés como de cada plásmido, se ligaron en una proporción de 1:3 ó 1:5 (vector: inserto). Las mezclas de ligación se realizaron en un volumen final de 10-15 µl, conteniendo 50 ng de los plásmidos previamente digeridos con las enzimas de restricción correspondientes, la cantidad necesaria del inserto para tener la relación molar deseada, 1 µl (100 unidades) de T4 DNA ligasa (Invitrogen), 2 µl de amortiguador T4 DNA Ligasa 5X (Invitrogen) y agua libre de nucleasas para completar el volumen de reacción. La reacción se incubó de 16-18 horas a 16°C. En este ensayo se utilizó como control negativo la misma reacción pero sin el inserto.

Inducción de las proteínas recombinantes

Una vez clonados los genes de interés en el vector de expresión *pGEX-6P-1* (Fig. 11), se procedió a expresión de las proteínas recombinantes. Esta expresión está bajo el control del promotor *tac*, que es inducido por el isopropil-β-tio-galactosido (IPTG). El gen *lac^l* codifica para una proteína represora que se une al promotor *tac* y que solo el inductor IPTG puede eliminar, manteniendo así un control en la expresión del inserto.

Para la expresión de las proteínas recombinantes se utilizó la cepa *BL21 (DE3)* de *E. coli*. La inducción de las proteínas recombinantes se realizó siguiendo las instrucciones del fabricante para el vector *pGEX-6P-1* (Amersham Biosciences). Para todos los casos se sembró una colonia en 10 ml de medio LB con ampicilina (100 µg/ml de medio) y fueron crecidas en una incubadora con agitación orbital (*Lab-Line^R Incubator-Shaker*) a 37°C y 180 rpm. El cultivo se dejó crecer hasta una DO de 0.4 -0.8 a 600 nm y la inducción se realizó con la adición de 1-5 mM de IPTG, durante 5 horas a 30 °C.

Análisis de la solubilidad de las proteínas recombinantes

Para el análisis de la solubilidad, se utilizaron 100 ml de bacterias *BL21 (DE3)* que expresaran las proteínas recombinantes con la etiqueta GST. Las bacterias crecidas se centrifugaron a 10,000 x *g* por 5 min, se le adicionó lisozima a una concentración final de 1 mg/ml y se incubó por una hora a 4°C. Posteriormente, la pastilla se resuspendió en 2.5 ml de amortiguador de lisis (Tris-HCl 20 mM pH 8.0, EDTA 2 mM, NaCl 100 mM y 1 mM PMSF), la mezcla fue

sonicada (sonicador ultrasónico de punta *Vibra-Cell Sonics^R*), por 5 veces, con intervalos de 10 s a una amplitud de 60 watts. El lisado celular se centrifugó a 12,000 x g por 20 min a 4 °C, para separar la fracción soluble y la insoluble. Se tomó una alícuota de 100 µl de cada una de las fracciones (soluble e insoluble), y se adicionaron 20 µl de amortiguador de muestra 5X (tris pH 6.8, SDS10%, glicerol 87% y azul de bromofenol 2%) y 5% de β-mercaptoetanol y fueron analizadas por electrofóresis en geles desnaturizantes de poliacrilamida (SDS-PAGE). Los geles se tiñeron con azul de Coomassie G450.

Purificación de las proteínas recombinantes

El plásmido *pGEX-6P-1* posee una secuencia que codifica para la enzima Glutation-S-transferasa (GST) (Fig. 11), lo cual permite la purificación de la proteína de interés fácilmente mediante cromatografía de afinidad en una matriz de glutatión-sepharosa.

A partir de 20 ml de bacterias *BL21 (DE3)* transformadas con las construcciones de interés, se tomó un inóculo de 10 ml y se añadieron a 200 ml de medio LB más ampicilina (100 mg/ml). Las bacterias se incubaron en agitación (180 rpm), a 37°C hasta que se alcanzó una DO de 0.5-0.8 a 600 nm. A continuación, se adiciono IPTG a una concentración final de 1-5 mM y se incubo 5 h a 30 °C en agitación. Posteriormente, se centrifugó a 1,000 x g por 15 min a 4 °C, se desechó el sobrenadante y a la pastilla se le adicionó lisozima (10 mg/ml), dejándola incubar 1 h en hielo. Trascurrido el tiempo se adicionó DTT (100 mM) y se homogenizó suavemente por inversión para dejar incubar 10 min en hielo. Después, se adicionó sarcosil al 2 %, se homogenizó la mezcla, se sonicó 5 veces con intervalos de 10 s, a una amplitud de 60 watts. El lisado celular se centrifugó a 7,000 x g, por 15 min a 4 °C, se transfirió el sobrenadante a un tubo Falcon nuevo, se le adicionó Triton X-100 al 2 % y las perlas de Glutation-Sepharosa 4B, previamente lavadas con el amortiguador PBS 1X. La mezcla se incubó toda la noche a 4 °C y posteriormente se centrifugó a 8 000 x g por 2 min a 4°C, y se eliminó el sobrenadante. Las perlas se lavaron 10 veces con el amortiguador PBS 1X. En cada lavado se centrifugó a 8 000 x g por 2 min a 4°C. Después, las perlas se transfirieron a un nuevo tubo y se les adicionó un volumen de amortiguador de elución (20mM glutatión, NaCl 10mM, TrisHCl 1 M), se incubaron las perlas en agitación suave 16-18 h a 4 °C. Trascurrido el tiempo de incubación se centrifugó a 8 000 x g por 2 min a 4°C y fue separada la fracción soluble de la fracción insoluble (perlas). A cada muestra se le añadió amortiguador de muestra 2X (glicerol 40%, 250mM de Tris-HCl, pH 6.8, % de SDS, 0.4% de azul de bromofenol y 5% de β-mercaptor etanol), y se calentaron

las muestras a 94 °C por 5 minutos, en seguida se pusieron en hielo por 2 min y se centrifugaron a 10 000 x *g* por 2 min. Las sobrenadantes que contienen las proteínas purificadas fueron analizados en SDS-PAGE al 12% teñidos con azul de Coomassie G450 y por ensayos de western blot utilizando anticuerpos contra la etiqueta de GST. Para eliminar la etiqueta de GST se utilizó la enzima prescission protease (invitrogen).

Diseño de péptidos sintéticos

Para obtener anticuerpos contra las proteínas recombinantes EhHKMT1, 2, 3 y 4, se diseñaron péptidos sintéticos utilizando dos programas distintos con parámetros muy estrictos **ABC pred** (<http://www.imtech.res.in/raghava/abcpred/>) y **protein hydrophobicity plots** (<http://arbl.cvmbs.colostate.edu/molkit/hydrophathy/>) que nos permitieron seleccionar los mejores péptidos. Además, los péptidos seleccionados fueron comparados mediante BLASTP con la base de datos de *E. histolytica* (<http://amoebadb.org/amoeba>), con el objetivo de confirmar su especificidad del péptido, además los péptidos fueron acoplados a KLH (GL Biochem).

Obtención de anticuerpos

Para la obtención de anticuerpos contra las EhHKMTs se utilizaron dos especies de animales: ratones de la cepa Balb/c de 4 a 5 semanas y conejos de la cepa New Zeland de aproximadamente dos meses. Para los ratones se realizaron dos inmunizaciones de 50 µg de péptido utilizando el adyuvante Titer Max (Sigma) volumen a volumen con el péptido, con retos espaciados de 15 días; en el caso de los conejos también se hicieron dos retos espaciados de 15 días usando el péptido sintético a una concentración de 100 µg y como adyuvante Titer Max. En cada reto se extrajo una muestra de sangre de los animales para determinar por medio de ensayos tipo Western blot el título de anticuerpos obtenido, así como la especificidad de cada uno de los anticuerpos.

Extracción de proteínas totales de *E. histolytica*

Los trofozoítos se cosecharon y se resuspendieron en PBS frío y estéril, se les añadió 15 μ l de una mezcla de inhibidores de proteasas (2 mM benzamidina, 5 μ g/ml aprotinina, 5 μ g/ml pepstatina A, 5 μ g/ml leupeptina y 10 μ g/ml E-64), la mezcla se congeló en nitrógeno líquido por 3 min y se agitó vigorosamente por 2 min en el vórtex, para lisar a las células. Este proceso se repitió dos veces más, hasta que la muestra se lisó completamente. La cuantificación de proteínas se realizó por el método colorimétrico de Bradford (Bradford, 1976) y las proteínas se analizaron mediante PAGE-SDS.

Fraccionamiento núcleo y citoplasma

Los trofozoítos se cosecharon y se resuspendieron en amortiguador de extracción (10 mM HEPES pH 7.2, 24 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 1 mM PMSF, 2 mM DTT y 0.03% NP-40 (Sigma)) y se les añadió 15 μ l de una mezcla de inhibidores de proteasas (2 mM benzamidina, 5 μ g/ml aprotinina, 5 μ g/ml pepstatina A, 5 μ g/ml leupeptina y 10 μ g/ml E-64), posteriormente se colocaron en agitación suave y constante durante 20 min y, se revisó por microscopía óptica la correcta ruptura de los trofozoítos y la presencia de núcleos intactos. Entonces, se les añadió a las muestras sacarosa al 0.8 M y se centrifugaron a 6 000 x g por 10 min a 4 °C. El sobrenadante correspondió a la fracción citoplasma y para obtener la fracción nuclear se repitió la centrifugación en presencia del colchón de sacarosa al 0.8 M. Para obtener el enriquecimiento de las histonas se procedió a incubar la fracción nuclear obtenida con 400 μ l de ácido sulfúrico al 0.2 N durante 1 h a 4 °C, posteriormente se centrifugó a 13 000 x g por 10 min a 4 °C, las muestras se precipitaron toda la noche con 25 % de TCA Y 2 % de acetona, después las muestras se centrifugaron a 13 000 x g por 10 min a 4 °C, la pastilla se resuspendió en 200 μ l de agua destilada. La cuantificación de proteínas se realizó por el método colorimétrico de Bradford (Bradford, 1976) y las proteínas se analizaron mediante PAGE-SDS.

Electroforesis de proteínas

La separación de proteínas se llevó a cabo en SDS-PAGE al 10, 12 o 15%. El gel separador se preparó con acrilamida 10%, Bis-acrilamida 0.9%, TrisHCl 1.5 M pH 8.8, SDS al 0.1 %,

persulfato de amonio al 0.1 % y 0.15% de TEMED. El gel concentrador se preparó con acrilamida 29%, Bis-acrilamida 0.9%, TrisHCl 1.5 M pH 6.8, SDS al 0.1 %, persulfato de amonio al 0.1 % y 0.15% de TEMED. Como amortiguador de corrida se utilizó una solución con Tris 0.25M, glicina 1.9 M y 0.1% de SDS. La electroforesis se llevó a cabo manteniendo un voltaje constante de 100 volts, por aproximadamente 1:30 h. Los geles fueron teñidos con azul de Coomassie G-450 al 0.025%, metanol 40% y ácido acético 70%, durante 10 min. Posteriormente, se destiñó con una solución de metanol al 5% y ácido acético al 7%, hasta que se visualizaron las bandas de proteínas.

Western blot

Las proteínas separadas por electroforesis en geles, se transfirieron a membranas de nitrocelulosa (Bio-Rad) en una unidad de electrotransferencia (Bio-Rad). Las unidades se montaron a manera de emparedado en el siguiente orden: ánodo, esponja, papel filtro Whatman, gel, membrana de nitrocelulosa, papel filtro Whatman, esponja y cátodo. A la cámara se le añadió la solución de transferencia fría (Tris 0.25M, glicina 1.9 M, metanol 20%) y se colocó en un baño de hielo para transferir las proteínas a 400 mA por 1.5 h. Después, la cámara de electrotransferencia fue desmontada y la membrana de nitrocelulosa se tiñó con rojo de Ponceau (rojo de Ponceau 0.1% y ácido acético 1%) para verificar la integridad de los extractos proteicos. A continuación, la membrana se incubó con solución bloqueadora (leche al 3% en PBS-Tween 0.5%) y para la inmuno-detección de la EhPRMT1a se utilizó el anticuerpo comercial heterólogo, hecho en conejo, que reconoce a la proteína PRMT1 de humano (Abcam) a una dilución de 1:300 en BSA 3%/PBS-Tween 0.05 %. En el caso de la inmunodetección de las EhHKMTs recombinantes se utilizó el anticuerpo policlonal, hecho en cabra, anti-GST a una dilución de 1:5000, por otro lado, los anticuerpos realizados en contra de los péptidos de las EhHKMTs se utilizaron a una dilución de 1:500. Las membranas se incubaron toda la noche en agitación a 4 °C. Posteriormente se realizaron 4 lavados de 10 min, con PBS-Tween 0.5 %. La membrana se incubó con el anticuerpo secundario correspondiente, acoplado a peroxidasa, α -GST 1:4000 y α - conejo 1:10000 diluidos en leche al 3% en PBS-Tween 0.5 %, durante 1 h a temperatura ambiente. Al término de la incubación se realizaron los mismos lavados con PBS-Tween 0.5 %, como se describió anteriormente. La unión antígeno-anticuerpo se reveló con el método quimioluminiscente (ECL, Amersham) con el protocolo recomendado por el fabricante,

o bien utilizando 4-cloro-1 naftol (proporción de 5 ml de 4-cloro-1-naftol (3 mg/ml):1 μ l de peróxido de hidrógeno).

Ensayos de inmunofluorescencia indirecta y microscopía confocal

Los trofozoítos se desprendieron de la caja de cultivo al ser incubados en hielo y posteriormente se colocaron en cajas de seis pozos (2 ml/pozo), a las cuales previamente se les añadieron cubreobjetos estériles y se incubaron 1 h a 37 °C, para permitir la adherencia de las amibas al vidrio. Después, las células se fijaron con metanol al 100% por 5 min, se lavaron dos veces con PBS 1X y los sitios de unión inespecíficos fueron bloqueados con suero fetal bovino al 1% en PBS 1X, durante 1 h a 37 °C. A continuación, se agregó el anticuerpo primario: para las EhHKMTs la dilución fue de 1:200, para las marcas epigenéticas (α -H4R3 me2, α -H3K4 me3, α -H4K20 me2 y α -H4K20 me3) (abcam y Cell signal) de 1:25, para la α -H4 1:100, α -EhCPADH (Arroyo and Orozco, 1987; Orozco et al., 1987) 1:100, α -Lamina B1 (Santa Cruz)1:200, en cada caso fueron incubados los anticuerpos a 4 °C por toda la noche. Después de dos lavados con PBS 1X, la muestra se incubó con el anticuerpo secundario conjugado a FITC (Zymed) o Rodamina (Invitrogen) a una dilución de 1:200 durante 1.5 h a temperatura ambiente, así mismo fueron incubadas con 4',6'-diamino-2'-fenilindol (DAPI) por 15 min temperatura ambiente, posteriormente las muestras se montaron con 10 μ l de VECTASHIELD (VECTOR laboratorios, Inc. H-1000) en portaobjetos y se examinaron por microscopía confocal en un microscopio Carl Zeiss LSM 700. Aproximadamente 20 secciones ópticas de grosor variable fueron documentadas para los diversos experimentos y analizadas con el software ZEN 2009 (Carl Zeiss). Para la coinmunolocalización se utilizaron los anticuerpos α -H4R3 me2 y α -PRMT1, los cuales fueron marcados covalentemente con los fluoróforos Pacific blue 410 y Alexa fluor 647 (Thermo fisher) respectivamente, empleado el kit Labeling (Life Technologies) bajo las condiciones descritas por el fabricante.

Inmunolocalización de las EhHKMTs durante la eritrofagocitosis

Se obtuvo una muestra de sangre humana por punción venosa utilizando como anticoagulante la solución de Alsever (0.272 g de ácido cítrico, 4 g de citrato de sodio, 2.1 de

cloruro de sodio y dextrosa a 0.1 M, pH 6.1). La muestra se centrifugó a 5 000 x g por 10 min, los sobrenadantes que contiene las células blancas fueron eliminados, la pastilla con los eritrocitos se lavó dos veces con la misma solución y los eritrocitos se cuantificaron en una cámara de Neubauer.

Para la eritrofagocitosis, los trofozoítos, unidos a laminillas de vidrio estériles, se incubaron en medio TYI (sin suero) con eritrocitos en una relación 1:100 a 37 °C durante diferentes tiempos (0,10, 20 y 30 min). Posteriormente, las muestras se fijaron y permeabilizaron durante 5 min con metanol al 100% (frio) y se procedió a realizar los ensayos de inmunofluorescencia y microscopía confocal como se describió anteriormente.

Ensayo de inmunoprecipitación

El ensayo de inmunoprecipitación fue realizado como se describió anteriormente (Avalos-Padilla et al., 2015). Los trofozoítos amibianos se incubaron con eritrocitos (obtenidos como se mencionó anteriormente) durante 20 minutos a 37°C, transcurrido el tiempo las células se lisaron con una solución que contenía Tris-HCl 10 mM, NaCl 50 mM y 100 mM de inhibidores de proteasas (PHMB, iodoacetamida, N-ethylmaleimida y TLCK). Paralelamente perlas de agarosa con la proteína recombinante G acoplada (invitrogen) se incubaron con 100 µg de anticuerpo α -EhADH, α -EhHKMTs o con suero preinmune) por 2 h a 4°C en agitación suave. Posteriormente, las perlas se incubaron con PBS 1X y BSA 0.5% por 30 min a temperatura ambiente. Transcurrido el tiempo se realizaron tres lavados como PBS 1X y las perlas se incubaron con el sobrenadante de los trofozoítos lisados, esta interacción se dejó toda la noche a 4 °C en agitación suave. Posteriormente, las muestras se centrifugaron a 6 000 x g por 15 min y las perlas se lavaron dos veces con PBS, en presencia de 20 µl de una mezcla inhibidores de proteasas. Entonces, se agregaron 40 µl de amortiguador de muestra 2X (glicerol 40%, 250mM de Tris-HCl, pH 6.8, % de SDS, 0.4% de azul de bromofenol y 5% de β -mercaptoetanol) y se calentaron las muestras 94 °C por 5 min. Finalmente, las muestras fueron centrifugadas a 6 000 x g por 3 min, los sobrenadantes fueron separados por SDS-PAGE y analizados por ensayos tipo western blot utilizando los anticuerpos primarios α -EhADH (dilución 1:500) y α -EhHKMTs (dilución 1:100).

Ensayo de inmunoelectromicroscopía

El ensayo de inmunoelectromicroscopía fue realizado como se describió anteriormente (Segovia-Gamboa et al., 2011). Los trofozoítos amibianos se fijaron con 4% de paraformaldehído y 0.1% de glutaraldehído en medio DMEM (Gibco) libre de suero durante 1 h a temperatura ambiente, las muestras fueron incrustadas en resina LR White (London Resin Co) y polimerizadas bajo luz ultravioleta a 4 °C durante toda la noche. Posteriormente, se obtuvieron cortes de 60 nm que se montaron en rejillas de níquel, después las muestras fueron incubadas con los anticuerpos α -EhHKMTs a una dilución de 1:20 por toda la noche, transcurrido el tiempo las muestras se lavaron e incubaron con anticuerpos α -IgGs de conejo acoplado a partículas de oro de 15 nm (Tec Pella Inc) a una dilución de 1:60. Finalmente, las muestras se analizaron en un microscopio electrónico de transmisión Morgani 268 D Philips (FEI Company)

Ensayo de entrecruzamiento con glutaraldehído

Para determinar si la proteína EhPRMT1a forma oligómeros, la proteína recombinante EhPRMT1a, sin la etiqueta de GST, se incubó por 20 min a 25 °C con glutaraldehído a una concentración 0.025% en PBS 1X (pH 7.4) en un volumen final de 30 μ l. Para detener la reacción se utilizó el amortiguador de muestra 5X (glicerol 40%, 250mM de Tris-HCl, pH 6.8, % de SDS, 0.4% de azul de bromofenol y 5% de β -mercaptoetanol) y las muestras se analizaron en geles SDS-PAGE al 12% teñidos con nitrato de plata (Chevallet et al., 2006).

Ensayo de actividad enzimática

Para demostrar la actividad enzimática de EhPRMT1a y de las EhHKMTs recombinantes se utilizó el protocolo de “methyltransferase assay” (MERCK), en donde se analiza la transferencia del grupo metilo de SAM a las proteínas blanco. En este trabajo se utilizaron como sustrato las histonas comerciales (de pollo o de timo de ternera, Roche) o el extracto nuclear de *E. histolytica* enriquecido en histonas. Como control negativo se analizó la

reacción en presencia de lisozima, una enzima no relacionada. El resultado de la reacción *in vitro* se examinó de dos formas: i) utilizando SAM marcado radioactivamente con ^3H (tritio) y analizando las muestras en un contador de centelleo (Beckman LS 6500); o ii) mediante ensayos de tipo western blot utilizando SAM no radiactivo y anticuerpos comerciales contra las marcas epigenéticas H4R3 me2, H3K4 me3, H4K20 me2 y H4K20 me3. Los anticuerpos empleados contra las marcas epigenéticas fueron comerciales (Abcam) y la dilución utilizada para todos los casos fue de 1:500.

Silenciamiento de EhPRMT1a generando por ds-RNA

El silenciamiento de EhPRMT1a se realizó utilizando al *pSA8* modificado (Fig. 12), donde se clonó el gen *Ehprmt1a* en antisentido dando lugar a la construcción *pSA8/AsEhPRMT1a*. Este plásmido genera un RNA complementario al RNAm de EhPRMT1a, dando como resultado un RNA de doble cadena (*double strand RNA, ds-RNA*), que es inestable en la célula, donde los complejos proteicos de DICER y RISC son reclutados en este orden para eliminar el ds-RNA (Fig. 13).

Transfección del *pSA8/AsEhprmt1a* en trofozoítos amibianos

Para la transfección se utilizaron 4×10^5 trofozoítos de *E. histolytica*. Primero se realizó una mezcla que contenía 20 μl de lipofectamina Superfect (Qiagen), 10 μg de plásmido y 100 μl de medio M199 (Sigma). Como control negativo se utilizó el mismo vector sin inserto. Esta mezcla se dejó 10-20 min a temperatura ambiente. Transcurrido el tiempo se añadieron las amibas en 2 ml de medio M199 suplementado con 15% de suero bovino de adulto. Entonces, las mezclas se colocaron en una incubadora de CO_2 durante 4 h a 37°C . Pasado el tiempo, las amibas fueron transferidas a un tubo con medio TYI-S-33 y después de 48 h de incubación a 37°C se les agregó 3 μg de G418. La dosis de la droga se aumentó progresivamente cada dos días hasta que alcanzó la cantidad de 40 μg .

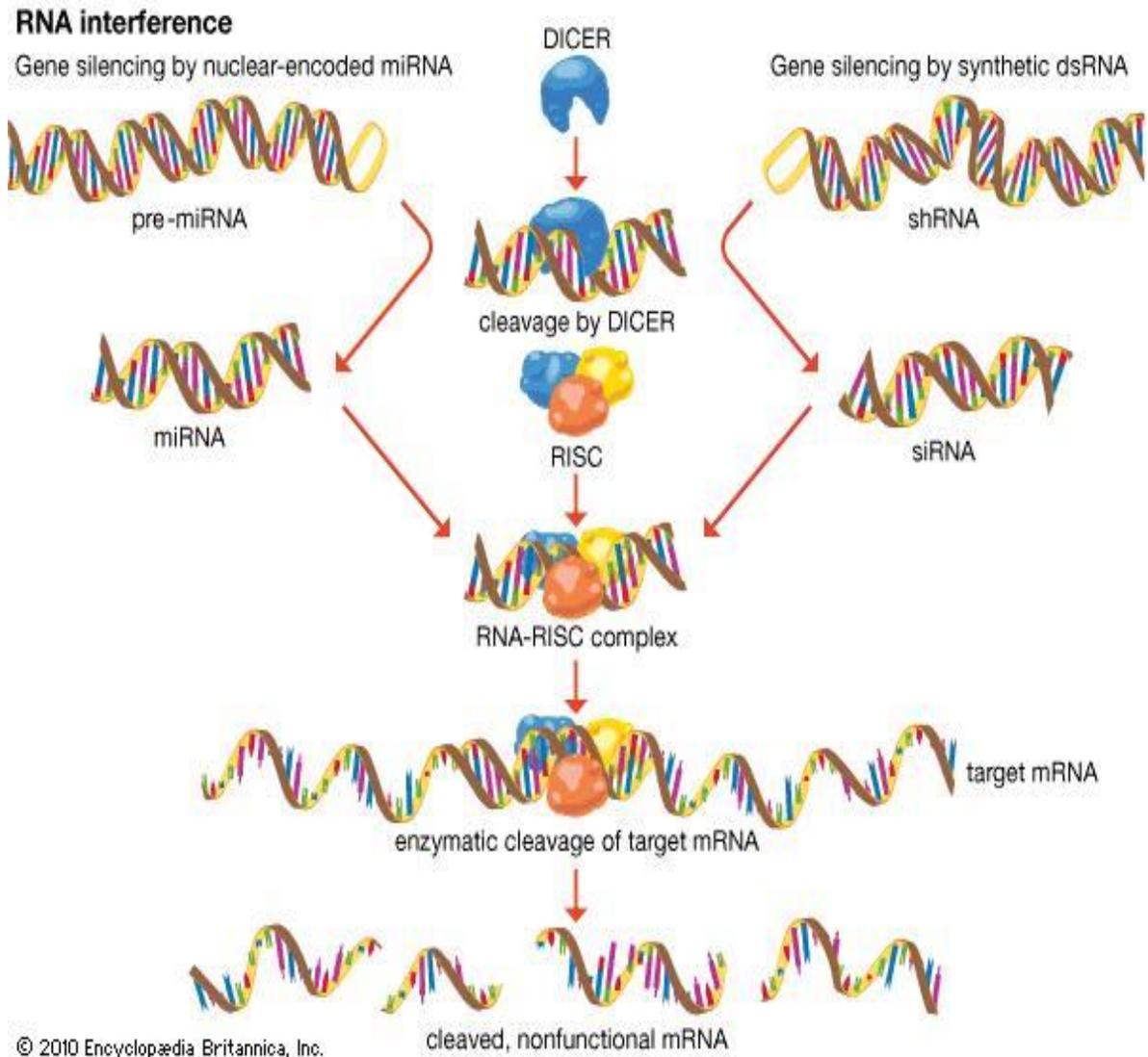


Figura 13. Maquinaria que es reclutada para la degradación de miRNA y ds-RNA. Se muestra como se reclutan los complejos proteicos de DICER y RISC para la degradación de los *micro RNA miRNA* y *RNA de doble cadena (ds-RNA)*.

Ensayo citopático

Células epiteliales de la línea HeLa (derivadas de cáncer cervico uterino) fueron cultivadas en medio DMEM (Gibco), a 37° C en una atmósfera de 5% de CO₂. Cuando las monocapas alcanzaron el 90% de confluencia celular, se lavaron con PBS 1X y se adicionaron 200,000 amibas/cm² de células epiteliales a cada pozo en medio TYI sin suero. La interacción celular se mantuvo a 37°C por 30 min, hasta que se observó aproximadamente un 80% de destrucción de la monocapa. Para detener la acción citopática de las amibas, las muestras se incubaron en hielo durante 10 min y se lavaron tres veces con PBS 1X. Entonces, las células epiteliales se fijaron con glutaraldehído al 2.5% en PBS 1X durante 15 min, a temperatura ambiente y se lavaron tres veces con PBS 1X. A continuación, las células remanentes se tiñeron con azul de bromofenol al 1%, en amortiguador de boratos 0.1 M (pH 8.7) por 10 min. Se realizaron tres lavados con amortiguador de boratos 0.01 M y el colorante fue extraído con 1 ml de HCl 1 N durante 30 min a 37°C. La suspensión se cuantificó por espectrofotometría a una longitud de onda de 660 nm. Estos experimentos se realizaron por triplicado en tres ensayos independientes.

Ensayo de migración celular

Para el ensayo de migración celular se utilizaron 2.5×10^5 trofozoítos amibianos los cuales fueron colocados en placas de 24 pozos con transwells (Millipore) en 0.5 ml de medio TYI sin suero y se incubaron por 3 h a 37 °C. Posteriormente, las placas se colocaron en hielo durante 10 min y se contaron en microscopio óptico las amibas que migraron a la cámara inferior mediante microscopía óptica.

Ensayos de estrés

Para los ensayos de estrés se utilizaron 1×10^6 trofozoítos amibianos que se resuspendieron en 1 ml de PBS 1X y se incubaron por diferentes tiempos (0, 15, 30, 45 y 60 min) a 37 °C en presencia de 2.5 mM H₂O₂ (estrés oxidativo) o de 350 μM S-nitroso glutatión (GSNO) (estrés nítrico), o bien a 44 °C (choque térmico). Posteriormente, las amibas se tiñeron con 2% eosina en PBS 1X y se cuantificaron las amibas vivas en una cámara de Neubauer. Los

resultados fueron analizados con el estadístico ANOVA usando el programa GraphPad 6 con un valor de $p < 0.005$ o $p < 0.001$.

RESULTADOS

***E. histolytica* tiene una marca epigenética equivalente a H4R3 me2.**

Como se demostró anteriormente (Borbolla V. J., 2012) el alineamiento de las histonas H4 de humano (HsH4) y de *E. histolytica* (EhH4) mostro que el N-terminal de EhH4 es divergente; sin embargo, se sugiere que puede ser susceptible a metilación debido que posee varios sitios conservados para esta modificación postraducciona (Fig. 14A). Además, ese alineamiento nos indica que en la posición 8 de EhH4 se encuentra una arginina que se sugiere es equivalente a la H4R3 en humano (Fig. 14A). La modificación H4R3 me2 ha sido ampliamente estudiada por su presencia en los promotores de los genes transcripcionalmente activos en otros sistemas (Strahl et al., 2001).

Para demostrar la equivalencia entre EhH4R8 y HsH4R3 se realizaron ensayos tipo western blot en las fracciones nucleares enriquecidas con histonas y de citoplasma de trofozoítos, utilizando el anticuerpo comercial que reconoce la dimetilación de la arginina 3 de la histona H4 (α -H4R3 me2). En estos ensayos el anticuerpo reconoció una banda de 14 kDa en la fracción nuclear de células HeLa (utilizada como control positivo), la cual corresponde a la histona H4 (Fig. 14B). Este anticuerpo también reconoció solamente en la fracción nuclear de trofozoítos amibianos una banda de 18 kDa que se sugiere corresponde a la marca epigenética EhH4R8 me2. Para demostrar el correcto fraccionamiento de núcleo y citoplasma se utilizaron como controles los anticuerpos α -EhCPADH (Arroyo and Orozco, 1987; Orozco et al., 1987) que reconoció una banda de 124 kDa sólo en citoplasma, y α -HsH4, que reconoció una banda de 14 kDa sólo en la fracción nuclear (Fig. 14B).

Para confirmar la presencia de la marca epigenética en los núcleos de trofozoítos amibianos se realizaron ensayos de inmunofluorescencia (Fig. 15). En estos experimentos, los núcleos fueron teñidos con DAPI (azul) y la marca epigenética se observa en verde; nuevamente,

como control positivo se usaron a las células HeLa. Los resultados de estos ensayos muestran la co-localización de las marcas azul y verde (Fig. 15). Los cortes en los ejes zy confirmaron la localización de la marca epigenética en el núcleo (Fig. 15). Estos resultados sugieren que la posición H4R8 en *E. histolytica* es equivalente a la H4R3 en humano y que probablemente esta modificación está involucrada en la regulación epigenética del parásito.

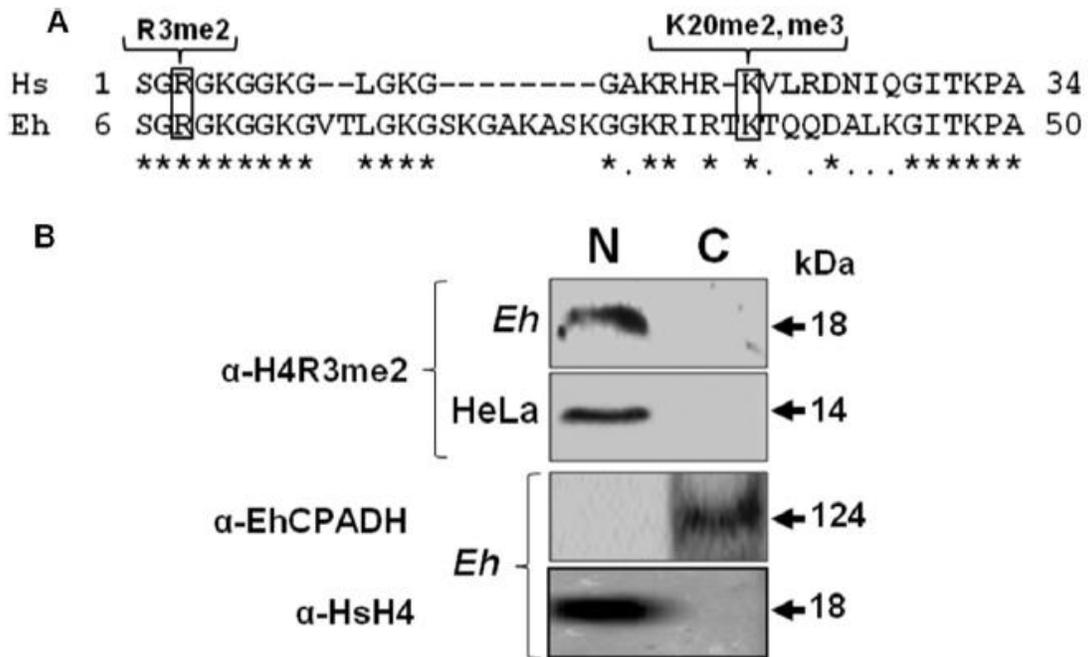


Figura 14. Identificación de la marca epigenética equivalente a H4R3 me2 en *E. histolytica*. A) Alineamiento del N- terminal de la H4 de Homo sapiens (Hs) y de *E. histolytica* (E.h). (*) Aminoácidos idénticos. (.) Aminoácidos similares. El rectángulo indica los sitios susceptibles de metilación. B) Ensayo de western blot en donde se usó el anticuerpo comercial α- HsH4R3 me2. (N) Fracción nuclear enriquecida en histonas. (C) Fracción citoplasmática. Como controles de fraccionamiento se utilizaron los anticuerpos α- EhCPADH y α- HsH4 para la fracción de citoplasma y de núcleo, respectivamente.

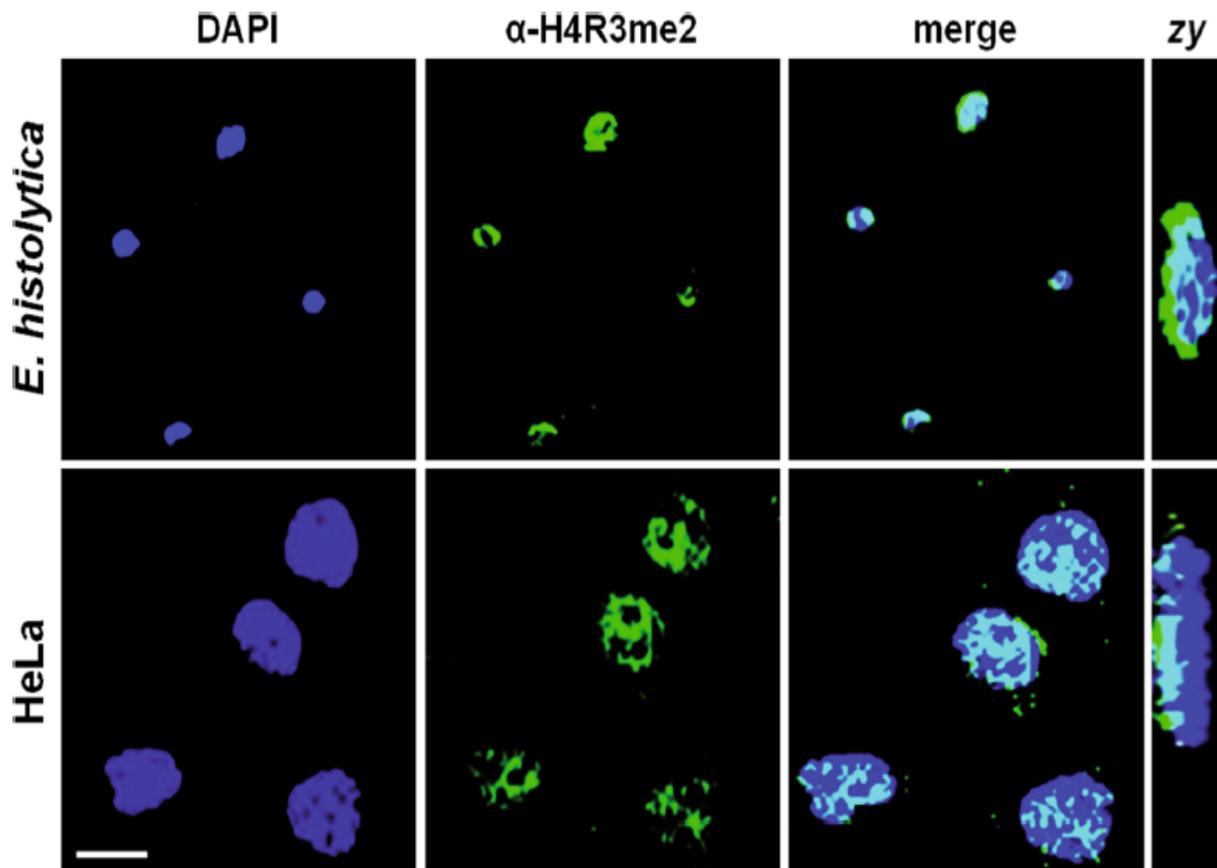


Figura 15. Localización celular de la marca epigenética H4R8 me2 en *E. histolytica*. Trofozoítos de *E. histolytica* y células HeLa (control positivo) fueron procesados para ensayos de inmunofluorecencia usando el anticuerpo comercial α -HsH4R3 me2 y un anticuerpo secundario acoplado a FITC (verde), los núcleos fueron teñidos con DAPI (azul). Finalmente, las muestras se analizaron por microscopía confocal. Se realizaron 20 cortes ópticos. El plano zy representa la vista lateral de las células, la barra representa 10 μ m.

La proteína recombinante EhPRMT1a es reconocida por el anticuerpo α -HsPRMT1.

Como se describió anteriormente (Borbolla V. J., 2012) se realizó un análisis *in silico* que nos indicó que la amiba posee cinco PRMTs hipotéticas, de las cuales tres son homólogas a PRMT1, por lo que fueron denominadas EhPRMT1a, EhPRMT1b y EhPRMT1c. En este trabajo sólo nos enfocamos en el estudio de EhPRMT1a, la cual fue clonada en el vector pGEX-6P-1 para su expresión en *E. coli* ((Borbolla V. J., 2012). Por lo tanto, la parte inicial de este estudio fue producir la proteína recombinante EhPRMT1a para posteriormente conocer si es capaz de realizar la transferencia de grupos metilo al residuo H4R3 de histonas comerciales.

Para la producción de la proteína recombinante EhPRMT1a se utilizó la construcción GST/*Ehprmt1a*, la cual se transformó en bacterias cepa de *E.coli* BL21 (DE3). Para la inducción de la proteína recombinante se utilizó 1.5 mM de IPTG por 5 horas a 30 °C. Posteriormente se procedió a la purificación de la proteína recombinante empleado perlas de glutatión-sepharosa 4B. Esta purificación se confirmó en geles SDS-PAGE al 12% teñidos con azul de Coomassie. Para estos ensayos obtuvimos la proteína GST de 26 kDa del vector PGEX-6P-1 vacío como control, mientras que en la purificación de bacterias transformadas con la construcción que contiene a GST/EhPRMT1a se obtuvo una banda de aproximadamente 62 kDa, el cual es el peso esperado para la proteína recombinante (26 kDa de GST y 36 kDa de EhPRMT1a) (Fig. 16A). Para confirmar que esas bandas corresponden a las proteínas recombinantes se realizaron ensayos de western blot utilizando el anticuerpo α -GST. Como era de esperarse, el anticuerpo reconoció las bandas de 26 y 62 kDa (Fig. 16B). Con este resultado se confirma la adecuada inducción y purificación de la proteína recombinante GST/EhPRMT1a.

Posteriormente, con el objetivo de conocer si el anticuerpo comercial α -HsPRMT1 es capaz de reconocer a la proteína recombinante GST/EhPRMT1a, se realizaron ensayos de western blot empleando este anticuerpo comercial. En estos experimentos, el anticuerpo reconoció a la proteína recombinante GST/EhPRMT1a, pero no a la proteína GST (Fig. 16C). Este resultado nos permitió confirmar que el anticuerpo comercial α -HsPRMT1 reconoce a su ortólogo de *E. histolytica*.

Por otro lado, se ha demostrado que la formación de oligómeros de HsPRMT1 es de suma importancia para su actividad enzimática (Strahl et al., 2001). Así mismo, se ha demostrado que la formación de dímeros y tetrámeros es crucial para la actividad de las proteínas PRMT1 recombinantes de *Plasmodium falciparum* (PfPRMT1) (Fan et al., 2009) y de *Trypanosoma brucei* (TbPRMT1) (Pelletier et al., 2005). Por tal razón se realizó un ensayo de entrecruzamiento de la proteína EhPRMT1a recombinante con glutaraldehído al 0.025% y se visualizó la formación de oligómeros en geles SDS-PAGE al 10% teñidos con plata policromática. Como se muestra en la figura 16D, en esas condiciones se observó la presencia de bandas de 72 y 144 kDa, indicando que EhPRMT1a es capaz de ensamblarse y formar dímeros y tetrámeros. Dado que la formación de oligómeros de PRMT1 en otras especies es importante para su actividad, el resultado anterior sugiere que la proteína recombinante EhPRMT1a pudiera tener la capacidad de transferir grupos metilo a sus proteínas blanco.

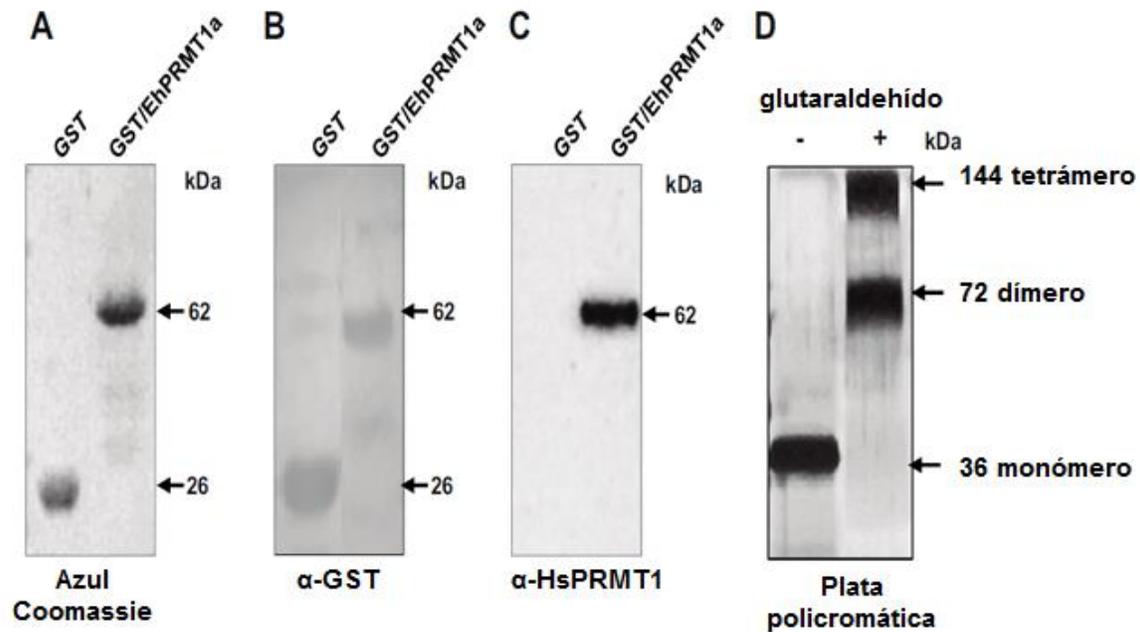


Figura 16. Purificación, detección por α -HsPRMT1 y oligomerización de la proteína recombinante EhPRMT1a. Bacterias *E. coli* se transformaron con el plásmido pGEX-6P-1 sin inserto o conteniendo el gen *Ehprmt1a* (*GST/EhPRMT1a*). La proteína recombinante se indujo con IPTG y se purificó mediante cromatografía de afinidad. A) SDS-PAGE al 12% teñido con azul de Coomassie. B) Ensayo de western blot usando α -GST. C) Ensayo de western blot usando α -HsPRMT1. D) ensayo de entrecruzamiento con glutaraldehído de la proteína recombinante EhPRMT1a, sin la etiqueta de GST y analizado mediante geles de SDS-PAGE al 12% y teñidos con nitrato de plata.

La proteína recombinante EhPRMT1a tiene actividad de metiltransferasa.

Para confirmar que la proteína recombinante EhPRMT1a tiene actividad enzimática, se incubó 1 µg de esta proteína (sin GST) con SAM marcado con tritio (^3H) y 10 µg de fracción nuclear enriquecida de histonas de trofozoítos o con diferentes cantidades de histonas de pollo comerciales. Finalmente, se evaluó mediante un contador de centelleo la transferencia de grupos metilo del SAM a las histonas. Este ensayo *in vitro* permitió demostrar que la EhPRMT1a tiene actividad de metiltransferasa, debido a que esta enzima fue capaz de tomar los grupos metilo marcados con ^3H y transferirlos a la fracción nuclear de trofozoítos amibianos o a las histonas comerciales, mientras que el control negativo (lisozima) no presentó actividad (Fig. 17A).

El resultado anterior nos dice que la EhPRMT1a tiene actividad enzimática, pero no sugiere un sustrato específico. Para determinar si la EhPRMT1a es capaz de metilar a H4R3 se repitió el mismo ensayo *in vitro* con las histonas comerciales, pero el SAM fue utilizado sin marca radioactiva. Entonces, la reacción fue analizada por ensayos de western blot usando el anticuerpo comercial α -H4R3 me2. Los resultados mostraron el reconocimiento de la banda correspondiente a la histona H4, mientras que en el control negativo (reacción con lisozima) no se detectó ninguna banda (Fig. 17B). Este resultado indica que H4R3 es blanco de metilación por EhPRMT1a y posiblemente esta enzima también puede metilar a EhH4R8.

Finalmente, para soportar la hipótesis de que uno de los sustratos específicos de EhPRMT1a es H4R8 (equivalente a H4R3), se realizaron ensayos de inmunofluorescencia que permitieron por medio de microscopía confocal colocalizar la marca de los anticuerpos α -H4R3 me2 (verde) y α -EhPRMT1 (rojo) dentro de los núcleos de *E. histolytica* que fueron teñidos con DAPI (Fig. 17C).

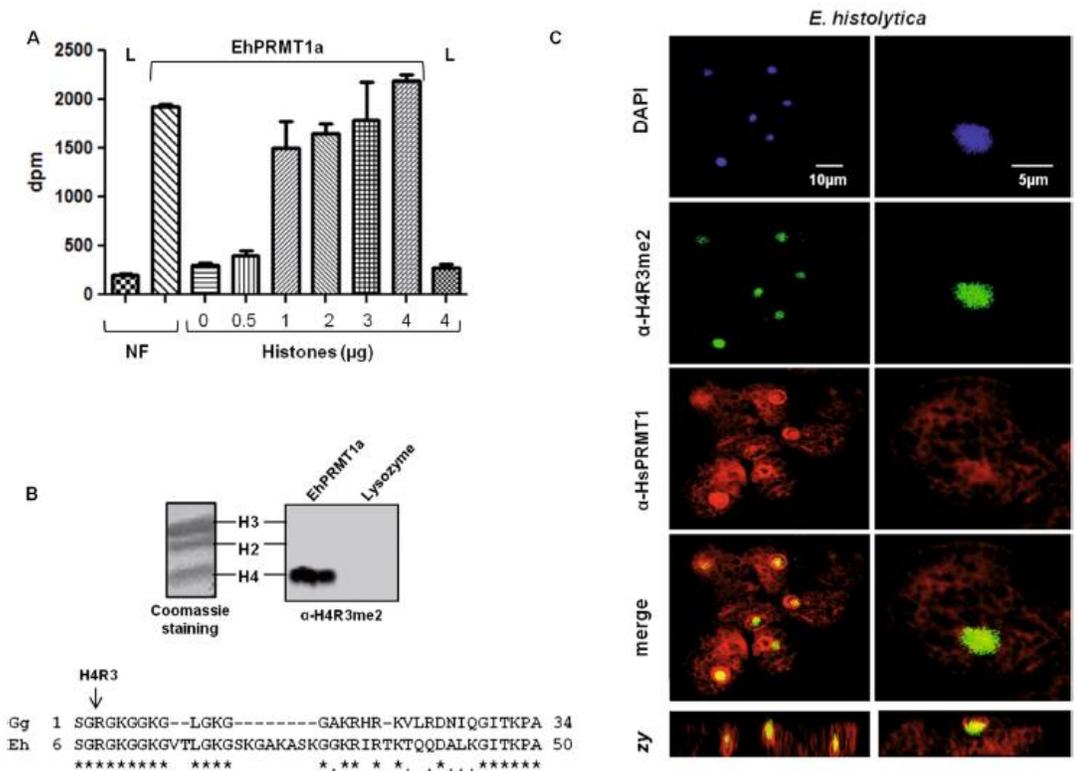


Figura 17. Actividad enzimática de EhPRMT1a y colocación de EhPRMT1 y H4R8 2me en trofozoítos amibianos. A) 1 µg de EhPRMT1a recombinante se incubó con 10 µg de fracción nuclear de trofozoítos de *E. histolytica* o con diferentes cantidades de histonas de pollo en presencia de SAM marcado con ^3H . La incorporación de la marca radioactiva al sustrato fue analizada en el contador de centelleo. Como control negativo se utilizó 1 µg lisozima (L). Los resultados se muestran como el promedio de tres experimentos independientes por duplicado \pm desviación estándar. B) 1 µg de EhPRMT1a recombinante o lisozima fueron incubados con 4 µg de histonas de pollo en presencia de SAM sin marca radiactiva; posteriormente, la reacción se analizó por ensayos de western blot empleado el anticuerpo α -H4R3 me2, abajo del panel se muestra un alineamiento del N-terminal de la H4 de pollo y de *E. histolytica*. (*) Residuos idénticos. (.) Residuos similares. C) Trofozoítos fueron procesados por inmunofluorescencia usando los anticuerpos α -H4R3 me2 y α -HsPRMT1 marcados con Pacific Blue 410 (verde) y Alexa fluor 647 (rojo), respectivamente. Posteriormente, las muestras se analizaron por microscopía confocal. El plano zy representa la vista lateral de las células.

Silenciamiento de EhPRMT1a en trofozoítos de *E. histolytica*.

Continuando la caracterización de EhPRMT1a, se procedió a clonar el gen de *Ehprmt1a* en el vector de expresión *pSA8* (Ankri et al., 1998). Para confirmar la clonación del gen en el vector, se realizó una doble digestión de los plásmidos obtenidos de bacterias *E. coli* DH5 α después de la transformación con la mezcla de ligación. En el análisis electroforético de los productos de la digestión se observó en dos de las colonias candidatas la liberación del inserto esperado de 960 pb, correspondiente a *Ehprmt1a* (Fig. 18A). De una de las dos construcciones que contenían el gen *Ehprmt1a* (*pSA8/AsEhPRMT1a*), se utilizaron 10 μ g para transfectar trofozoítos de *E. histolytica*, empleando 10 μ l de lipofectamina. Con el fin de tener una mejor expresión del gen en antisentido, y por lo tanto una mejor eficiencia de silenciamiento, la concentración del agente selector (G418) se incrementó gradualmente en el cultivo de los trofozoítos transfectados hasta alcanzar a una concentración final de 40 μ g/ml. Entonces, para analizar el silenciamiento de la proteína EhPRMT1a en los trofozoítos transfectados se realizaron ensayos de western blot utilizando el anticuerpo comercial α -HsPRMT1. En estos ensayos el anticuerpo detectó una banda de 36 kDa, que corresponde a EhPRMT1a, en las amibas sin transfectar (WT), en las amibas transfectadas con el vector vacío (Mock) y en las amibas transfectadas con *pSA8/AsEhprmt1a* (As). Mientras que el control de carga actina, fue similar en las tres poblaciones (Fig. 18B), el análisis densitométrico de las bandas y el análisis estadístico comprobó que los trofozoítos con As presentaron un silenciamiento de aproximadamente un 60 % de la proteína EhPRMT1a. (Fig. 18C).

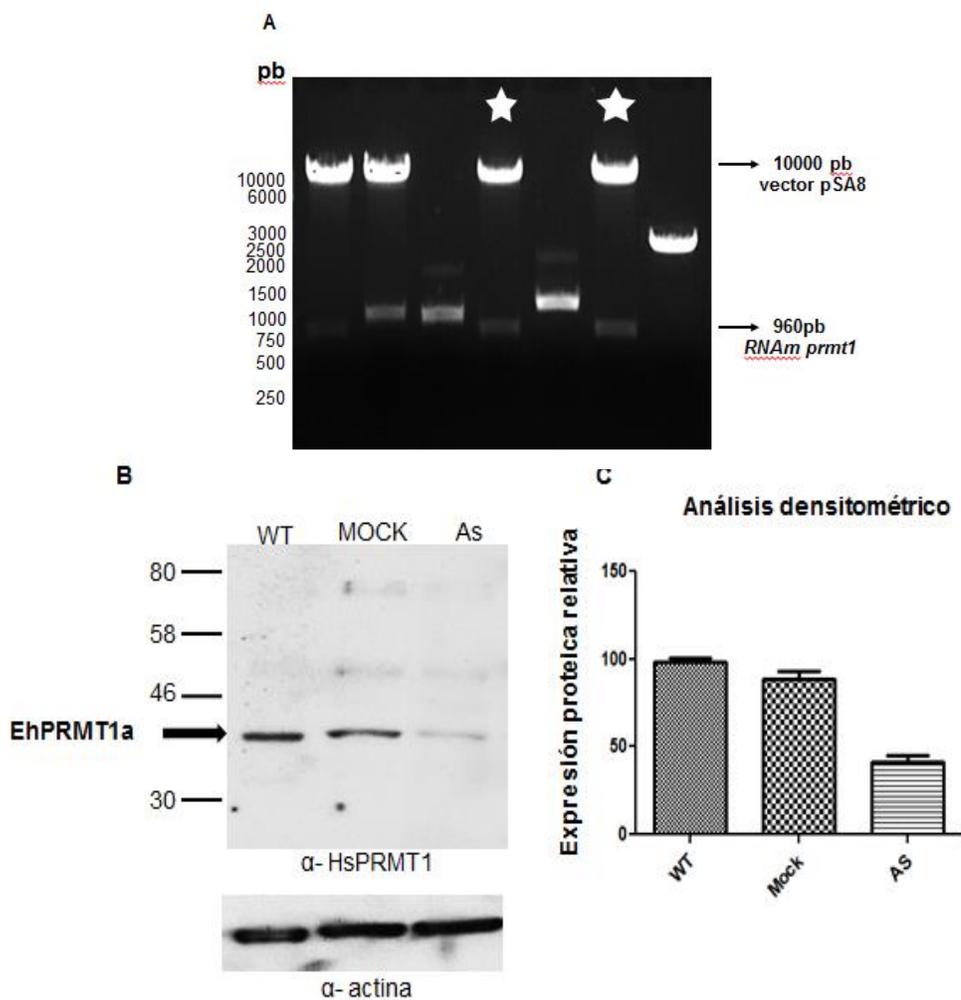


Figura 18. Silenciamiento de la EhPRMT1a en trofozoítos de *E. histolytica*. El gen *Ehprmt1a* se clonó en antisentido en el vector pSA8. A) Los plásmidos candidatos obtenidos de las colonias transformadas con la reacción de ligación se analizaron por electroforesis en geles de agarosa al 1% teñidos con bromuro de etidio. Las estrellas indican los candidatos que liberaron el inserto de 960 pb, correspondiente a *Ehprmt1a*. B) Western blot utilizando el anticuerpo α -HsPRMT1 sobre amibas sin transfectar (WT), transfectadas con el vector vacío (MOCK) y transfectadas con *pSA8/AsEhprmt1a* (As). En la parte inferior se muestra el reconocimiento por el anticuerpo α -actina de las tres poblaciones (control de carga). C) Las bandas reconocidas por los anticuerpos fueron analizadas por densitometría y la expresión de EhPRMT1a se normalizó con respecto a actina para obtener su expresión relativa. Los resultados se muestran como el promedio de tres experimentos \pm desviación estándar. Los resultados fueron analizados con el estadístico ANOVA (*) $p < 0.005$.

El silenciamiento de EhPRMT1a afecta la respuesta al choque térmico.

Para analizar el efecto del silenciamiento de EhPRMT1a en la respuesta a diferentes condiciones de estrés, se utilizaron 1×10^6 trofozoítos amibianos (WT, MOCK y As) y se incubaron en presencia de 2.5 mM H_2O_2 (estrés oxidativo), de 350 μ M GSNO (estrés nítrico), o a 44°C (estrés por choque térmico). En los tres experimentos se monitoreó la resistencia al estrés de *E. histolytica* a diferentes tiempos (0, 15, 30, 45 y 60 min). Para ello, las amibas fueron teñidas con eosina al 2% y se cuantificó el número de amibas que sobrevivieron a los diferentes ambientes. Los resultados revelaron que en el estrés oxidativo y en el estrés nítrico no hay cambios significativos en los trofozoítos silenciados con respecto a las amibas sin transfectar y a las transfectadas con el vector vacío (Fig. 19A). Sin embargo, los trofozoítos silenciados (As) mostraron ser más sensibles al choque térmico (Fig. 19B). Estos resultados indican que el silenciamiento de EhPRMT1a afecta la resistencia de los trofozoítos al choque térmico.

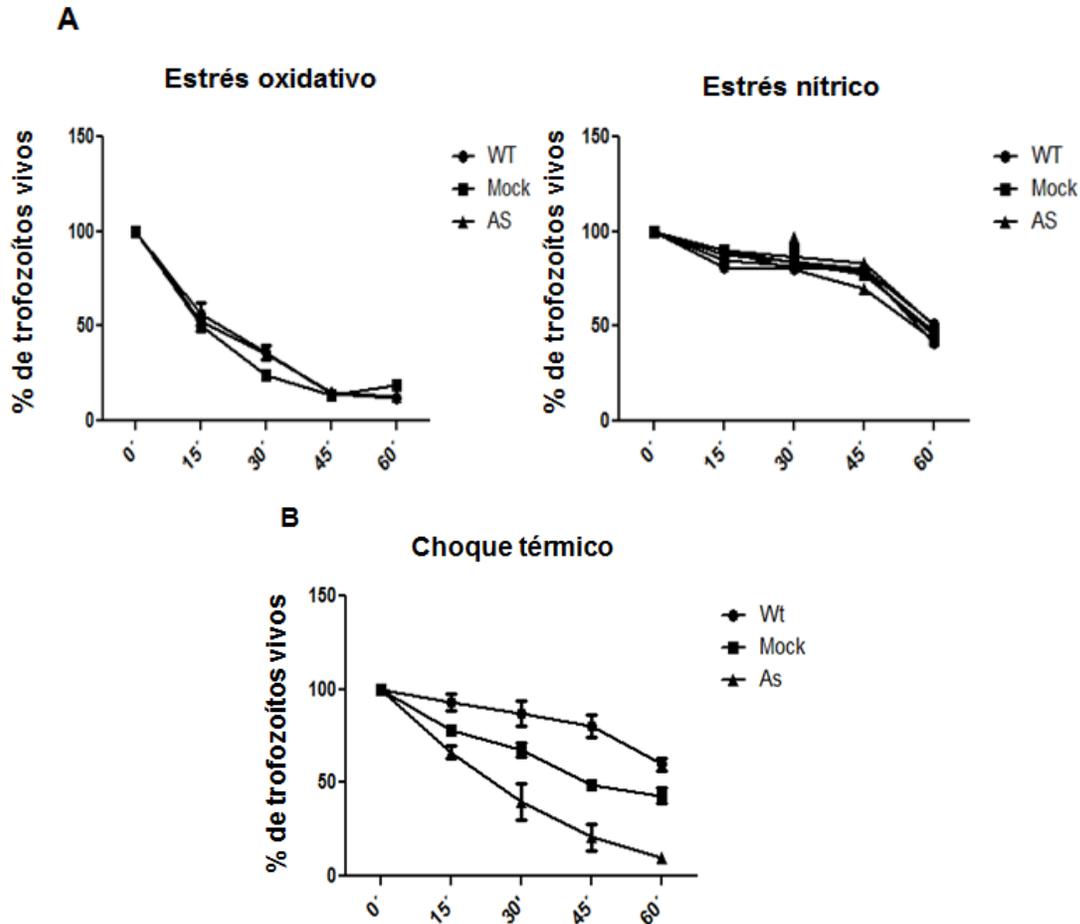


Figura 19. Efecto del silenciamiento de EhPRMT1a en trofozoítos sometidos a diferentes condiciones de estrés. Los trofozoítos sin transfectar (WT), transfectados con el vector vacío (Mock) o transfectados con pASP8/AsEhPRMT1a (As) se sometieron a diferentes condiciones de estrés y a diferentes tiempos se evaluó su sobrevivencia. A) Trofozoítos incubados a 37°C con H₂O₂ 2.5 mM (estrés oxidativo) y GSNO al 350 μM (estrés nítrico). B) Trofozoítos incubados a 44°C (choque térmico). Los resultados representan el promedio de tres experimentos independientes ± desviación estándar. Los resultados fueron analizados con el estadístico ANOVA (*) p<0.005.

El silenciamiento de EhPRMT1a afecta la destrucción de células blanco por los trofozoítos.

Para analizar el efecto del silenciamiento de EhPRMT1a en la virulencia *in vitro* de los trofozoítos, se analizó la destrucción de monocapas de células HeLa, las cuales se incubaron a 37°C por 30 min con 200,000 trofozoítos (WT, Mock o As). Posteriormente se determinó el porcentaje de destrucción de las monocapas como se describió en Materiales y métodos. En estos ensayos, las amibas As solo destruyeron un 10% de la destrucción de las monocapas, mientras que las amibas sin transfectar y las Mock destruyeron la monocapa en 40 y 30%, respectivamente (Fig. 20A). Estos resultados muestran que el silenciamiento de EhPRMT1a afecta la virulencia *in vitro* de *E. histolytica*.

El silenciamiento de EhPRMT1a afecta la migración de los trofozoítos.

Para determinar si la migración de los trofozoítos es alterada por el silenciamiento de EhPRMT1a, se realizaron ensayos de migración celular, en los cuales se utilizaron 2.5×10^5 trofozoítos (WT, Mock, y As). Las amibas se colocaron en transwell sobre placas de 24 pozos y se incubaron por 3 h a 37 °C. Posteriormente, se cuantificaron las amibas que migraron a la cámara inferior del transwell. Los resultados revelaron que menos del 10% de amibas transfectadas con *pSA8/AsEhprmt1a* migraron a la placa, en comparación, las amibas WT y Mock migraron un 100 y 90%, respectivamente (Fig. 20B).

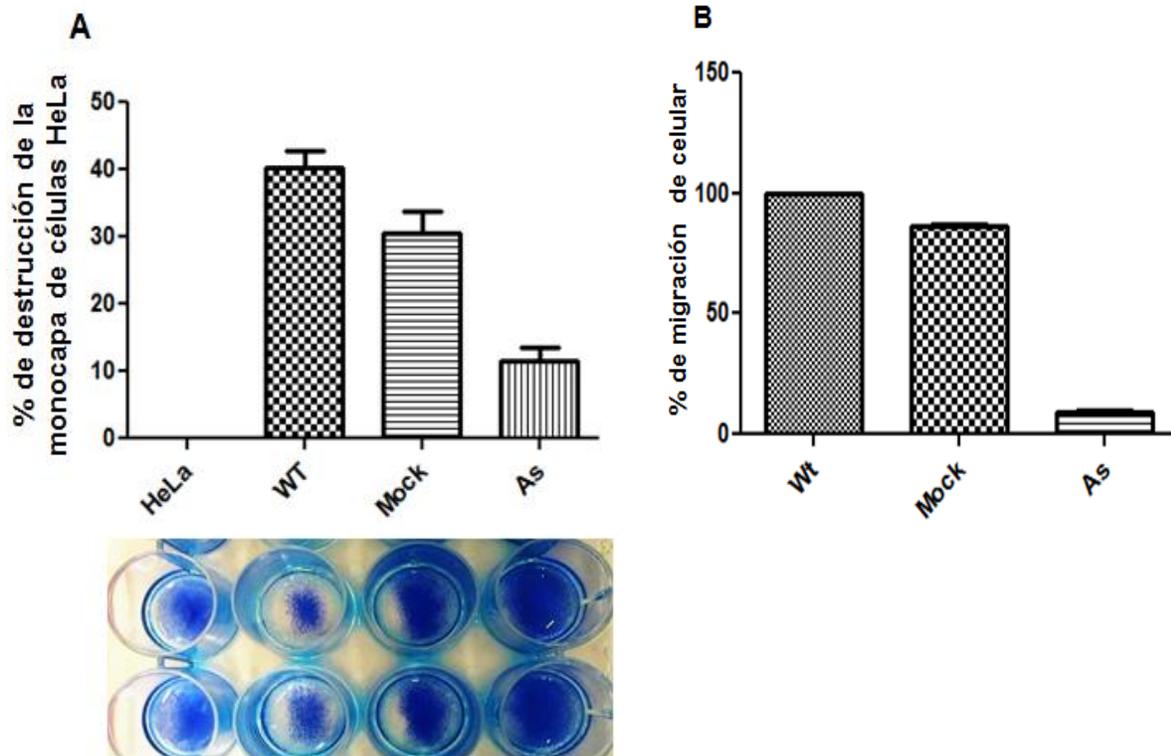


Figura 20. El silenciamiento de EhPRMT1a afecta la destrucción de células blanco y la migración de los trofozoítos. A) Trofozoítos sin transfectar (WT), trofozoítos transfectados con el vector vacío (Mock) y con pSA8/AsEhPRMT1a (As) se pusieron a interaccionar con monocapas de células HeLa durante 30 min a 37 °C. Posteriormente se determinó el porcentaje de destrucción de las monocapas. En la parte inferior se muestra una imagen representativa de este ensayo. B) 2.5×10^5 trofozoítos WT, Mock y As se colocaron sobre transwell encima de placas de 24 pozos y se incubaron por 3 h a 37 °C. Finalmente, se cuantificaron las amibas que migraron a la placa. Los resultados indican el promedio de tres experimentos independientes por duplicado \pm desviación estándar. Los resultados fueron analizados con el estadístico ANOVA (*) $p < 0.005$.

Obtención de anticuerpos específicos contra las HKMTs de *E. histolytica*.

Un análisis *in silico* previo mostró que *E. histolytica* posee cuatro genes que codifican para enzimas del tipo HKMTs (EhHKMTs) y por medio de ensayos RT-PCR se demostró que los cuatro genes son transcritos (Borbolla V. J., 2012). Sin embargo, el alineamiento de las cuatro EhHKMTs demostró que sus secuencias son muy semejantes entre ellas. Por tal razón, para la caracterización individual de estas enzimas se diseñaron péptidos sintéticos específicos para la obtención de anticuerpos contra ellos. Para el diseño de los péptidos se emplearon dos diferentes programas: *ABCpred* y *protein hydrophobicity*. Adicionalmente, con los péptidos sugeridos por los programas se realizó un análisis de BLASTP en la base de datos del genoma amibiano para evitar el reconocimiento cruzado con otras proteínas del parásito. De esta manera se mandó sintetizar un péptido específico e inmunogénico para cada EhHKMT (Tabla 1), los cuales se inmunizaron en conejos y ratones para obtener los anticuerpos.

La especificidad de los anticuerpos se evaluó mediante western blot utilizando extractos totales de trofozoítos y las cuatro proteínas recombinantes EhHKMTs. Así, los genes de las cuatro EhHKMTs se clonaron en el vector de expresión pGEX-6P-1 y las proteínas recombinantes fueron inducidas y purificadas. Estas proteínas se analizaron por electroforesis en geles de poliacrilamida teñidos con azul de Coomassie, donde se observó el peso esperado de 75-77 kDa (26 kDa de GST más 51 o 49 kDa de las EhHKMTs 1-4) (Fig.21A). En los ensayos de western blot, los anticuerpos α -EhHKMT1, α -EhHKMT2 y α -EhHKMT4 detectaron solamente a la proteína recombinante correspondiente y a una sola banda de aproximadamente 50 KDa en los extractos de *E. histolytica* (Fig. 21B, C y E), confirmando su especificidad. Sin embargo, el anticuerpo α -EhHKMT3 reconoció a las cuatro enzimas recombinantes y a una sola banda de aproximadamente 50 KDa en los extractos de *E. histolytica* (Fig. 21D), indicando una inespecificidad por las cuatro EhHKMTs de este anticuerpo. Debido a esto, los ensayos de inmunolocalización se realizaron únicamente con los anticuerpos α -EhHKMT1, α -EhHKMT2 y α -EhHKMT4.

EhHKMT1, EhHKMT2 y EhHKMT4 se localizan en el núcleo y en el citoplasma de los trofozoítos.

Para conocer la localización celular de las EhHKMT1, EhHKMT2 y EhHKMT4 se realizaron ensayos de inmunofluorescencia, en donde el núcleo fue teñido con DAPI (azul) y para detectar las EhHKMTs se utilizó el anticuerpo secundario α -conejo rodaminado (rojo). Además, para delimitar el núcleo, la membrana nuclear se detectó con un anticuerpo contra la lamina B1 y un segundo anticuerpo acoplado a Alexa 488 (verde) (Fig. 22A). Como se observa en las imágenes de microscopia confocal, las EhHKMTs se encuentran presentes tanto en núcleo como en citoplasma (Fig. 22A), lo que sugiere que estas enzimas además de metilar histonas en el núcleo, probablemente también metilan proteínas no-histonas en el citoplasma.

Para confirmar la especificidad de los anticuerpos α -EhHKMT1, 2 y 4 en los ensayos de inmunolocalización, se realizaron pruebas de competencia en donde, se agregó un péptido competidor durante la incubación con los anticuerpos. En cada caso se utilizó como competidor específico el mismo péptido contra el que se diseñó cada anticuerpo, mientras que como competidor inespecífico se empleó un péptido de otra EhHKMT. En estos ensayos, se observó fluorescencia en el núcleo y citoplasma de los trofozoítos en las muestras tratadas sin péptido, así como en aquellas incubadas en presencia del competidor inespecífico, mientras que no se detectó señal alguna cuando se utilizó el competidor específico (Fig. 22B). Este resultado confirmó la especificidad de los anticuerpos y soporta la hipótesis de que las EhHKMTs también tienen como blanco proteínas citoplásmicas.

Otro ensayo que se utilizó para confirmar la presencia de las EhHKMTs en el núcleo y citoplasma fue la inmunomicroscopía electrónica. Para este ensayo, los trofozoítos amibianos se incubaron con los anticuerpos α -EhHKMT1, 2 o 4 y con un anticuerpo secundario conjugado a partículas de oro de 15 nm. Como se muestra en figura 23, las proteínas EhHKMT1, 2 y 4 se localizan indudablemente dentro del núcleo y en regiones citoplasmáticas.

Tabla 1- péptidos sintéticos utilizados para producir anticuerpos específicos contra las EhHKMTs

EhHKMTs	Péptido	Posición
EhHKMT1	AQLAQNPSRENEFENVQWM	118-137
EhHKMT2	NEFINEETAFKCLKSKR	287-304
EhHKMT3	DFIIDMEKLRHKAYNP	297-314
EhHKMT4	KLGRERKDEKYWKEY	95-109

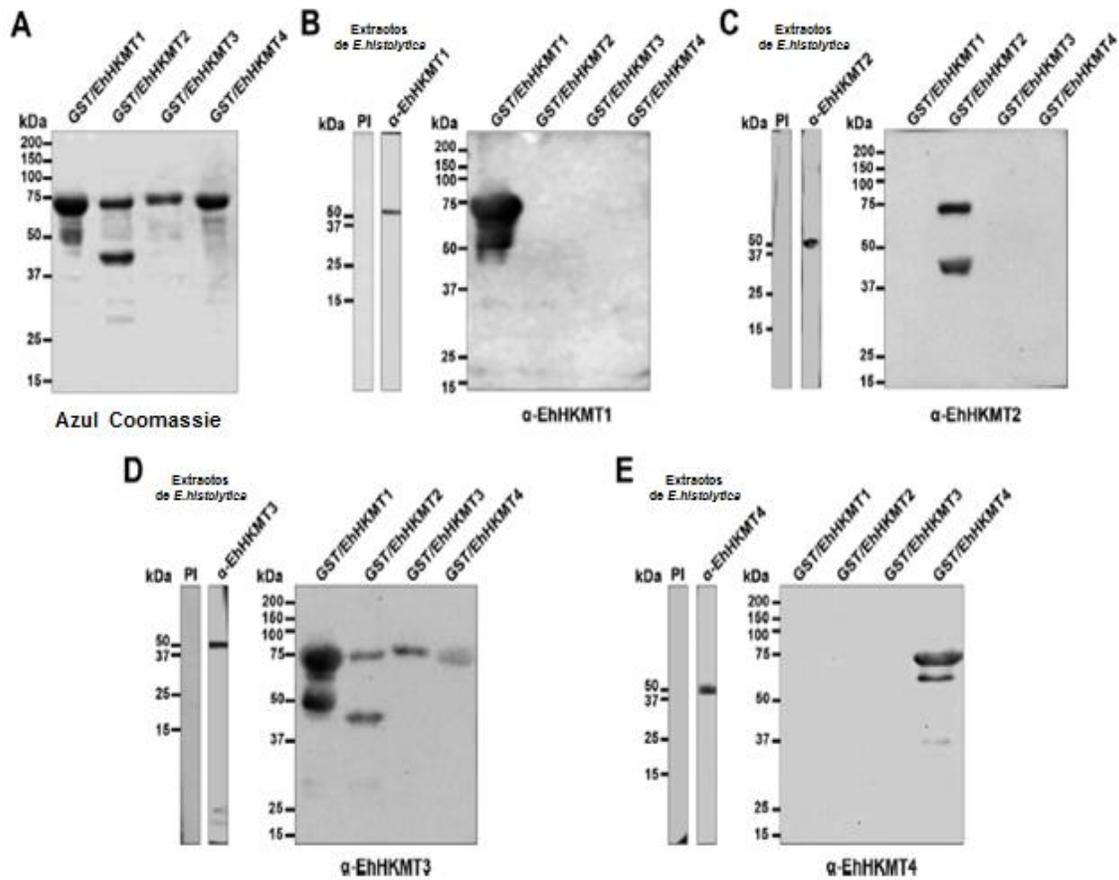


Figura 21. Inmunodetección de los anticuerpos específicos contra las EhHKMTs. Péptidos específicos para cada una de las EhHKMTs se sintetizaron y se inocularon en conejos y ratones. La especificidad de los anticuerpos obtenidos se analizó por ensayos de western blot empleando extractos totales de trofozoítos y las proteínas recombinantes de las cuatro EhHKMTs. A) Purificación de las cuatro proteínas recombinantes visualizadas en SDS-PAGE 12% teñido con azul de Coomassie. B-E) Ensayos de western blot usando los anticuerpos α -EhHKMT1 (B), α -EhKMT2 (C), α -EhKMT3 (D) y α -EhKMT4 (E). A la izquierda de cada panel se observan los ensayos de western blot en extractos totales de trofozoítos amibianos y a la derecha los ensayos de western blot sobre las proteínas recombinantes. (PI) suero preinmune.

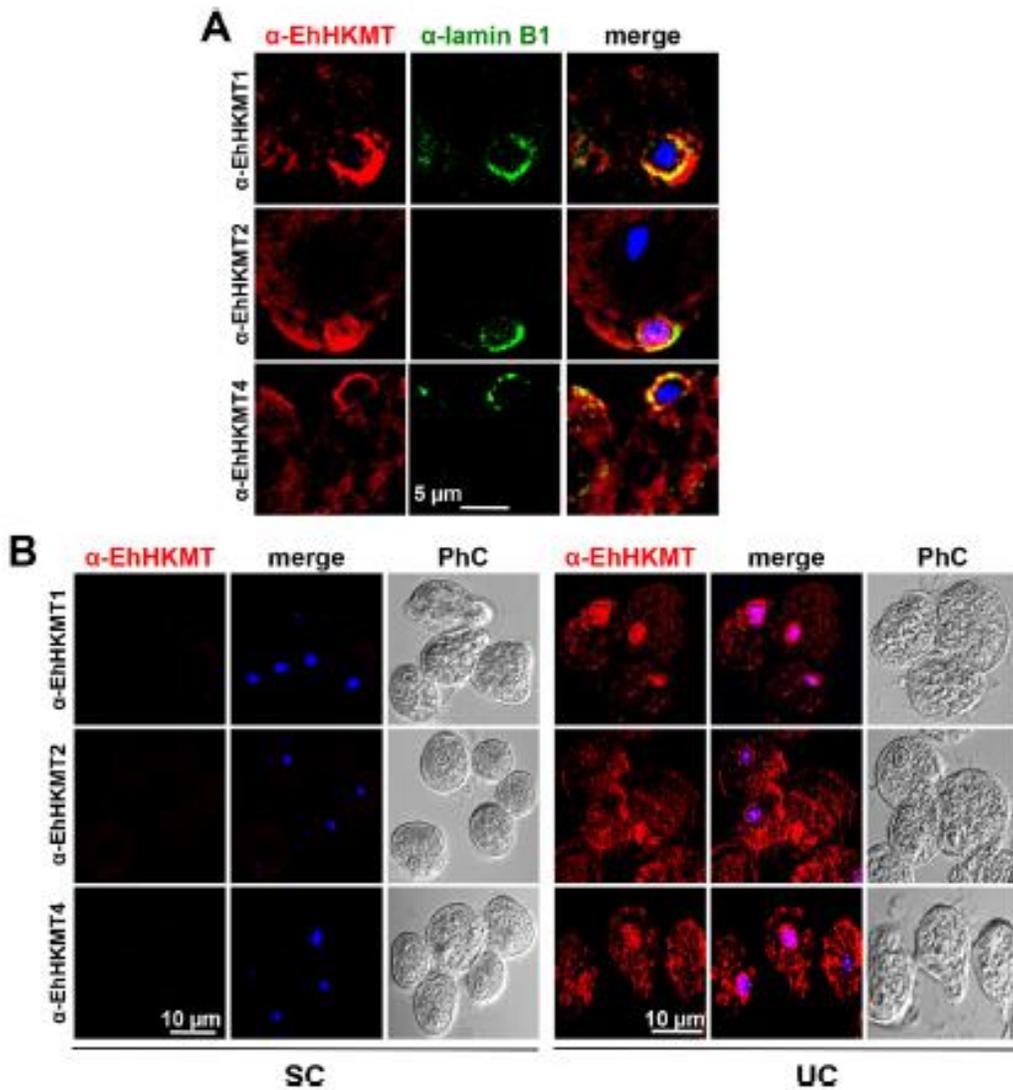


Figura 22. Localización celular de EhHKMT1, 2 y 4. A) Los trofozoítos amibianos se sometieron a ensayos de inmunofluorescencia utilizando anticuerpos α -EhHKMT1, 2 o 4 (rojo), α -lamina B1 (verde) y los núcleos se tiñeron con DAPI (azul). Merge, unión de los canales verde, rojo y azul. B) Para comprobar la especificidad de los anticuerpos en estos ensayos, se realizaron experimentos de competencia utilizando como competidor específico 400 μ g del péptido para el cual se produjo el anticuerpo (SC) y como competidor inespecífico 400 μ g de un péptido no relacionado (UC). Merge, unión de los canales rojo y azul. PhC, contraste de fases.

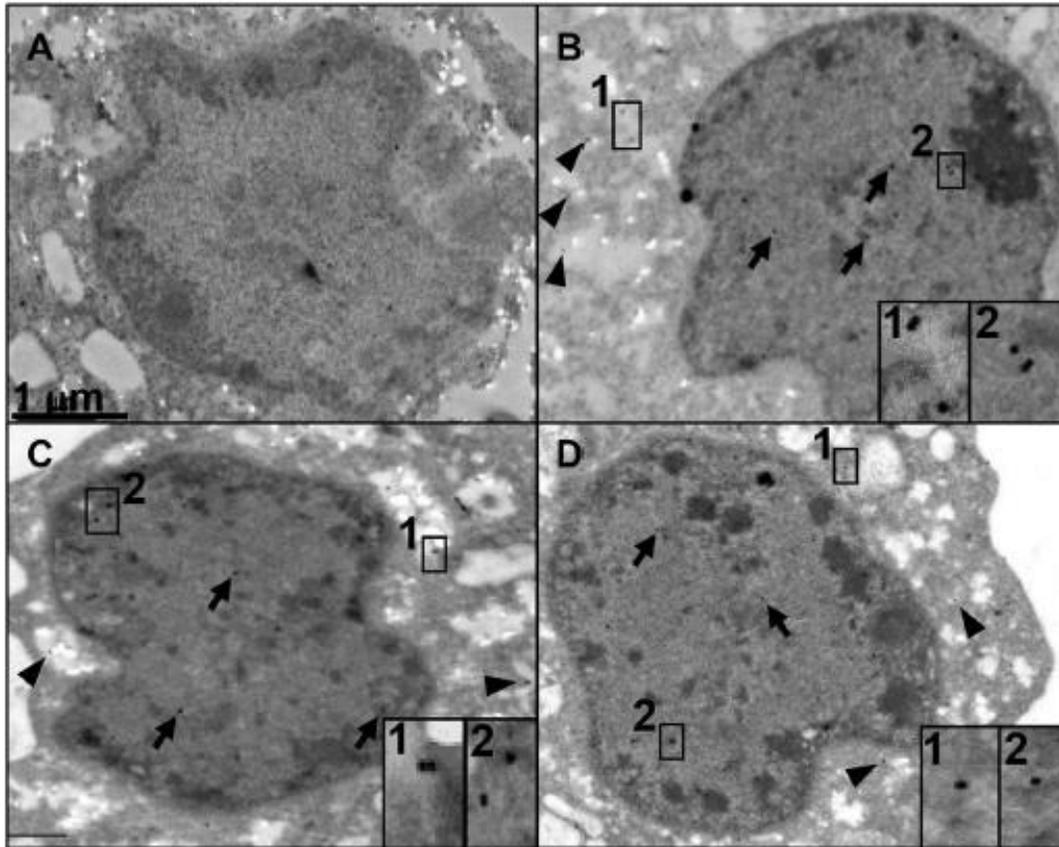


Figura 23. Inmunomicroscopía electrónica de las EhHKMT1, 2 y 4. Los trofozoítos de *E. histolytica* se incubaron con los anticuerpos α -EhHKMT1, 2 o 4 y posteriormente con el anticuerpo secundario conjugado a partículas de oro de 15 nm. Posteriormente, las muestras fueron analizadas en un microscopio electrónico de transmisión. A) Control sin anticuerpo primario. B) Detección de EhHKMT1. C) Detección de EhHKMT2. D) Detección de EhHKMT4. Las flechas indican algunas marcas detectadas en el interior del núcleo, mientras que las cabezas de flecha indican algunas señales en el citoplasma. Los cuadros 1 y 2 muestran una ampliación de las imágenes marcadas en los recuadros.

La localización celular de las EhHKMTs cambia durante la fagocitosis

Se sabe que la metilación en histonas es importante para la regulación epigenética y la expresión de los genes, pero la metilación en proteínas no-histonas juega un papel importante en la traducción de señales o como cofactor de varias proteínas (Hamamoto et al., 2015). La fagocitosis es un mecanismo importante de la citopatogenicidad de *E. histolytica* (Orozco et al., 1983) y para que ésta se lleve a cabo es necesario que se activen vías de señalización que induzcan la emisión de pseudópodos y la ingestión de la célula blanco. Por lo tanto, es posible que en estas vías de señalización esté involucrada la metilación de proteínas por HKMTs. Para analizar si las enzimas EhHKMT1, EhHKMT2 y EhHKMT4 modifican su localización celular durante la fagocitosis, y que por lo tanto participen en este evento, se realizaron ensayos de inmunofluorescencia durante 0, 10, 20 y 30 minutos de eritrofagocitosis. En estos experimentos no se modificó la localización de EhHKMT1 en ningún tiempo de la eritrofagocitosis (Fig. 24). En contraste, EhHKMT2 se relocalizó en un 95% de los trofozoítos a las vacuolas fagocíticas después de 20 min de fagocitosis, mientras que la EhHKMT4, a este mismo tiempo se relocalizó al citoplasma, donde se encontró presente en cerca de un 70% de los trofozoítos alrededor de los eritrocitos ingeridos (Fig. 24). Estos resultados sugieren que las enzimas EhHKMT 2 y 4 podrían estar involucradas en la formación de fagosomas, interviniendo directamente en la metilación de alguna proteína relacionadas a la fagocitosis o involucradas como cofactores de proteínas indispensables para que se lleve a cabo este evento de virulencia en *E. histolytica*.

EhHKMT2 y 4 interaccionan con la adhesina EhADH durante la fagocitosis.

Para determinar si las EhHKMT2 y 4 están involucradas en la interacción con alguna proteína relacionada con la fagocitosis, se realizaron ensayos de co-localización con la proteína EhADH, debido a que se ha demostrado que esta proteína, al igual que EhHKMT2 y 4, es reclutada a los 20 minutos de eritrofagocitosis alrededor de los fagosomas (Avalos-Padilla et al., 2015; Garcia-Rivera et al., 1999). Por tal razón, trofozoítos amibianos se incubaron con eritrocitos por 20 min y se sometieron a ensayos de inmunofluorescencia utilizando los anticuerpos α - EhHKMT1, EhHKMT2, EhHKMT4 y α -EhADH. Como se esperaba de acuerdo

a los ensayos previos, no se detectó co-localización de EhHKMT1 y EhADH (Fig. 25A), sugiriendo que EhHKMT1 no está directamente involucrada en el evento de fagocitosis. Por otra parte, si se detectó co-localización de las enzimas EhHKMT2 y EhHKMT4 con la proteína EhADH (Fig. 25A), sugiriendo una probable interacción entre ellas y un posible papel en la fagocitosis.

Para confirmar la participación de EhHKMT2 y 4 en la fagocitosis, los trofozoítos de *E. histolytica* se incubaron con eritrocitos durante 20 min, posteriormente se obtuvieron los extractos totales para realizar ensayos de inmunoprecipitación utilizando el anticuerpo α -EhADH. Finalmente, los productos de inmunoprecipitación se analizaron por medio de ensayos tipo western blot empleando los anticuerpos α -EhHKMT1, α -EhHKMT2 y α -EhHKMT4. Como controles se utilizó el suero preinmune (control negativo) y el anticuerpo α -EhADH (Control positivo). En estos experimentos se detectó a EhHKMT2 y a EhHKMT4, pero no a EhHKMT1, en las proteínas inmunoprecipitadas con α -EhADH (Fig. 25B), soportando la hipótesis de que EhHKMT2 y 4 están involucradas en la formación de fagosomas, interviniendo directamente en la metilación de proteínas, o indirectamente como cofactor de proteínas indispensables para la fagocitosis, como lo es EhADH.

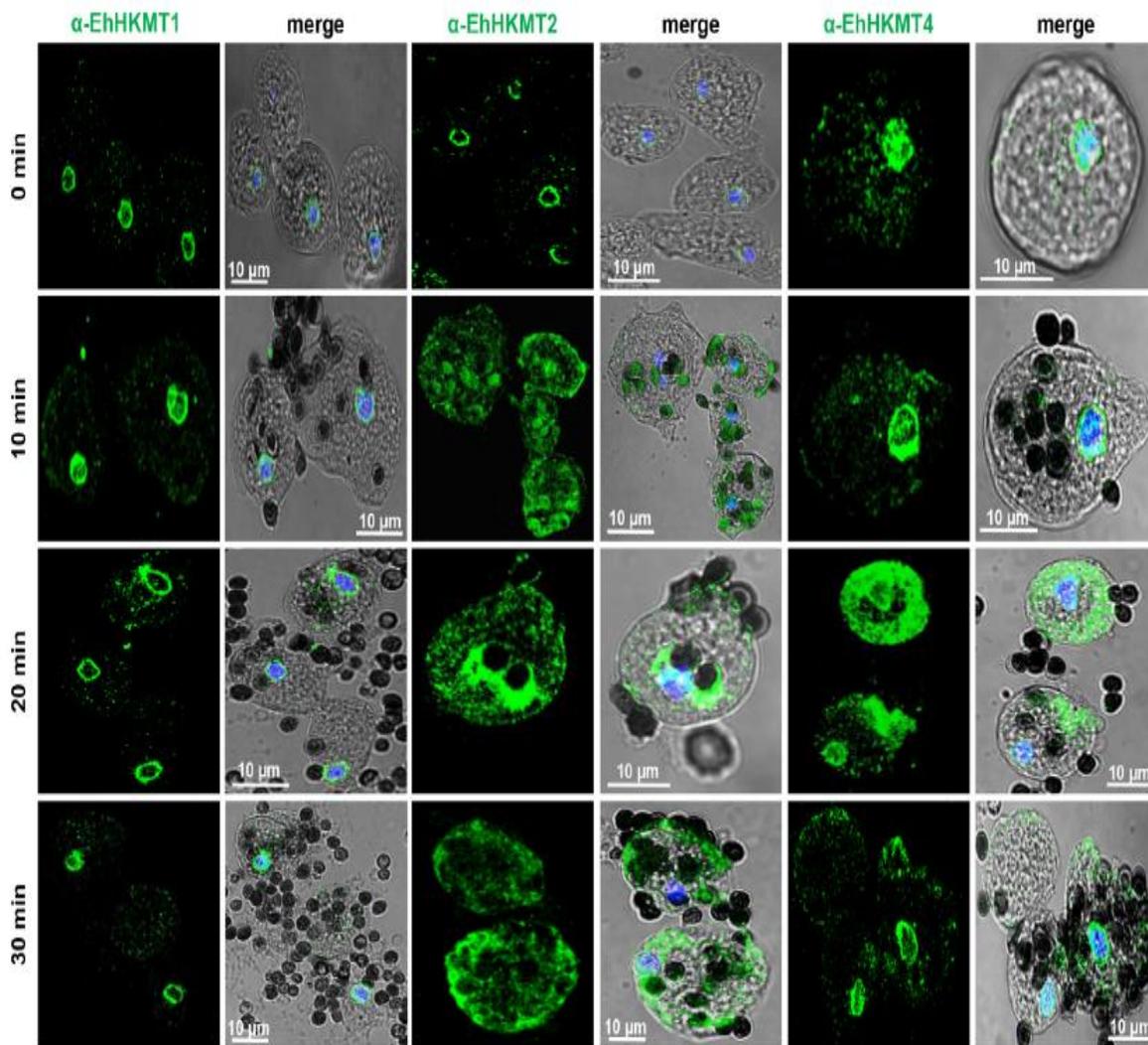


Figura 24. Localización celular de EhHKMT1, 2 y 4 durante la eritrofagocitosis. Los trofozoítos de *E. histolytica* se incubaron con eritrocitos a 37 °C durante 0, 10, 20 y 30 min. Posteriormente, las células fueron fijadas e incubadas con α -EhHKMT1, 2 y 4, después con el anticuerpo secundario acoplado a FITC (verde) y los núcleos se tiñeron con DAPI (azul), para finalmente ser analizadas por microscopía confocal. Merge, unión de contraste de fases y fluorescencia (canales verde y azul).

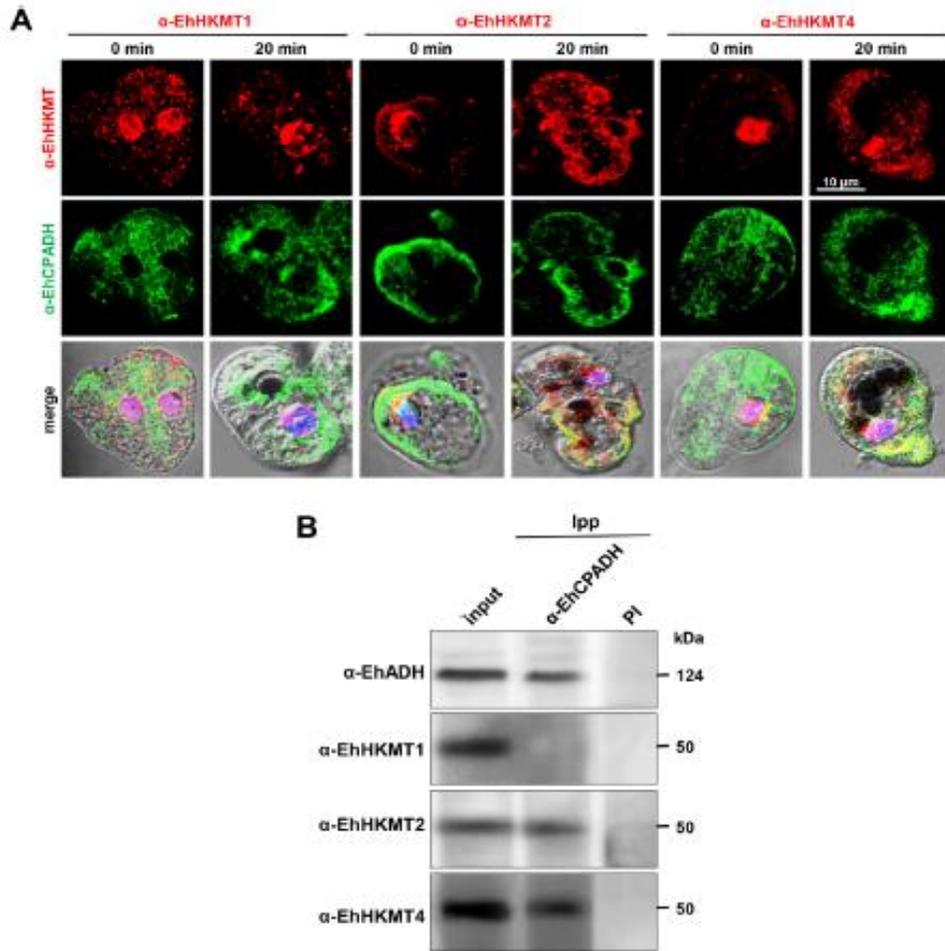


Figura 25. Interacción de EhADH con EhHKMT2 y con EhHKMT4 después de 20 minutos de fagocitosis. A) Los trofozoítos de *E. histolytica* se incubaron durante 0 y 20 min con eritrocitos, posteriormente las muestras se sometieron a ensayos de inmunofluorescencia con los anticuerpos α -EhHKMT1, α -EhHKMT2, α -EhHKMT4 (rojo) y α -EhADH (verde). Finalmente, los núcleos se tiñeron con DAPI (azul) y analizados en un microscopio confocal. Merge, unión de contraste de fases y fluorescencia (canales verde y rojo). B) Los trofozoítos se incubaron con eritrocitos a 37 °C por 20 min, y se realizaron ensayos de inmunoprecipitación (Ipp) utilizando el anticuerpo α -EhAHD. Finalmente, las proteínas precipitadas se analizaron por western blot usando los anticuerpos α -EhHKMT1, α -EhHKMT2 y α -EhHKMT4. Como control negativo se utilizó el suero preinmune (PI) y como control positivo el mismo α -EhAHD. La migración normal de las proteínas se comprobó en los lisados totales de trofozoítos sin inmunoprecipitar (input).

***E. histolytica* posee las marcas epigenéticas H3K4 me3, H4K20 me2 y H4K20 me3.**

Como se reportó previamente (Borbolla V. J., 2012) el alineamiento de las histonas H3 y H4 de humano (HsH3, HsH4) con las de *E. histolytica* (EhH3, EhH4) muestra que los extremos N-terminales de EhH3 y EhH4 son divergentes en comparación con las H3 y H4 canónicas. Sin embargo, el residuo de K4 se mantiene conservado en EhH3, mientras que en la posición 32 de la EhH4 se encuentra una lisina que se sugiere es equivalente a la H4K20 en humano (Borbolla V. J., 2012). En otros eucariontes, la marca H3K4 me3 se ha encontrado enriquecida en los promotores de los genes transcripcionalmente activos (Dillon et al., 2005), mientras que las marcas H4K20 me2 y me3 se han reportado enriquecidas en los promotores de los genes silenciados (Volkel and Angrand, 2007). Los análisis filogenéticos previos (Borbolla V. J., 2012), sugieren una relación de las EhHKMTs con las enzimas de humano que catalizan esas modificaciones, por lo que los residuos de lisina H3K4 y H4K32 de las histonas amibianas pudieran estar metiladas en la cromatina de *E. histolytica*. Sin embargo, estas marcas epigenéticas no han sido identificadas en este microorganismo. Por tal razón, para detectar estas marcas en la amiba, se realizaron ensayos de western blot con las fracciones de núcleo y citoplasma de trofozoítos amibianos, utilizando los anticuerpos comerciales α -H3K4 3me, H4K20 2me y H4K20 3me. Estos anticuerpos detectaron una única banda sólo en las fracciones nucleares de los trofozoítos amibianos y de células HeLa (usadas como control positivo). El anticuerpo α -H3K4 me3 reconoció una banda de 18 kDa en la fracción nuclear de *E. histolytica* mientras que en células HeLa se detectó una banda de 17 kDa (Fig. 26B). Por otro lado, cuando se utilizaron los anticuerpos α -H4K20 me2 y H4K20 me3 se detectó una banda de 16 kDa en la fracción nuclear de trofozoítos amibianos, mientras que en células HeLa se observó una banda de 14 kDa (Fig. 26B). El fraccionamiento fue validado utilizando un anticuerpo contra la proteína nuclear H4 sin metilación y un anticuerpo contra la proteína citoplásmica EhCPADH (Garcia-Rivera et al., 1999). En estos casos sólo se detectó a la proteína de interés en la fracción esperada (Fig. 26B).

Para confirmar la presencia de las tres marcas epigenéticas en los núcleos de trofozoítos amibianos, se realizaron ensayos de inmunolocalización (Fig. 26C). En estos experimentos,

los trofozoítos amibianos y las células HeLa se incubaron con los anticuerpos α -H3K4 me3, H4K20 me2 y H4K20 me3, y con un anticuerpo secundario acoplado a FITC (verde), y los núcleos fueron teñidos con DAPI (azul). Los resultados muestran el reconocimiento por los anticuerpos del núcleo de los trofozoítos y de las células HeLa (Fig. 26C), confirmando la presencia de las marcas epigenéticas H3K4 me3, H4K20 me2 y H4K20 me3 en *E. histolytica*.

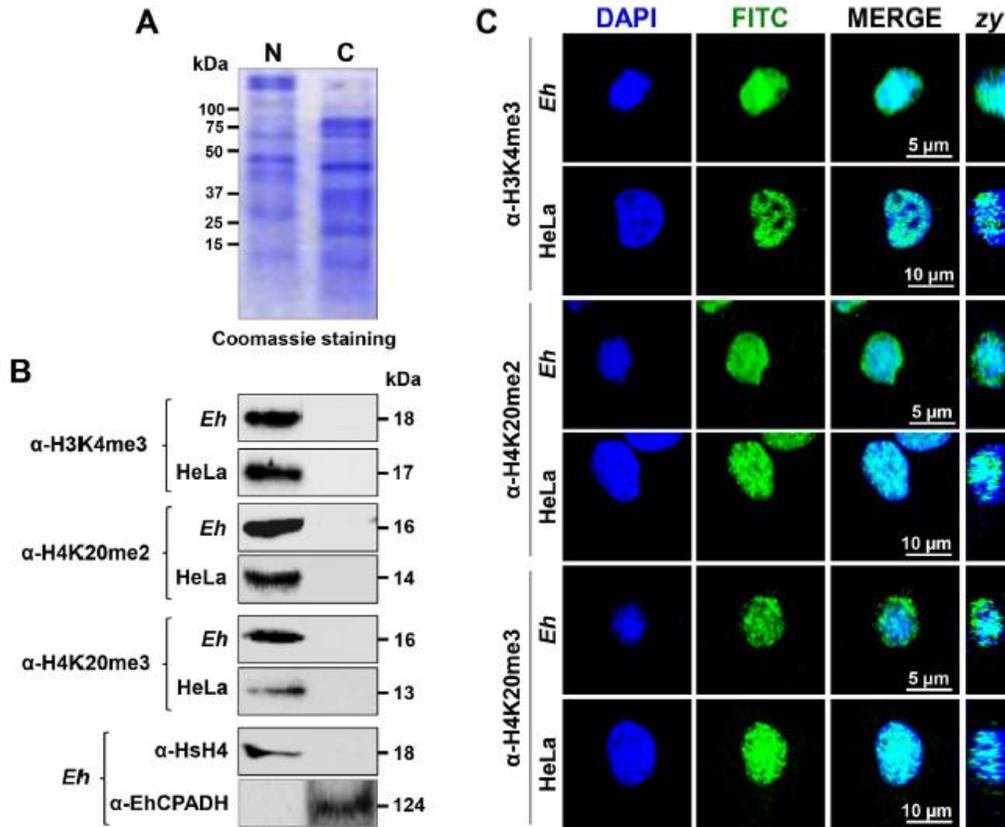


Figura 26. Localización de las marcas epigenéticas H3K4 3me, H4K20 2me y H4K20 3me en trofozoítos de *E. histolytica*. A) Extractos nucleares (N) y citoplásmicos (C) de trofozoítos de *E. histolytica* se analizaron por SDS-PAGE al 15% teñidos con azul de Coomassie. B) Ensayos de western blot empleado las fracciones de núcleo y citoplasma de *E. histolytica* o células HeLa y anticuerpos comerciales contra las marcas epigenéticas H3K4 me3, H4K20 me2 y H4K20 me3. Como controles de fraccionamiento se empleó el anticuerpo α -HsH4 para la fracción nuclear y para la fracción citoplasma el anticuerpo α -EhCPADH. C) Los trofozoítos amibianos y las células HeLa se fijaron, permeabilizaron e incubaron con los anticuerpos α -H3K4 me3, α -H4K20 me2 o α -H4K20 me3 y posteriormente con el anticuerpo secundario acoplado a FITC (verde). Finalmente, los núcleos se tiñeron con DAPI (azul) y las muestras se analizaron por microscopía confocal. Merge, unión de los canales verde y azul. zy muestra a las células en su plano lateral.

Las EhHKMTs recombinantes tienen actividad de metiltransferasa.

Para conocer si las EhHKMTs presentan actividad de metiltransferasa, se realizó un ensayo *in vitro* de manera independiente para cada EhHKMT, en donde 1 μg de proteína recombinante (previamente tratada para eliminar la etiqueta de GST) se incubó con 4 μg de histonas comerciales de timo de ternera y 1 μCi de SAM marcado con tritio (^3H). Entonces, la actividad fue detectada y cuantificada por medio de un contador de centelleo. Los resultados muestran que las cuatro enzimas tienen la capacidad de transferir grupos metilo a las histonas comerciales (Fig. 27A), sin embargo, mediante este ensayo no se puede conocer el sustrato específico para cada EhHKMT. Para poder determinar un sustrato específico, se repitió el ensayo *in vitro*, pero en este caso el SAM fue utilizado sin marca radiactiva. Entonces, la reacción fue analizada por western blot usando los anticuerpos comerciales α -H3K4 me3, α -H4K20 me2 y α -H4K20 me3. Los resultados indican que un sustrato específico de EhHKMT1 es H4K20, ya que la incubación de las histonas con esta enzima provocó el reconocimiento de la marca H4K20 me2, mientras que en la reacción donde se usó EhHKMT2 se reconoció la marca H3K4 me3 y cuando se empleó EhHKMT4 se encontró el reconocimiento de H4K20 me3 (Fig. 27C). En estos ensayos no se pudo identificar un sustrato específico para EhHKMT3 (Fig. 27C).

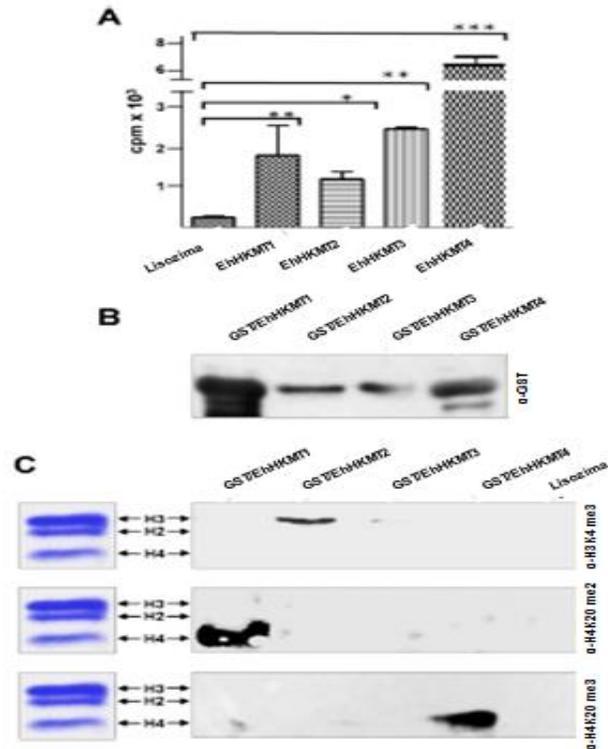


Figura 27. Actividad enzimática de EhHKMT1, 2, 3 y 4 sobre histonas comerciales. A) Ensayo de actividad *in vitro*, donde 1 μ g de cada EhHKMT recombinante se incubó con 4 μ g de histonas comerciales y 1 μ Ci de SAM marcado con ³H. La incorporación de la marca radioactiva al sustrato fue analizada en un contador de centelleo. Como control negativo se utilizó 1 μ g liozima (L). Los resultados se muestran como el promedio de tres experimentos independientes \pm desviación estándar. (*) $p < 0.05$; (**) $p < 0.005$; (***) $p < 0.001$. B) Western blot con un anticuerpo α -GST, donde se muestran las cuatro EhHKMTs recombinantes utilizadas en estos experimentos. C) Se realizó un ensayo de actividad *in vitro* utilizando SAM sin marca radiactiva y posteriormente las reacciones fueron analizadas por western blot empleado los anticuerpos α -H3K4 me3, H4K20 me2 y H4K20 me3, en la izquierda se presenta las histonas comerciales teñidas con azul de Coomassie y a la derecha el ensayo de western blot, en donde se detectaron las marcas específicas catalizadas por cada EhHKMT.

DISCUSION

La epigenética se refiere a los cambios en el fenotipo y a la expresión de genes que son heredables pero que no son causados por mecanismos que afectan el código genético (Cui and Miao, 2010). La metilación que sufre el N-terminal de las histonas es una modificación covalente semejante a la acetilación, fosforilación, ubiquitinación etc. (Volkel and Angrand, 2007). Esta modificación post-traducciona que sufren las histonas forma parte de un elemento de regulación epigenético que controla directa o indirectamente la expresión de genes involucrados con la diferenciación celular (Croken et al., 2012; Strahl et al., 2001), reparación de DNA (Jenuwein and Allis, 2001; Zhang and Reinberg, 2001), transporte de RNA (Lukong and Richard, 2004), procesamiento de RNA (Brahms et al., 2001; Yu et al., 2004), condensación y/o descondensación de la cromatina (Boros et al., 2014), entre otras actividades.

Se ha demostrado que el genoma de *E. histolytica* tiene como unidad básica al nucleosoma (Torres-Guerrero et al., 1991), el cual está integrado de las histonas canónicas H2A, H2B, H3 y H4; sin embargo, el DNA que separa cada nucleosoma (DNA linker) exhibe una longitud irregular (Torres-Guerrero et al., 1991). Además, se ha demostrado que el N-terminal de la H3 y la H4 de *E. histolytica* son divergentes en comparación con los extremos de la H3 y la H4 canónicas (Lozano-Amado et al., 2016). Sin embargo, en las histonas amibianas se encuentran conservados ciertos residuos susceptibles a modificaciones postraduccionales involucrados en la regulación epigenética, aunque algunos de ellos están en una posición diferente a la canónica (Borbolla V. J., 2012; Lozano-Amado et al., 2016). Además, en los extremos N-terminal de las histonas de *E. histolytica* se localizan múltiples residuos de lisina y arginina que también pudieran ser blanco de modificaciones postraduccionales (Lozano-Amado et al., 2016), las cuales posiblemente participen en la regulación epigenética de este parásito. Esto sugiere que posiblemente en *E. histolytica* el código de histonas pudiera ser diferente al establecido en otros organismos; sin embargo, hasta la fecha existen pocos estudios relacionados con la expresión de la maquinaria de regulación epigenética.

En *E. histolytica*, hasta el momento se han identificado y caracterizado proteínas del tipo de acetil transferasas (EhGCN5, EhMYST) y desacetilasas (EhHDAC I) (Ramakrishnan et al., 2004), metiltransferasa de DNA (EhMeth) (Fisher et al., 2004) y la proteína de unión a DNA metilado (EhMLBP) (Lavi et al., 2006). Además, se han identificado las marcas epigenéticas de acetilación de lisinas (K) en las posiciones K5, K8, K12 y K16 de EhH4 y la modificación H4R3 1me, todas relacionadas con actividad transcripcional (Lozano-Amado et al., 2016). También ha sido detectada la marca epigenética de H3K27 me3, relacionada con la represión transcripcional (Foda and Singh, 2015). A pesar de la detección de marcas epigenéticas relacionadas con la metilación, la presencia de enzimas metiltransferasas (HMT) no se ha demostrado. Por tal razón, el presente estudio se enfocó en continuar la identificación y caracterización de EhPRMT1a y de las EhHKMTs iniciada en nuestro trabajo de maestría (Borbolla V. J., 2012).

Previamente se reportó la presencia *in silico* de cinco PRMTs hipotéticas (Fisk and Read, 2011). En nuestro trabajo previo (Borbolla V. J., 2012) identificamos el gen y el RNAm de la proteína EhPRMT1a (con numero de acceso EHI_105780), además se encontró un anticuerpo comercial (α -HsPRMT1) capaz de identificar a su ortólogo en *E. histolytica*. Por tal razón en el presente estudio se continuó la caracterización de EhPRMT1a. Se sabe que en eucariontes superiores la enzima PRMT1 es la encargada de la transferencia asimétrica de dos grupos metilo al residuo R3 de H4 (Strahl et al., 2001). Así mismo, las proteínas ortólogas de PRMT1 en parásitos protozoarios, como *Plasmodium falciparum*, *Trypanosoma brucei* y *Toxoplasma gondii*, también son capaces de transferir de 1 a 2 grupos metilo al residuo R3 de H4 (Dixon et al., 2010; Fan et al., 2009; Pelletier et al., 2005). Estos estudios nos indican que la función de la PRMT1 es altamente conservada en muchos organismos, incluidos los protozoarios parásitos, lo que sugiere que un sustrato específico para la EhPRMT1a de *E. histolytica* también es H4R3.

Antes de analizar la posible actividad de la EhPRMT1a se procedió a verificar si esta marca epigenética se encontraba presente en los núcleos de *E. histolytica*. Esto fue confirmado por ensayos de western blot en fracciones nucleares de trofozoítos amibianos utilizando el anticuerpo α -H4R3 me2 y por ensayos de inmunofluorescencia en trofozoítos amibianos. Los resultados confirman de manera contundente la presencia de la marca epigenética H4R3

me₂ en este microorganismo. El alineamiento de EhH4 con una H4 canónica reveló que en la posición tres no existe una arginina sino hasta la posición ocho de EhH4, por tal razón se sugiere que la R8 es equivalente a R3 de la H4 de otros organismos, y sugerimos que este residuo es el detectado por el anticuerpo comercial. Por lo tanto, proponemos que EhH4R8 me₂ es la marca equivalente a H4R3 me₂.

Posterior a la identificación de la marca epigenética, obtuvimos la proteína recombinante GST/EhPRMT1a con el objetivo de demostrar que esta enzima tiene actividad de metiltransferasa como sus ortólogas HsPRMT1 (Strahl et al., 2001), PfPRMT1 (Fan et al., 2009) y TbPRMT1 (Pelletier et al., 2005) y que además es capaz de formar oligómeros. Los resultados demostraron que la proteína EhPRMT1a recombinante es capaz de formar dímeros y tetrámeros, al igual que sus ortólogas previamente reportadas (Fan et al., 2009; Pelletier et al., 2005; Strahl et al., 2001). Por otro lado, el ensayo *in vitro* nos permitió detectar que la enzima EhPRMT1a tiene actividad de metiltransferasa para modificar tanto histonas comerciales como posiblemente histonas amibianas, como lo sugiere el ensayo donde se utilizó un extracto nuclear de *E. histolytica* enriquecido con histonas. Además, los ensayos *in vitro* sin marca radioactiva demostraron que EhPRMT1a cataliza la transferencia de metilos a H4R3. La metilación de residuos de R en las histonas tiene un profundo efecto en la expresión génica (Volkel and Angrand, 2007). En este estudio, sugerimos que EhH4R8 me₂ es una marca epigenética equivalente a la H4R3 me₂ y que esta co-localiza con EhPRMT1a, lo que sugiere fuertemente que la enzima EhPRMT1a metila a EhH4R8 *in vivo*; sin embargo, se deben realizar otros ensayos, como inmunoprecipitación de cromatina y espectrometría de masas, para confirmarlo.

Por otra parte, poco se sabe acerca de la metilación por PRMT1 en proteínas no-histonas y de su efecto biológico (Wysocka et al., 2006). En otros eucariontes PRMT1 es capaz de metilar varias proteínas no-histonas, entre las que se encuentran fibrilarina, PABPII y un homólogo de Garp1 (Fan et al., 2009; Smith et al., 2005; Yu et al., 2004). Se ha demostrado que la HsPRMT1 también metila proteínas relacionadas con el splicing alternativo y proteínas encargadas de reparar el DNA como MRE11(Wei et al., 2014). Además, la HsPRMT1 participa de manera indirecta en la formación de gránulos de estrés y cuerpos-P, debido a la metilación de RAP55A o RAP55B, las cuales están involucradas en estos eventos

(Matsumoto et al., 2012). Así mismo se conoce que HsPRMT1 y la HsCARM1 son capaces de asociarse y funcionar como un co-activador transcripcional para NF- κ B y de esta forma intervenir en la respuesta inmune (Hassa et al., 2008). Todos estos estudios indican que la función de la HsPRMT1 es sumamente amplia en núcleo y citoplasma. Dado que en el presente trabajo EhPRMT1a se localizó en el núcleo y el citoplasma de los trofozoítos de *E. histolytica* y que el silenciamiento de EhPRMT1a provocó sensibilidad al choque térmico y una disminución en la citopatogenicidad y en la migración celular de los trofozoítos, nosotros sugerimos que esta metil transferasa de arginina también podría estar involucrada en la metilación de factores transcripcionales, de proteínas relacionadas con la respuesta al choque térmico y de proteínas involucradas en la virulencia y migración celular. Sin embargo, se necesitan realizar más ensayos para confirmar esta hipótesis.

Por otro lado, la metilación de histonas en residuos de lisina (K) también actúa como una marca epigenética que puede controlar la expresión génica a través del reclutamiento de complejos proteicos que permiten la reorganización de la cromatina (Strahl et al., 2001; Volkel and Angrand, 2007). Se ha demostrado en parásitos protozoarios que la metilación en residuos de K también es relevante para la regulación génica. La expresión de los genes *var*, involucrados en la variación antigénica de *P. falcifarum*, depende de los elementos epigenéticos que son reclutados por esta modificación post-traduccional (Hakimi and Deitsch, 2007). Así mismo en *T. gondii*, la presencia de la metilación en residuos específicos de K en las histonas está asociada con la regulación del ciclo celular y de los cambios de estadio de este parásito (Dixon et al., 2010).

La mayoría de las enzimas encargadas de metilar residuos de K contienen el dominio SET en su secuencia, y son designadas como metiltransferasas de lisina (HKMTs) (Dillon et al., 2005; Volkel and Angrand, 2007). Mediante un análisis *in silico* identificamos cuatro proteínas que contienen un dominio SET en el genoma de *E. histolytica*, las cuales fueron llamadas EhHKMTs (Borbolla V. J., 2012). En este mismo estudio se confirmó la expresión de los cuatro genes a nivel de RNAm mediante ensayos de RT-PCR, pero solo se produjeron las proteínas recombinantes de EhHKMT1 y EhHKMT4 (Borbolla V. J., 2012). Para continuar la caracterización de las EhHKMTs, en el presente estudio se procedió a la obtención de las cuatro proteínas recombinantes, las cuales mostraron actividad de metiltransferasa de

histonas. Además, se encontró que EhHKMT1 cataliza *in vitro* la modificación H4K20 me₂, EhHKMT2 produce la marca H3K4 me₃ y EhHKMT4 es responsable de la marca epigenética H4K20 me₃. Estas marcas epigenéticas han sido ampliamente estudiadas, debido a que son muy conservadas y mantienen la misma función en todos los organismos en los que han sido reportadas (Hakimi and Deitsch, 2007). La marca epigenética de H3K4 3me ha sido tradicionalmente asociada con la activación transcripcional (Ardehali et al., 2011). De manera similar, se ha sugerido que esta modificación pot-traducciona está asociada con la actividad transcripcional del gen de *amebaporo-A* en trofozoítos de *E. histolytica* (Anbar et al., 2005). Por otra parte, la marca epigenética H4K20 3me está ampliamente asociada con la inactivación transcripcional (Wu and Zhang, 2014). En *T. gondii* y *P. falcifarum* se ha encontrado que la marca H4K20 me₃ está enriquecida en genes transcripcionalmente inactivos y en regiones de heterocromatina altamente condensada, como en centrómeros y telómeros (Dixon et al., 2010; Hakimi and Deitsch, 2007). A pesar del amplio estudio de las marcas epigenéticas H3K4 me₃ y H4K20 me₃ en otros organismos, su presencia no ha sido plenamente demostrada en *E. histolytica*. Por tal razón, antes de insinuar que alguna EhHKMT en particular es capaz de transferir metilos *in vivo* a estos residuos, se procedió a demostrar la presencia de estas marcas epigenéticas en los trofozoítos amibianos mediante ensayos de western blot e inmunofluorescencia utilizando anticuerpos comerciales contra estas modificaciones. Los resultados confirmaron la presencia de las marcas epigenéticas H3K4 me₃, H4K20 me₂ y H4K20 me₃ en núcleos de trofozoítos de *E. histolytica*, lo que sugiere fuertemente que estas marcas epigenéticas son catalizadas por las EhHKMTs, como indican los ensayos de actividad *in vitro*.

Para localizar a las EhHKMTs en trofozoítos amibianos, se produjeron anticuerpos contra péptidos sintéticos específicos para cada EhHKMT; sin embargo, no se obtuvieron anticuerpos específicos para EhHKMT3. Las imágenes de localización celular obtenidas por microscopia confocal y microscopía electrónica demostraron que EhHKMT1, EhHKMT2 y EhHKMT4 se localizan en núcleo y citoplasma de trofozoítos amibianos. En núcleo se sugiere que estas enzimas cumplen el rol de la metilación de histonas en residuos específicos, modificaciones que seguramente participan en la regulación de la expresión génica, mientras que en citoplasma se propone que catalicen la metilación de proteínas no-histonas. Se ha demostrado que la metilación en proteínas no-histonas ocurre principalmente

en proteínas relacionadas con la transducción de señales (Vershinin et al., 2016; Zhang and Zhang, 2015), por lo que las EhHKMTs podrían participar en eventos relacionadas con la virulencia y/o con el desarrollo del ciclo de vida del parásito.

Con el objetivo de conocer un poco acerca de la función de estas enzimas en citoplasma, se procedió a realizar ensayos de eritrofagocitosis para evaluar si la localización celular de estas metiltransferasas era modificada bajo este estímulo. Los resultados revelaron que EhHKMT2 y EhHKMT4 se relocalizan alrededor de los eritrocitos ingeridos, sugiriendo que estas enzimas están involucradas directa o indirectamente en la fagocitosis, un evento de citopatogenicidad de este parásito. La co-localización y la co-inmunoprecipitación a los 20 min de eritrofagocitosis de EhHKMT2 y EhHKMT4 con la proteína EhADH, una proteína que está relacionada con este evento (Banuelos et al., 2005; Garcia-Rivera et al., 1999; Rodriguez and Orozco, 2000), apoyan fuertemente la idea de que EhHKMT2 y EhHKMT4 pudieran participar en la fagocitosis de *E. histolytica*. Con base en estos resultados sugerimos que las EhHKMTs podrían estar involucradas en la metilación de proteínas de citoesqueleto o asociadas a proteínas que regulan la estructuración del mismo, ya que se ha reportado que este tipo de moléculas se encuentran metiladas durante la migración de la cresta neural durante el desarrollo (Vermillion et al., 2014). Sin embargo, sabemos que se requiere la realización de más experimentos para conocer los blancos de EhHKMT2 y EhHKMT4 y de su participación en la fagocitosis y virulencia de *E. histolytica*.

CONCLUSIONES

De acuerdo a los resultados obtenidos en el presente trabajo podemos concluir que:

1. La marca epigenética H4R3 me2 es equivalente a la marca de H4R8 me2 detectada en trofozoítos amibianos.
2. La proteína recombinante EhPRMT1a tiene actividad de metiltransferasa de histona y genera la -marca epigenética H4R3 me2 y posiblemente EhH4R8 me2.
3. El silenciamiento de EhPRMT1a disminuye la citopatogenicidad, migración celular y resistencia al choque térmico en los trofozoítos.
4. Las marcas epigenéticas H3K4 me3, H4K20 me2 y H4K20 me3 están presentes en trofozoítos amibianos.
5. Las enzimas recombinantes EhKMTs tiene actividad de metiltransferasa de histonas, donde EhKMT1 forma H4K20 me2; EhKMT2 produce H3K4 me3; y EhKMT4 cataliza la tri-metilación de H4K20.
6. Las enzimas EhKMT2 y EhKMT4 son reclutadas alrededor de los eritrocitos ingeridos a los 20 min de eritrofagocitosis e interaccionan con la proteína EhADH durante este evento.

PERSPECTIVAS

1. Caracterizar a las EhPRMTs restantes y determinar los residuos específicos que modifican en las histonas amibianas.
2. Determinar el efecto de las metilaciones de histonas de *E. histolytica* producidas por EhPRMTs y EhHKMTs en la expresión génica de este parásito.
3. Identificar las proteínas no-histonas que son blanco de las EhPRMTs y EhHKMTs
4. Silenciar las cuatro EhHKMTs y las restantes EhPRMTs y realizar ensayos de fenotipificación para conocer más acerca de su papel en la biología de *E. histolytica*.

BIBLIOGRAFIA

- ALberts B., B.D., Lewis J., Raff M., Roberts K., and Watson D. J. (2002). *The cells*. Omega.
- Anbar, M., Bracha, R., Nuchamowitz, Y., Li, Y., Florentin, A., and Mirelman, D. (2005). Involvement of a short interspersed element in epigenetic transcriptional silencing of the amoebapore gene in *Entamoeba histolytica*. *Eukaryotic cell* 4, 1775-1784.
- Ankri, S., Stolarsky, T., and Mirelman, D. (1998). Antisense inhibition of expression of cysteine proteinases does not affect *Entamoeba histolytica* cytopathic or haemolytic activity but inhibits phagocytosis. *Molecular microbiology* 28, 777-785.
- Ardehali, M.B., Mei, A., Zobeck, K.L., Caron, M., Lis, J.T., and Kusch, T. (2011). *Drosophila* Set1 is the major histone H3 lysine 4 trimethyltransferase with role in transcription. *The EMBO journal* 30, 2817-2828.
- Arroyo, R., and Orozco, E. (1987). Localization and identification of an *Entamoeba histolytica* adhesin. *Molecular and biochemical parasitology* 23, 151-158.
- Avalos-Padilla, Y., Betanzos, A., Javier-Reyna, R., Garcia-Rivera, G., Chavez-Munguia, B., Lagunes-Guillen, A., Ortega, J., and Orozco, E. (2015). EhVps32 Is a Vacuole-Associated Protein Involved in Pinocytosis and Phagocytosis of *Entamoeba histolytica*. *PLoS pathogens* 11, e1005079.
- Baez-Camargo, M., Riveron, A.M., Delgadillo, D.M., Flores, E., Sanchez, T., Garcia-Rivera, G., and Orozco, E. (1996). *Entamoeba histolytica*: gene linkage groups and relevant features of its karyotype. *Molecular & general genetics : MGG* 253, 289-296.
- Bailey, G.B., Gilmour, J.R., and McCoomer, N.E. (1990). Roles of target cell membrane carbohydrate and lipid in *Entamoeba histolytica* interaction with mammalian cells. *Infection and immunity* 58, 2389-2391.
- Banuelos, C., Garcia-Rivera, G., Lopez-Reyes, I., and Orozco, E. (2005). Functional characterization of EhADH112: an *Entamoeba histolytica* Bro1 domain-containing protein. *Experimental parasitology* 110, 292-297.
- Baxt, L.A., Rastew, E., Bracha, R., Mirelman, D., and Singh, U. (2010). Downregulation of an *Entamoeba histolytica* rhomboid protease reveals roles in regulating parasite adhesion and phagocytosis. *Eukaryotic cell* 9, 1283-1293.
- Bedford, M.T., and Clarke, S.G. (2009). Protein arginine methylation in mammals: who, what, and why. *Molecular cell* 33, 1-13.
- Berg M. J., S.L., Tymoczko L. J., (2008). *Biouqimica*. Reverte.
- Bhattacharya, A., Satish, S., Bagchi, A., and Bhattacharya, S. (2000). The genome of *Entamoeba histolytica*. *International journal for parasitology* 30, 401-410.
- Binder, M., Ortner, S., Plaimauer, B., Fodinger, M., Wiedermann, G., Scheiner, O., and Duchene, M. (1995). Sequence and organization of an unusual histone H4 gene in the human parasite *Entamoeba histolytica*. *Molecular and biochemical parasitology* 71, 243-247.
- Boettner, D.R., and Petri, W.A. (2005). *Entamoeba histolytica* activates host cell caspases during contact-dependent cell killing. *Current topics in microbiology and immunology* 289, 175-184.
- Borbolla V. J. (2012). Identificación y parcial caracterización de metiltransferasa de histonas en *Entamoeba histolytica*. Tesis de maestría, CINVESTAV.
- Boros, J., Arnoult, N., Stroobant, V., Collet, J.F., and Decottignies, A. (2014). Polycomb repressive complex 2 and H3K27me3 cooperate with H3K9 methylation to maintain heterochromatin protein 1alpha at chromatin. *Molecular and cellular biology* 34, 3662-3674.

- Bougdour, A., Sautel, C.F., Cannella, D., Braun, L., and Hakimi, M.A. (2008). *Toxoplasma gondii* gene expression is under the control of regulatory pathways acting through chromatin structure. *Parasite* 15, 206-210.
- Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry* 72, 248-254.
- Brahms, H., Meheus, L., de Brabandere, V., Fischer, U., and Luhrmann, R. (2001). Symmetrical dimethylation of arginine residues in spliceosomal Sm protein B/B' and the Sm-like protein LSm4, and their interaction with the SMN protein. *RNA* 7, 1531-1542.
- Calixto-Galvez, M., Romero-Diaz, M., Garcia-Munoz, A., Salas-Casas, A., Pais-Morales, J., Galvan, I.J., Orozco, E., and Rodriguez, M.A. (2011). Identification of a polypeptide containing Tudor and staphylococcal nuclease-like domains as the sequence-specific binding protein to the upstream regulatory element 1 of *Entamoeba histolytica*. *International journal for parasitology* 41, 775-782.
- Castanon-Sanchez, C.A., Luna-Arias, J.P., de Dios-Bravo, M.G., Herrera-Aguirre, M.E., Olivares-Trejo, J.J., Orozco, E., and Hernandez, J.M. (2010). *Entamoeba histolytica*: a unicellular organism containing two active genes encoding for members of the TBP family. *Protein expression and purification* 70, 48-59.
- Croken, M.M., Nardelli, S.C., and Kim, K. (2012). Chromatin modifications, epigenetics, and how protozoan parasites regulate their lives. *Trends in parasitology* 28, 202-213.
- Cui, L., Fan, Q., and Miao, J. (2008). Histone lysine methyltransferases and demethylases in *Plasmodium falciparum*. *International journal for parasitology* 38, 1083-1097.
- Cui, L., and Miao, J. (2010). Chromatin-mediated epigenetic regulation in the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Eukaryotic cell* 9, 1138-1149.
- Cheng, X., Collins, R.E., and Zhang, X. (2005). Structural and sequence motifs of protein (histone) methylation enzymes. *Annual review of biophysics and biomolecular structure* 34, 267-294.
- Chevallet, M., Luche, S., and Rabilloud, T. (2006). Silver staining of proteins in polyacrylamide gels. *Nature protocols* 1, 1852-1858.
- Dalmaso, M.C., Sullivan, W.J., Jr., and Angel, S.O. (2011). Canonical and variant histones of protozoan parasites. *Front Biosci (Landmark Ed)* 16, 2086-2105.
- Dhar, S.K., Choudhury, N.R., Bhattacharaya, A., and Bhattacharya, S. (1995). A multitude of circular DNAs exist in the nucleus of *Entamoeba histolytica*. *Molecular and biochemical parasitology* 70, 203-206.
- Diamond, L.S., Harlow, D.R., and Cunnick, C.C. (1978). A new medium for the axenic cultivation of *Entamoeba histolytica* and other *Entamoeba*. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 72, 431-432.
- Dillon, S.C., Zhang, X., Trievel, R.C., and Cheng, X. (2005). The SET-domain protein superfamily: protein lysine methyltransferases. *Genome biology* 6, 227.
- Dixon, S.E., Stilger, K.L., Elias, E.V., Naguleswaran, A., and Sullivan, W.J., Jr. (2010). A decade of epigenetic research in *Toxoplasma gondii*. *Molecular and biochemical parasitology* 173, 1-9.
- Fan, Q., An, L., and Cui, L. (2004). *Plasmodium falciparum* histone acetyltransferase, a yeast GCN5 homologue involved in chromatin remodeling. *Eukaryotic cell* 3, 264-276.
- Fan, Q., Miao, J., Cui, L., and Cui, L. (2009). Characterization of PRMT1 from *Plasmodium falciparum*. *The Biochemical journal* 421, 107-118.
- Fernández, R.J. (2007). Estudio molecular y funcional del factor del corte del pre-RNAm EhCFIm de *E. histolytica*. Tesis de Maestría, CINVESTAV.
- Fisher, O., Siman-Tov, R., and Ankri, S. (2004). Characterization of cytosine methylated regions and 5-cytosine DNA methyltransferase (Ehmeth) in the protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. *Nucleic acids research* 32, 287-297.

- Fisk, J.C., and Read, L.K. (2011). Protein arginine methylation in parasitic protozoa. *Eukaryotic cell* 10, 1013-1022.
- Foda, B.M., and Singh, U. (2015). Dimethylated H3K27 Is a Repressive Epigenetic Histone Mark in the Protist *Entamoeba histolytica* and Is Significantly Enriched in Genes Silenced via the RNAi Pathway. *The Journal of biological chemistry* 290, 21114-21130.
- French, J.B., Cen, Y., and Sauve, A.A. (2008). *Plasmodium falciparum* Sir2 is an NAD⁺-dependent deacetylase and an acetyllysine-dependent and acetyllysine-independent NAD⁺ glycohydrolase. *Biochemistry* 47, 10227-10239.
- Garcia-Rivera, G., Rodriguez, M.A., Ocadiz, R., Martinez-Lopez, M.C., Arroyo, R., Gonzalez-Robles, A., and Orozco, E. (1999). *Entamoeba histolytica* : a novel cysteine protease and an adhesin form the 112 kDa surface protein. *Molecular microbiology* 33, 556-568.
- Gilchrist, C.A., Holm, C.F., Hughes, M.A., Schaeffer, J.M., Mann, B.J., and Petri, W.A., Jr. (2001). Identification and characterization of an *Entamoeba histolytica* upstream regulatory element 3 sequence-specific DNA-binding protein containing EF-hand motifs. *The Journal of biological chemistry* 276, 11838-11843.
- Godbold, G.D., and Mann, B.J. (1998). Involvement of the actin cytoskeleton and p21rho-family GTPases in the pathogenesis of the human protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. *Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas / Sociedade Brasileira de Biofisica ... [et al.]* 31, 1049-1058.
- Gomez, C., Perez, D.G., Lopez-Bayghen, E., and Orozco, E. (1998). Transcriptional analysis of the EhPgp1 promoter of *Entamoeba histolytica* multidrug-resistant mutant. *The Journal of biological chemistry* 273, 7277-7284.
- Goodrich, J.A., Cutler, G., and Tjian, R. (1996). Contacts in context: promoter specificity and macromolecular interactions in transcription. *Cell* 84, 825-830.
- Grant, P.A. (2001). A tale of histone modifications. *Genome biology* 2, REVIEWS0003.
- Guillen, N., Carlier, M.F., Brugerolle, G., Tardieux, I., and Ausseil, J. (1998). [Cytoskeletal actin and its associated proteins. Some examples in Protista]. *Parasite* 5, 107-117.
- Hakimi, M.A., and Deitsch, K.W. (2007). Epigenetics in Apicomplexa: control of gene expression during cell cycle progression, differentiation and antigenic variation. *Current opinion in microbiology* 10, 357-362.
- Hamamoto, R., Saloura, V., and Nakamura, Y. (2015). Critical roles of non-histone protein lysine methylation in human tumorigenesis. *Nature reviews. Cancer* 15, 110-124.
- Haque, R., Roy, S., Siddique, A., Mondal, U., Rahman, S.M., Mondal, D., Houpt, E., and Petri, W.A., Jr. (2007). Multiplex real-time PCR assay for detection of *Entamoeba histolytica*, *Giardia intestinalis*, and *Cryptosporidium* spp. *The American journal of tropical medicine and hygiene* 76, 713-717.
- Hassa, P.O., Covic, M., Bedford, M.T., and Hottiger, M.O. (2008). Protein arginine methyltransferase 1 coactivates NF-kappaB-dependent gene expression synergistically with CARM1 and PARP1. *Journal of molecular biology* 377, 668-678.
- Huguenin, M., Bracha, R., Chookajorn, T., and Mirelman, D. (2010). Epigenetic transcriptional gene silencing in *Entamoeba histolytica*: insight into histone and chromatin modifications. *Parasitology* 137, 619-627.
- Iizuka, M., and Smith, M.M. (2003). Functional consequences of histone modifications. *Current opinion in genetics & development* 13, 154-160.
- Jeffers, V., and Sullivan, W.J., Jr. (2012). Lysine acetylation is widespread on proteins of diverse function and localization in the protozoan parasite *Toxoplasma gondii*. *Eukaryotic cell* 11, 735-742.
- Jenuwein, T., and Allis, C.D. (2001). Translating the histone code. *Science* 293, 1074-1080.

Joshi, M.B., Lin, D.T., Chiang, P.H., Goldman, N.D., Fujioka, H., Aikawa, M., and Syin, C. (1999). Molecular cloning and nuclear localization of a histone deacetylase homologue in *Plasmodium falciparum*. *Molecular and biochemical parasitology* 99, 11-19.

Juven-Gershon, T., and Kadonaga, J.T. (2010). Regulation of gene expression via the core promoter and the basal transcriptional machinery. *Developmental biology* 339, 225-229.

Khorasanizadeh, S. (2004). The nucleosome: from genomic organization to genomic regulation. *Cell* 116, 259-272.

Labruyere, E., Zimmer, C., Galy, V., Olivo-Marin, J.C., and Guillen, N. (2003). EhPAK, a member of the p21-activated kinase family, is involved in the control of *Entamoeba histolytica* migration and phagocytosis. *Journal of cell science* 116, 61-71.

Lavi, T., Isakov, E., Harony, H., Fisher, O., Siman-Tov, R., and Ankri, S. (2006). Sensing DNA methylation in the protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. *Molecular microbiology* 62, 1373-1386.

Leippe, M. (1997). Amoebapores. *Parasitol Today* 13, 178-183.

Leippe, M., Ebel, S., Schoenberger, O.L., Horstmann, R.D., and Muller-Eberhard, H.J. (1991). Pore-forming peptide of pathogenic *Entamoeba histolytica*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 88, 7659-7663.

Levine, M., and Tjian, R. (2003). Transcription regulation and animal diversity. *Nature* 424, 147-151.

Lewin B. (2008). *Genes IX*. McGrawHill.

Lioutas, C., Schmetz, C., and Tannich, E. (1995). Identification of various circular DNA molecules in *Entamoeba histolytica*. *Experimental parasitology* 80, 349-352.

Loftus, B., Anderson, I., Davies, R., Alsmark, U.C., Samuelson, J., Amedeo, P., Roncaglia, P., Berriman, M., Hirt, R.P., Mann, B.J., *et al.* (2005). The genome of the protist parasite *Entamoeba histolytica*. *Nature* 433, 865-868.

Lopez R.I. (2010). Análisis de la expresión del RNAm de los genes que forman la maquinaria ESCRT en *Entamoeba histolytica* y caracterización funcional de la proteína EhVps4, . Tesis de Doctorado, CINVESTAV. .

Lozano-Amado, D., Herrera-Solorio, A.M., Valdes, J., Aleman-Lazarini, L., Almaraz-Barrera Mde, J., Luna-Rivera, E., Vargas, M., and Hernandez-Rivas, R. (2016). Identification of repressive and active epigenetic marks and nuclear bodies in *Entamoeba histolytica*. *Parasites & vectors* 9, 19.

Lukong, K.E., and Richard, S. (2004). Arginine methylation signals mRNA export. *Nature structural & molecular biology* 11, 914-915.

Luna-Arias, J.P., Hernandez-Rivas, R., de Dios-Bravo, G., Garcia, J., Mendoza, L., and Orozco, E. (1999). The TATA-box binding protein of *Entamoeba histolytica*: cloning of the gene and location of the protein by immunofluorescence and confocal microscopy. *Microbiology* 145 (Pt 1), 33-40.

Marion, S., Tavares, P., Arhets, P., and Guillen, N. (2004). Signal transduction through the Gal-GalNAc lectin of *Entamoeba histolytica* involves a spectrin-like protein. *Molecular and biochemical parasitology* 135, 31-38.

Marquez-Monter, H., Becker, I., and Carrillo-Farga, J. (1990). Mitosis and polykaryon formation of *Entamoeba histolytica* in axenic cultures. *Archivos de investigacion medica* 21 Suppl 1, 69-73.

Matsumoto, K., Nakayama, H., Yoshimura, M., Masuda, A., Dohmae, N., Matsumoto, S., and Tsujimoto, M. (2012). PRMT1 is required for RAP55 to localize to processing bodies. *RNA biology* 9, 610-623.

McBride, A.E., Weiss, V.H., Kim, H.K., Hogle, J.M., and Silver, P.A. (2000). Analysis of the yeast arginine methyltransferase Hmt1p/Rmt1p and its in vivo function. Cofactor binding and substrate interactions. *The Journal of biological chemistry* 275, 3128-3136.

Mendoza, L., Orozco, E., Rodriguez, M.A., Garcia-Rivera, G., Sanchez, T., Garcia, E., and Gariglio, P. (2003). Ehp53, an *Entamoeba histolytica* protein, ancestor of the mammalian tumour suppressor p53. *Microbiology* 149, 885-893.

- Meza, I. (2000). Extracellular matrix-induced signaling in *Entamoeba histolytica*: its role in invasiveness. *Parasitol Today* 16, 23-28.
- Miao, J., Fan, Q., Cui, L., Li, X., Wang, H., Ning, G., and Reese, J.C. (2010). The MYST family histone acetyltransferase regulates gene expression and cell cycle in malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Molecular microbiology* 78, 883-902.
- Nakada-Tsukui, K., Saito-Nakano, Y., Husain, A., and Nozaki, T. (2010). Conservation and function of Rab small GTPases in *Entamoeba*: annotation of *E. invadens* Rab and its use for the understanding of *Entamoeba* biology. *Experimental parasitology* 126, 337-347.
- Nozaki, T., and Nakada-Tsukui, K. (2006). Membrane trafficking as a virulence mechanism of the enteric protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. *Parasitology research* 98, 179-183.
- Ocadiz-Ruiz, R., Fonseca, W., Linford, A.S., Yoshino, T.P., Orozco, E., and Rodriguez, M.A. (2016). The knockdown of each component of the cysteine proteinase-adhesin complex of *Entamoeba histolytica* (EhCPADH) affects the expression of the other complex element as well as the in vitro and in vivo virulence. *Parasitology* 143, 50-59.
- Ocadiz, R., Orozco, E., Carrillo, E., Quintas, L.I., Ortega-Lopez, J., Garcia-Perez, R.M., Sanchez, T., Castillo-Juarez, B.A., Garcia-Rivera, G., and Rodriguez, M.A. (2005). EhCP112 is an *Entamoeba histolytica* secreted cysteine protease that may be involved in the parasite-virulence. *Cellular microbiology* 7, 221-232.
- Olivos-Garcia, A., Tello, E., Nequiz-Avendano, M., Gonzalez-Canto, A., Lopez-Vancell, R., Garcia de Leon, M.C., Montfort, I., and Perez-Tamayo, R. (2004). Cysteine proteinase activity is required for survival of the parasite in experimental acute amoebic liver abscesses in hamsters. *Parasitology* 129, 19-25.
- Orozco, E., Gharaibeh, R., Riveron, A.M., Delgadillo, D.M., Mercado, M., Sanchez, T., Gomez Conde, E., Vargas, M.A., and Lopez-Revilla, R. (1997). A novel cytoplasmic structure containing DNA networks in *Entamoeba histolytica* trophozoites. *Molecular & general genetics : MGG* 254, 250-257.
- Orozco, E., Guarneros, G., Martinez-Palomo, A., and Sanchez, T. (1983). *Entamoeba histolytica*. Phagocytosis as a virulence factor. *The Journal of experimental medicine* 158, 1511-1521.
- Orozco, E., Rodriguez, M.A., Murphy, C.F., Salata, R.A., Petri, W.A., Smith, R.D., and Ravdin, J.I. (1987). *Entamoeba histolytica*: cytopathogenicity and lectin activity of avirulent mutants. *Experimental parasitology* 63, 157-165.
- Pearson, R.J., and Singh, U. (2010). Approaches to characterizing *Entamoeba histolytica* transcriptional regulation. *Cellular microbiology* 12, 1681-1690.
- Pelletier, M., Pasternack, D.A., and Read, L.K. (2005). In vitro and in vivo analysis of the major type I protein arginine methyltransferase from *Trypanosoma brucei*. *Molecular and biochemical parasitology* 144, 206-217.
- Perez, D.G., Gomez, C., Lopez-Bayghen, E., Tannich, E., and Orozco, E. (1998). Transcriptional analysis of the EhPgp5 promoter of *Entamoeba histolytica* multidrug-resistant mutant. *The Journal of biological chemistry* 273, 7285-7292.
- Purdy, J.E., Pho, L.T., Mann, B.J., and Petri, W.A., Jr. (1996). Upstream regulatory elements controlling expression of the *Entamoeba histolytica* lectin. *Molecular and biochemical parasitology* 78, 91-103.
- Que, X., and Reed, S.L. (2000). Cysteine proteinases and the pathogenesis of amebiasis. *Clinical microbiology reviews* 13, 196-206.
- Ramakrishnan, G., Gilchrist, C.A., Musa, H., Torok, M.S., Grant, P.A., Mann, B.J., and Petri, W.A., Jr. (2004). Histone acetyltransferases and deacetylase in *Entamoeba histolytica*. *Molecular and biochemical parasitology* 138, 205-216.

Ramakrishnan, G., Ragland, B.D., Purdy, J.E., and Mann, B.J. (1996). Physical mapping and expression of gene families encoding the N-acetyl D-galactosamine adherence lectin of *Entamoeba histolytica*. *Molecular microbiology* *19*, 91-100.

Rea, S., Eisenhaber, F., O'Carroll, D., Strahl, B.D., Sun, Z.W., Schmid, M., Opravil, S., Mechtler, K., Ponting, C.P., Allis, C.D., and Jenuwein, T. (2000). Regulation of chromatin structure by site-specific histone H3 methyltransferases. *Nature* *406*, 593-599.

Rice, J.C., and Allis, C.D. (2001). Code of silence. *Nature* *414*, 258-261.

Riveron, A.M., Lopez-Canovas, L., Baez-Camargo, M., Flores, E., Perez-Perez, G., Luna-Arias, J.P., and Orozco, E. (2000). Circular and linear DNA molecules in the *Entamoeba histolytica* complex molecular karyotype. *European biophysics journal : EBJ* *29*, 48-56.

Rodriguez, M.A., and Orozco, E. (2000). Characterization of the EhRabB recombinant protein of *Entamoeba histolytica*. *Archives of medical research* *31*, S171-172.

Roque, C. (2007). Estudios estructurales y caracterización de la unión al DNA del dominio C-terminal de la H1 efecto de la fosforilación. Tesis de Doctorado, Facultad de Biociencias Universidad Autónoma de Barcelona.

Rudenko, G. (2010). Epigenetics and transcriptional control in African trypanosomes. *Essays in biochemistry* *48*, 201-219.

Saito-Nakano, Y., Yasuda, T., Nakada-Tsukui, K., Leippe, M., and Nozaki, T. (2004). Rab5-associated vacuoles play a unique role in phagocytosis of the enteric protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. *The Journal of biological chemistry* *279*, 49497-49507.

Saksouk, N., Bhatti, M.M., Kieffer, S., Smith, A.T., Musset, K., Garin, J., Sullivan, W.J., Jr., Cesbron-Delauw, M.F., and Hakimi, M.A. (2005). Histone-modifying complexes regulate gene expression pertinent to the differentiation of the protozoan parasite *Toxoplasma gondii*. *Molecular and cellular biology* *25*, 10301-10314.

Santi-Rocca, J., Weber, C., Guigon, G., Sismeiro, O., Coppee, J.Y., and Guillen, N. (2008). The lysine- and glutamic acid-rich protein KERP1 plays a role in *Entamoeba histolytica* liver abscess pathogenesis. *Cellular microbiology* *10*, 202-217.

Segovia-Gamboa, N.C., Talamas-Rohana, P., Angel-Martinez, A., Cazares-Raga, F.E., Gonzalez-Robles, A., Hernandez-Ramirez, V.I., Martinez-Palomo, A., and Chavez-Munguia, B. (2011). Differentiation of *Entamoeba histolytica*: a possible role for enolase. *Experimental parasitology* *129*, 65-71.

Singh, R.S., Walia, A.K., Kanwar, J.R., and Kennedy, J.F. (2016). Amoebiasis vaccine development: A snapshot on *E. histolytica* with emphasis on perspectives of Gal/GalNAc lectin. *International journal of biological macromolecules*.

Smith, A.T., Tucker-Samaras, S.D., Fairlamb, A.H., and Sullivan, W.J., Jr. (2005). MYST family histone acetyltransferases in the protozoan parasite *Toxoplasma gondii*. *Eukaryotic cell* *4*, 2057-2065.

Stanley, S.L., Jr. (2003). Amoebiasis. *Lancet* *361*, 1025-1034.

Stanley, S.L., Jr., and Reed, S.L. (2001). Microbes and microbial toxins: paradigms for microbial-mucosal interactions. VI. *Entamoeba histolytica*: parasite-host interactions. *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology* *280*, G1049-1054.

Strahl, B.D., and Allis, C.D. (2000). The language of covalent histone modifications. *Nature* *403*, 41-45.

Strahl, B.D., Briggs, S.D., Brame, C.J., Caldwell, J.A., Koh, S.S., Ma, H., Cook, R.G., Shabanowitz, J., Hunt, D.F., Stallcup, M.R., and Allis, C.D. (2001). Methylation of histone H4 at arginine 3 occurs in vivo and is mediated by the nuclear receptor coactivator PRMT1. *Current biology : CB* *11*, 996-1000.

Sullivan Jr, W.J., Smith, A.T., and Joyce, B.R. (2009). Understanding mechanisms and the role of differentiation in pathogenesis of *Toxoplasma gondii*: a review. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* *104*, 155-161.

Torres-Guerrero, H., Peattie, D.A., and Meza, I. (1991). Chromatin organization in *Entamoeba histolytica*. *Molecular and biochemical parasitology* 45, 121-130.

Tovy, A., and Ankri, S. (2010). Epigenetics in the unicellular parasite *Entamoeba histolytica*. *Future microbiology* 5, 1875-1884.

Tovy, A., Siman Tov, R., Gaentzsch, R., Helm, M., and Ankri, S. (2010). A new nuclear function of the *Entamoeba histolytica* glycolytic enzyme enolase: the metabolic regulation of cytosine-5 methyltransferase 2 (Dnmt2) activity. *PLoS pathogens* 6, e1000775.

Trelle, M.B., Salcedo-Amaya, A.M., Cohen, A.M., Stunnenberg, H.G., and Jensen, O.N. (2009). Global histone analysis by mass spectrometry reveals a high content of acetylated lysine residues in the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Journal of proteome research* 8, 3439-3450.

Vaquero, A., Loyola, A., and Reinberg, D. (2003). The constantly changing face of chromatin. *Science of aging knowledge environment : SAGE KE* 2003, RE4.

Vermillion, K.L., Lidberg, K.A., and Gammill, L.S. (2014). Expression of actin-binding proteins and requirement for actin-depolymerizing factor in chick neural crest cells. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists* 243, 730-738.

Vershinin, Z., Feldman, M., Chen, A., and Levy, D. (2016). PAK4 Methylation by SETD6 Promotes the Activation of the Wnt/beta-Catenin Pathway. *The Journal of biological chemistry* 291, 6786-6795.

Volkel, P., and Angrand, P.O. (2007). The control of histone lysine methylation in epigenetic regulation. *Biochimie* 89, 1-20.

Volz, J.C., Bartfai, R., Petter, M., Langer, C., Josling, G.A., Tsuboi, T., Schwach, F., Baum, J., Rayner, J.C., Stunnenberg, H.G., *et al.* (2012). PfSET10, a *Plasmodium falciparum* methyltransferase, maintains the active var gene in a poised state during parasite division. *Cell host & microbe* 11, 7-18.

Wei, H.M., Hu, H.H., Chang, G.Y., Lee, Y.J., Li, Y.C., Chang, H.H., and Li, C. (2014). Arginine methylation of the cellular nucleic acid binding protein does not affect its subcellular localization but impedes RNA binding. *FEBS letters* 588, 1542-1548.

Welter, B.H., and Temesvari, L.A. (2009). Overexpression of a mutant form of EhRabA, a unique Rab GTPase of *Entamoeba histolytica*, alters endoplasmic reticulum morphology and localization of the Gal/GalNAc adherence lectin. *Eukaryotic cell* 8, 1014-1026.

Willhoeft, U., Buss, H., and Tannich, E. (1999). Analysis of cDNA expressed sequence tags from *Entamoeba histolytica*: identification of two highly abundant polyadenylated transcripts with no overt open reading frames. *Protist* 150, 61-70.

Wright, J.R., Siegel, T.N., and Cross, G.A. (2010). Histone H3 trimethylated at lysine 4 is enriched at probable transcription start sites in *Trypanosoma brucei*. *Molecular and biochemical parasitology* 172, 141-144.

Wu, H., and Zhang, Y. (2014). Reversing DNA methylation: mechanisms, genomics, and biological functions. *Cell* 156, 45-68.

Wysocka, J., Swigut, T., Xiao, H., Milne, T.A., Kwon, S.Y., Landry, J., Kauer, M., Tackett, A.J., Chait, B.T., Badenhorst, P., *et al.* (2006). A PHD finger of NURF couples histone H3 lysine 4 trimethylation with chromatin remodelling. *Nature* 442, 86-90.

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

Yu, M.C., Bachand, F., McBride, A.E., Komili, S., Casolari, J.M., and Silver, P.A. (2004). Arginine methyltransferase affects interactions and recruitment of mRNA processing and export factors. *Genes & development* 18, 2024-2035.

Zhang, X., and Ho, S.M. (2011). Epigenetics meets endocrinology. *Journal of molecular endocrinology* 46, R11-32.

Zhang, X., Tanaka, K., Yan, J., Li, J., Peng, D., Jiang, Y., Yang, Z., Barton, M.C., Wen, H., and Shi, X. (2013). Regulation of estrogen receptor alpha by histone methyltransferase SMYD2-mediated protein

methylation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *110*, 17284-17289.

Zhang, Y., and Reinberg, D. (2001). Transcription regulation by histone methylation: interplay between different covalent modifications of the core histone tails. *Genes & development* *15*, 2343-2360.

Zhang, Z., and Zhang, R. (2015). Epigenetics in autoimmune diseases: Pathogenesis and prospects for therapy. *Autoimmunity reviews* *14*, 854-863.

APÉNDICE