



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

**UNIDAD ZACATENCO  
DEPARTAMENTO DE INFECTÓMICA Y PATOGÉNESIS MOLECULAR**

**“La proteína multifuncional Tudor Staphylococcal Nuclease de *Entamoeba histolytica*  
participa en transcripción, metabolismo, señalización y respuesta al estrés”**

**TESIS**

**Que presenta:**

M. en C. Gilberto Javier Cázares Apátiga

**Para obtener el grado de  
DOCTOR EN CIENCIAS**

**En**

Infectómica y Patogénesis Molecular

**Directores de Tesis:**

Dr. Mario Alberto Rodríguez Rodríguez

Dra. María Esther Orozco Orozco

Ciudad de México, D. F.

Enero, 2017

**El presente trabajo fue desarrollado en el laboratorio 2 del departamento de Infectómica y Patogénesis Molecular del Centro de Investigación y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV) bajo la dirección del Dr. Mario Alberto Rodríguez Rodríguez y la Dra. María Esther Orozco Orozco y con el apoyo financiero CONACYT con número de registro 370230**

## **DEDICATORIAS**

**Con gran admiración a mis padres.**

**Rosario Apátiga Morales y Gilberto Javier Casares Sánchez**

**Mis hermanas y sobrinos**

**Vannesa, Iliana, Rolando, Ani, Kas, Uri, Eder y Leo.**

**A mi tío y mis primos**

**Hugo Carlos Cázares Sánchez, Carla y Carir**

**A mi abuelita Paulita y mi tía Soco**

**A todos mis amigos queridos que me acompañaron en este viaje, especialmente a ti Víctor.**

**Abel, Cinthia, Marta, Marco, Emilio, Rafa, Chris, Tania.**

## **AGRADECIMIENTOS**

**Al Dr. Mario Alberto Rodríguez Rodríguez**, por haberme guiado a lo largo de mi formación científica, su confianza, paciencia y respeto.

A mis asesores.

**Dra. María Esther Orozco Orozco**

**Dra. Elisa Irene Azuara Liceaga**

**Dr. Fidel de la Cruz Hernández Hernández**

**Dr. José Efraín Garrido Guerrero**

**Dr. José Luis Rosales Encina**

Por el apoyo brindado para la finalización de este proyecto.

A mis compañeros del laboratorio.

Carlitos por sus consejos, paciencia y apoyo a lo largo de 6 años de amistad.

Mario por la amistad y apoyo durante este tiempo.

Martita siempre un gran apoyo.

Aaron, Tania, Christian, Ramón, Sussy, Arturo.

**Y a todas la personas que me apoyaron en el desarrollo de este proyecto.**

## CONTENIDO

	Página
<b>I. ABREVIATURAS</b>	i
<b>II. LISTA DE TABLAS</b>	iii
<b>III. LISTA DE FIGURAS</b>	iv
<b>IV. RESUMEN</b>	V
<b>V. ABSTRAC</b>	vi
<b>1. ANTECEDENTES GENERALES</b>	1
1.1. Amibiasis y su epidemiología	1
1.2. Taxonomía y genoma	4
1.3. Ciclo de vida y patogénesis	5
1.4. Mecanismos patogénicos de <i>E. Histolytica</i>	8
<b>2. ANTECEDENTES PARTICULARES</b>	13
2.1. Regulación de la expresión génica de <i>E. Histolytica</i>	13
2.2. Tudor Staphylococcal Nuclease	16
2.3. Tudor Staphylococcal Nuclease de <i>E. histolytica</i>	19
<b>3. JUSTIFICACIÓN</b>	24
<b>4. HIPÓTESIS</b>	25
<b>5. OBJETIVO</b>	26
5.1. OBJETIVOS PARTICULARES	26
<b>6. DISEÑO EXPERIMENTAL</b>	27

<b>7. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	28
7.1 cultivo de <i>E. histolytica</i>	28
7.2. Inmunolocalización de EhTSN por microscopia electrónica de transmisión	28
7.3. Extracción de proteínas	29
7.4. Ensayos de Western blot	30
7.5. Ensayos de cambio de movilidad electroforética (EMSA)	31
7.6. Ensayos de inmunoprecipitación	31
7.7. Ensayos de inmunolocalización	32
7.8. Ensayos de Pull-down	33
7.9. Espectrometría de masas LC-MS/MS	34
7.10. Evaluación de los datos obtenidos en la espectrometría de masas	35
7.11. Análisis bioinformáticos	36
<b>8. RESULTADOS</b>	37
8.1. EhTSN se localiza en diferentes compartimentos celulares	37
8.2. EhTSN citoplasmática y nuclear interaccionan con el DNA	40
8.3. EhTSN interacciona con la RNA polimerasa II (EhRNAPol II) y con una metiltransferasa de argininas (EhPRMT-A)	45
8.4. EhTSN se asocia a diferentes proteínas involucradas en diferentes procesos celulares	47
8.5. EhTSN interacciona con la enzima piruvato:ferredoxina oxidoreductasa de <i>E. histolytica</i> (EhPFO)	53
8.6. EhTSN interacciona con la proteína 14-3-3	55
8.7. EhTSN se relocaliza en gránulos durante el choque térmico	57
<b>9. DISCUSIÓN</b>	59
<b>10. CONCLUSIONES</b>	67

<b>11. PERSPECTIVAS</b>	<b>68</b>
<b>12. BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>69</b>
<b>13. APÉNDICE</b>	<b>82</b>

## I. ABREVIATURAS

<b>ATP</b>	Adenosin trifosfato
<b>BSA</b>	Albúmina sérica bovina
<b>CP</b>	Cisteín proteinasa
<b>CRD</b>	Dominio de reconocimiento de carbohidratos
<b>C2PK</b>	Proteína cinasa
<b>°C</b>	Grados centígrados
<b>DAPI</b>	4',6-Diamidino-2-fenilindol diclorhidrato
<b>DNA</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>DO</b>	Densidad óptica
<b>EDTA</b>	Ácido etilendiamino tetracético
<b>EhCPADH112</b>	Complejo proteico de <i>E. histolytica</i> formado por una cisteína proteasa y una adhesina
<b><i>EhrabB</i></b>	Gen que codifica para la GTPasa RabB de <i>Entamoeba histolytica</i>
<b>EhRabB</b>	GTPasa de <i>Entamoeba histolytica</i>
<b>h</b>	Hora
<b>kb</b>	Kilobases
<b>kDa</b>	Kilodaltones
<b>LB</b>	Medio Luria-Brouth
<b>MAC</b>	Complejo de ataque a la membrana
<b>µg</b>	Microgramos
<b>µl</b>	Microlitros
<b>µm</b>	Micrometros
<b>min</b>	Minuto
<b>ml</b>	Mililitros
<b>ng</b>	Nanogramo
<b>ORI</b>	Origen de replicación
<b>pb</b>	Pares de bases
<b>PBS</b>	Solución amortiguadora salina de fosfatos
<b>RNA</b>	Ácido ribonucleico
<b>RNA pol II</b>	RNA polimerasa II



<b>RNA<sub>m</sub></b>	RNA mensajero
<b>RNA<sub>t</sub></b>	RNA de transferencia
<b>rpm</b>	Revoluciones por minuto
<b>s</b>	Segundos
<b>TBP</b>	Del inglés “TATA Binding Protein”
<b>FT</b>	Factor de transcripción
<b>TSN</b>	Tudor Staphylococcal Nuclease
<b>TYI</b>	Medio de tripticasa, extracto de levadura, hierro y suero bovino para el cultivo de <i>Entamoeba histolytica</i> .
<b>UI</b>	Unidades internacionales
<b>URE1</b>	Del inglés “Upstream Regulatory Element 1”
<b>V</b>	Volt
<b>x g</b>	Gravedades

## II. LISTA DE TABLAS

	<b>Página</b>
<b>Tabla 1</b> Casos de amibiasis nuevos y tasa de incidencia en los Estados unidos Mexicanos por entidad federativa (2011)	3
<b>Tabla 2</b> Factores de transcripción representativos de <i>E. histolytica</i>	15
<b>Tabla 3</b> Genes que contienen el motivo URE1 en su región promotora	38
<b>Tabla 4</b> Identificación de proteínas asociadas a rEhTSN en <i>E. histolytica</i>	50

### III. LISTA DE FIGURAS

		<b>Página</b>
<b>Figura 1</b>	Morfología de <i>Entamoeba histolytica</i>	6
<b>Figura 2</b>	Ciclo de vida de <i>Entamoeba histolytica</i>	7
<b>Figura 3</b>	Microscopía electrónica de barrido de amibiasis intestinal experimental en cuyos	9
<b>Figura 4</b>	Composición y estructura terciaria de TSN	17
<b>Figura 5</b>	Esquema de la organización de la proteína de unión a URE1 de <i>Entamoeba histolytica</i> (EhTSN)	21
<b>Figura 6</b>	Inmunolocalización subcelular de la proteína EhTSN	22
<b>Figura 7</b>	Unión de EhTSN al motivo URE1	23
<b>Figura 8</b>	Procesos biológicos en los que participan los genes que presentan el motivo URE1 en su región promotora en <i>E. histolytica</i>	39
<b>Figura 9</b>	Inmunolocalización de EhTSN en citoplasma	41
<b>Figura 10</b>	Inmunolocalización de EhTSN en el núcleo	42
<b>Figura 11</b>	Unión de EhTSN citoplasmática y nuclear al motivo URE1	44
<b>Figura 12</b>	Asociación de EhTSN con EhRNA pol II y EhPRMT-A	48
<b>Figura 13</b>	Ensayos de Pull-down	49
<b>Figura 14</b>	Interactoma de EhTSN	52
<b>Figura 15</b>	Asociación de EhTSN con EhPFO	54
<b>Figura 16</b>	Asociación de EhTSN con 14-3-3	56
<b>Figura 17</b>	Asociación de EhTSN con HSP70	58
<b>Figura 18</b>	Participación de EhTSN en varios procesos biológicos	66

#### IV. RESUMEN

*Entamoeba histolytica* es el protozoo responsable de la amibiasis humana, enfermedad que causa 100,000 muertes anualmente a nivel mundial. Sin embargo, poco se conoce acerca de la regulación de la expresión de las moléculas involucradas en la patogénesis. La transcripción de algunos genes relacionados con la virulencia están regulados positivamente por el elemento regulador en *cis* nombrado URE1. Previamente identificamos al factor de transcripción que se une a URE1, el cual muestra una localización tanto nuclear como citoplasmática. Esta proteína pertenece a la familia de proteínas Tudor Staphylococcal Nuclease (TSN), que en otros sistemas participa en virtualmente en todas las vías de la expresión de genes, que va desde la transcripción hasta las modificaciones post-traduccionales, sugiriendo que este factor de transcripción amibiano (EhTSN, previamente nombrado como EhURE1-BP) puede cumplir múltiples funciones en *E. histolytica*. Aquí, identificamos los genes que contienen el motivo URE1 en su región promotora y mostramos la presencia de EhTSN en las posibles fábricas de transcripción en el núcleo y su asociación con proteínas involucradas en la transcripción y el remodelamiento de la cromatina, confirmando que EhTSN participa en la regulación de la transcripción. En el citoplasma, EhTSN se encontró en la membrana de pequeñas vesículas y en la membrana plasmática. También, detectamos que EhTSN interacciona con proteínas que están involucradas en la transcripción, metabolismo y respuesta al estrés, entre otros procesos celulares. Estos resultados confirman la propuesta de que EhTSN es una proteína multifuncional de *E. histolytica*.

## V. ABSTRACT

*Entamoeba histolytica* is the protozoa parasite responsible of human amoebiasis, disease that causes from 40,000 to 100,000 deaths annually worldwide. However, few is known about the expression regulation of molecules involved in its pathogenicity. Transcription of some virulence-related genes are positively controlled by the *cis*-regulatory element named URE1. Previously we identified the transcription factor that binds to URE1, which displayed a nuclear and cytoplasmic localization. This protein belongs to the Tudor Staphyococcal nuclease (TSN) family, which in other systems participates in virtually all pathways of gene expression, ranging from transcription to post-translational modifications, suggesting that this amoebic transcription factor (EhTSN; former EhURE1BP) could also play multiple functions in *E. histolytica*. Here, we identify the genes that contain the URE1 motive in the promoter region and show the presence of EhTSN in putative “transcription factories” into the nucleus and its association with proteins involved in transcription and chromatin remodeling, confirming that EhTSN participates in transcription regulation. In cytoplasm, this protein was found linked to membrane of small vesicles and plasma membrane. In addition, we detected the interaction of EhTSN with proteins that are involved in transcription, metabolism, and stress response, among other cellular processes. These results support the proposal that EhTSN is a multifunctional protein of *E. histolytica*

## 1. ANTECEDENTES GENERALES

### 1.1. Amibiasis y su epidemiología

La amibiasis es la infección del tracto gastrointestinal del humano causada por *Entamoeba histolytica*, un protozoo capaz de invadir la mucosa intestinal y que presenta el potencial de extenderse a otros órganos (Espinosa-Cantellano & Martínez-Palomo, 2000). La infección con *E. histolytica* puede ser asintomática, sin embargo, cuando las condiciones son favorables, los pacientes pueden desarrollar una enfermedad invasiva intestinal, conocida como disentería (diarrea con sangre y moco) (Haque et al, 2003a). Si bien, las formas intestinales de la enfermedad son las más frecuentes, las infecciones extraintestinales son la causa principal de morbilidad y mortalidad (Hughes & Petri, 2000). Este protozoo puede penetrar a través de la mucosa intestinal y diseminarse a otros órganos, principalmente al hígado, donde se induce la formación de abscesos, y con menor frecuencia a pulmón, cerebro, piel y riñón (Espinosa-Cantellano & Martínez-Palomo, 2000; Haque et al, 2003a).

La epidemiología de la amibiasis tiene dramáticos cambios a raíz de la separación de las especies *E. histolytica* y *E. dispar* (especie no patógena, morfológicamente indistinguible de *E. histolytica*), y la prevalencia mundial de estas especies no se ha estimado recientemente. Los datos más citados sobre prevalencia, morbilidad o mortalidad debido a la amibiasis es el reporte de Walsh de 1986, que indica que 100,000 muertes ocurren en el mundo cada año debido a las complicaciones médicas de la amibiasis invasiva (Ximenez et al, 2009). La amibiasis se presenta en el humano a cualquier edad, siendo más frecuente en niños y adultos jóvenes, en especial en regiones tropicales, climas cálidos y templados, pero más aún en áreas pobres y mal saneadas (Espinosa-Cantellano & Martínez-Palomo, 2000).

En México, la amibiasis es una de las veinte principales enfermedades, clasificada anualmente en el quinto o sexto lugar (<http://www.dgepi.salud.gob.mx>). Esta cifra puede ser similar en otros países en desarrollo, en donde esta enfermedad es, desafortunadamente, una de las principales causas de morbilidad (Haque et al, 2003b; Stanley, 2003). La tasa de mortalidad en México debido a las severas complicaciones de la amibiasis ha disminuido en los últimos 40 años (<http://www.dgepi.salud.gob.mx>). Esta disminución se debe al mejoramiento del sistema de salud en este país y a una mayor accesibilidad a los fármacos anti-amibianos efectivos durante las últimas décadas. Un estudio seroepidemiológico reportó que el 8.41% de la población mexicana ha desarrollado anticuerpos anti-amibianos en circulación, indicando una alta exposición de la población mexicana al parásito (Caballero-Salcedo et al, 1994). Sin embargo, los valores de prevalencia de la infección por *E. histolytica* pueden ser erróneos debido a que las estimaciones se realizaron previo a la caracterización molecular de *E. histolytica* y *E. dispar* (Ximenez et al, 2009). En el 2003, la comisión federal para la protección contra riesgos sanitarios reportó que en ese año la amibiasis por consumo de agua contaminada fue de 810,828 casos, correspondiente al 18.8% del total de los casos por padecimientos gastrointestinales ([www.cofepris.gob.mx](http://www.cofepris.gob.mx)). Según los reportes del Centro Nacional de Virulencia Epidemiológica y Control de Enfermedades (CENAVECE) del Instituto de Salud de México ([www.cenavece.salud.gob.mx/index.html](http://www.cenavece.salud.gob.mx/index.html)), las cifras de los casos reportados en México del 2000 al 2011 han disminuido en un 31.10%, ya que van de 1,348,718 a 419,564 casos por año, siendo Guerrero el estado con una mayor tasa de incidencia en el 2011 (Tabla 1).

Entidad federativa	Población					
	General		Masculina		Femenina	
	Casos	Incidencia*	Casos	Incidencia*	Casos	Incidencia*
Aguascalientes	5 802	493.20	2 521	441.59	3 281	541.85
Baja California	2 672	80.00	1 181	67.50	1 491	93.74
Baja California Sur	2 167	365.49	997	320.20	1 170	415.57
Campeche	5 810	713.46	2 774	691.48	3 036	734.80
Coahuila	5 707	212.89	2 492	186.31	3 215	239.36
Colima	2 730	443.14	1 289	416.59	1 441	469.93
Chiapas	35 444	770.75	14 996	667.10	20 448	869.87
Chihuahua	5 909	171.21	2 522	143.35	3 387	200.18
Distrito Federal	14 447	163.24	6 081	142.28	8 366	182.81
Durango	4 481	287.15	1 908	249.25	2 573	323.65
Guanajuato	10 858	213.39	4 634	192.24	6 224	232.43
Guerrero	35 691	1,141.21	16 276	1,085.33	19 415	1,192.68
Hidalgo	21 209	867.43	9 393	805.13	11 816	924.29
Jalisco	15 644	219.64	7 149	203.92	8 495	234.86
México	40 056	263.14	17 241	226.79	22 815	299.42
Michoacán	7 065	179.58	3 078	163.89	3 987	193.92
Morelos	7 892	464.34	3 274	394.51	4 618	530.98
Nayarit	6 816	699.71	3 123	646.78	3 693	751.73
Nuevo León	5 884	129.18	2 643	115.42	3 241	143.08
Oaxaca	35 575	1,003.28	15 023	894.11	20 552	1,101.60
Puebla	25 803	448.10	11 289	408.22	14 514	484.96
Querétaro	6 108	342.90	2 590	297.57	3 518	386.22
Quintana Roo	6 956	493.20	2 980	421.64	3 976	565.09
San Luis Potosí	9 132	364.49	3 821	316.48	5 311	409.15
Sinaloa	14 081	529.60	5 892	440.62	8 189	619.62
Sonora	4 825	188.93	2 158	166.72	2 667	211.75
Tabasco	16 786	810.79	7 708	759.94	9 078	859.63
Tamaulipas	5 774	176.75	2 562	156.79	3 212	196.72
Tlaxcala	4 538	389.78	1 920	341.70	2 618	434.63
Veracruz	33 296	455.50	14 559	417.06	18 737	490.63
Yucatán	14 685	745.54	6 689	684.42	7 996	805.73
Zacatecas	5 721	415.99	2 461	371.44	3 260	457.41
<b>Total</b>	<b>419 564</b>	<b>384.15</b>	<b>183 224</b>	<b>341.87</b>	<b>236 340</b>	<b>424.88</b>



## 1.2. Taxonomía y genoma

*E. histolytica* se clasifica taxonómicamente de la siguiente manera (Systemanature:<http://sn2000.taxonomy.nl>):

- **Dominio:** *Eukaryota*
  - **Reino:** *Protozoa*
    - **Subreino:** *Sarcomastigota*
      - **Phylum:** *Amoebozoa*
        - **Subphylum:** *Conosa*
          - **Infraphylum:** *Archamoebae*
            - **Clase:** *Archamoebae*
              - **Orden:** *Pelobiontida*
                - **Familia:** *Entamoebidae*
                  - **Género:** *Entamoeba*
                    - **Especie:** *Entamoeba histolytica*

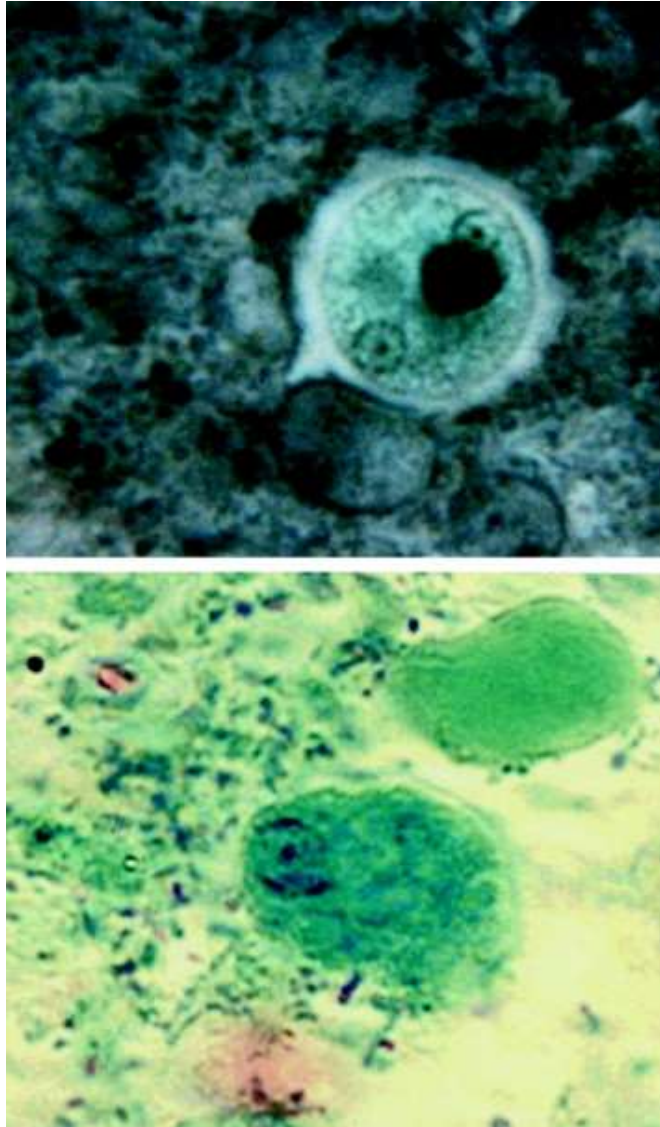
A diferencia de los eucariontes típicos, *E. histolytica* no posee mitocondrias por lo que se le ha ubicado en el Infraphylum *Archamoebae* (Cavalier-Smith, 1993). En el 2005 se publicó el genoma de *E. histolytica* (Loftus et al, 2005), reportando un tamaño de 20,799 kb, en donde solo 49.7% corresponde a 8, 201 genes codificantes, de los cuales un 24.4% presentan intrones (Lorenzi et al, 2010). Muchos aspectos únicos de la biología amibiana han sido identificados a partir del esfuerzo de la secuenciación del genoma, entre ellos, la presencia de un gran número de nuevos receptores tipo cinasa, una transferencia horizontal a gran escala de genes bacterianos y una expansión de genes involucrados en la fagocitosis,

transporte vesicular, virulencia y transducción de señales que regulan las funciones del citoesqueleto, y como era de esperarse ~30% de los genes predichos no se les han identificado homólogos en otros organismos (Ehrenkauffer & Singh, 2008).

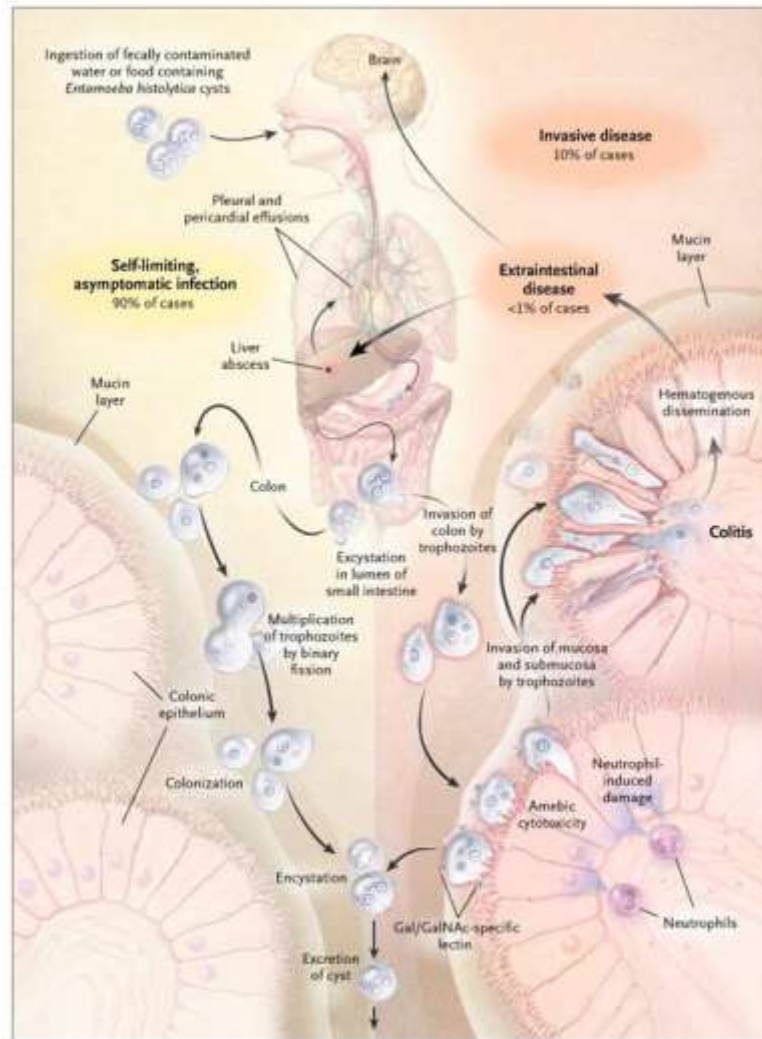
### **1.3. Ciclo de vida y patogénesis**

*E. histolytica* es un protozooario que presenta dos formas en su ciclo de vida: quiste y trofozoíto (Fig. 1). Los quistes son estructuras redondas de 10 a 16  $\mu\text{m}$ , con una cubierta gruesa y que presenta en su interior entre 1 y 4 núcleos (Haque et al, 2003a). El trofozoíto tiene un diámetro de 20 a 40  $\mu\text{m}$  y es móvil, gracias a su ectoplasma que le permite formar pseudópodos; su núcleo presenta un cariosoma compacto central y cromatina en gránulos uniformes en tamaño y localización (Haque et al, 2003a; Petri, 2002; Tanyuksel & Petri, 2003).

El ciclo de vida (Fig. 2) inicia con la ingestión del quiste (forma infectiva). Gracias a su dura cubierta el quiste no es destruido, pero si sensibilizado, por la acción de los jugos gástricos y pancreáticos, lo cual permite su desenquistación en el lumen del intestino grueso, donde puede desarrollar o no una infección invasiva. Al romperse el quiste, el trofozoíto (forma invasiva) termina su proceso de división y da lugar a cuatro trofozoítos metaquisticos, los cuales usan la lectina específica para galactosa/*N*-acetil-D-galactosamina (Gal/GalNAc) para adherirse a las mucinas y colonizar el intestino grueso (Haque et al, 2003a; Petri et al, 2002).



**Figura 1. Morfología de *Entamoeba histolytica*. A) quiste y B) trofozoítos teñidos con negro clorazol. (Stanley SL. Jr. 2003)**



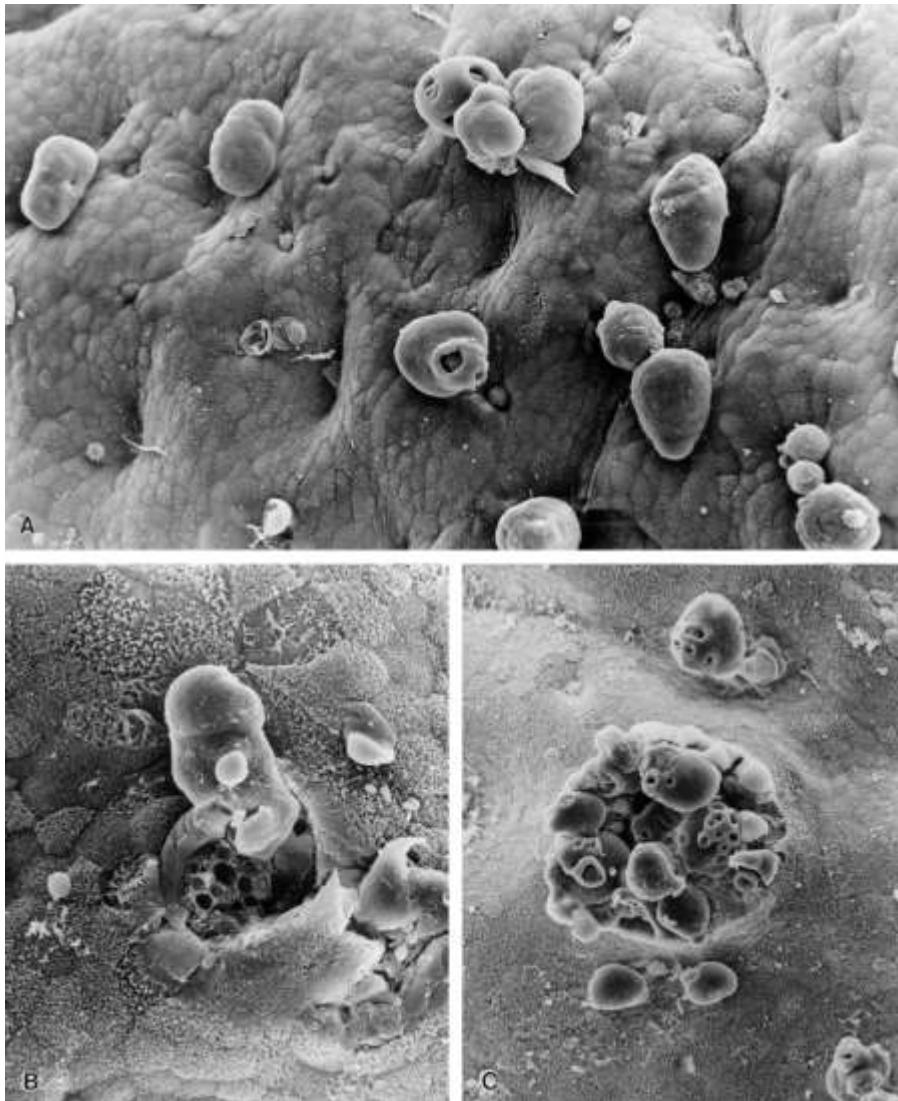
**Figura 2. Ciclo de vida de *Entamoeba histolytica*.** La infección se inicia normalmente por la ingestión de agua contaminada con heces o los alimentos que contienen quistes de *E. histolytica*. La forma de quiste infeccioso del parásito sobrevive al paso por el estómago y el intestino delgado. La excystation se produce en la luz intestinal, donde los trofozoítos móviles y potencialmente invasivos se multiplican. En la mayoría de las infecciones los trofozoítos se agregan en la capa de mucina intestinal y forman nuevos quistes, lo que resulta en una infección autolimitada y asintomática. En algunos casos, sin embargo, la adhesión y la lisis del epitelio del colon, mediado por la lectina de unión a galactosa y *N*-acetil-D-galactosamina (Gal/GalNAc), inicia la invasión del colon por los trofozoítos. Una vez que el epitelio intestinal es invadido, puede seguir la propagación extraintestinal en el peritoneo, hígado, y otros sitios. Los factores más probables que controlan la invasión, en lugar de enquistamiento, son parásitos "quorum sensing", señalización por la lectina Gal/GalNAc, las interacciones de las amibas con la flora bacteriana del intestino, y la respuesta inmune innata y adquirida del hospedero (Haque et al, 2003)

El trofozoíto no tiene un ciclo sexual y la población total de *E. histolytica* es clonal (Ghosh et al, 2000). La agregación de amibas en la capa de moco probablemente puede disparar el enquistamiento por medio de la lectina Gal/GalNAc (Eichinger, 2001) y los quistes excretados en las heces perpetúan el ciclo de vida para una futura propagación fecal-oral (Haque et al, 2003a).

#### **1.4. Mecanismos patogénicos de *E. histolytica***

El palabra *histolytica* se forma por las raíces griegas “tejido” y “disolver” y propio a su nombre, el parásito es capaz de destruir tejidos (Marie & Petri, 2014). La infección por *E. histolytica* progresa por diferentes eventos patogénicos como la adherencia, citotoxicidad, trogocitosis y fagocitosis (Fig. 3), mecanismos regulados por diferentes proteínas denominadas factores de virulencia.

Las moléculas de superficie del parásito controlan la adherencia, señalización, ingestión y modulación del sistema inmune en la relación hospedero–parásito (Marie & Petri, 2014). Los trofozoítos se adhieren directamente a las células epiteliales del hospedero por numerosos receptores, entre los que se encuentra la lectina Gal/GalNac (Petri et al, 1987). Esta lectina es un receptor transmembranal heterotrimérico que se une a los residuos de galactosa y *N*-acetil-D-galactosamina presentes en la superficie de las células epiteliales del colon y de otras células blanco (Petri et al, 1987). Más allá de su habilidad para unirse a la mucina, la lectina Gal/GalNac ha sido considerada como un mediador de la adhesión del parásito con las células del hospedero previo a su muerte (Ravdin & Guerrant, 1981). La lectina Gal/GalNac está constituida por una subunidad ligera (Lgl) y una subunidad pesada



**Figura 3. Microscopia electrónica de barrido de amibiasis intestinal experimental en cuyos.** **A)** Trofozoítos de *E. histolytica* se adhieren preferentemente al epitelio interglandular elevado. **B)** Una pequeña región interglandular de microinvasión es observada en una lesión invasiva temprana con ulceración superficial. **C)** Una etapa más avanzada de la invasión, donde numerosos trofozoítos se observan penetrando a través de una úlcera colónica. (Espinosa-Cantellano and Martínez –Palomo. 2000)

(Hgl) unidas por un enlace di-sulfuro, y una subunidad intermedia (Igl) que interactúa de manera no covalente (Petri et al, 2002). La Hgl presenta el dominio de reconocimiento de carbohidratos (CRD), el cual se une fuertemente a los residuos de galactosa y N-acetilgalactosamina presentes en las células del hospedero y en el moco (Petri et al, 2002). La inhibición o bloqueo de la función de esta subunidad evitan la adherencia del parásito y la muerte de la célula del hospedero *in vitro* (Petri et al, 2002). La subunidad Hgl también presenta un dominio intracelular con homología a las  $\beta$ -integrinas y puede tener un papel funcional en la señalización después de la interacción del CRD.

Una vez que se da la adherencia, *E. histolytica* induce múltiples efectos citotóxicos sobre la célula del hospedero, incluyendo un incremento intracelular de  $Ca^{2+}$ , producción de especies reactivas de oxígeno, pérdida de la integridad de la membrana, fragmentación del DNA, exposición de fosfatidilserina y activación de la caspasa 3 (Ralston & Petri, 2011). Se considera que los mecanismos de la citotoxicidad causada por *E. histolytica* son de dos tipos: los dependientes del contacto directo y los causados por proteínas secretadas por los trofozoítos próximos a la célula blanco (Christy & Petri, 2011).

Experimentos tempranos establecieron un fuerte vínculo entre la citotoxicidad y la fagocitosis amibiana (Orozco et al, 1983; Rodriguez & Orozco, 1986), y conforme avanza la investigación se estableció un modelo secuencial de adherencia, citotoxicidad dependiente de contacto y fagocitosis (Marie & Petri, 2014).

El proceso de la fagocitosis es complejo y puede ser diseccionado en varios pasos, los cuales se han caracterizado de acuerdo con criterios tanto morfológicos como bioquímicos (Rabinowitz et al, 1992). Experimentos *in vitro* han demostrado que *E. histolytica* ingiere preferentemente células apoptóticas, las cuales reconoce por la exposición

de la fosfatidilserina y colectinas en la superficie de estas células, a través de interacciones moleculares con, entre moléculas, la calreticulina amibiana, la cual es esencial para la fagocitosis de estas células, pero no para mediar la muerte (Vaithilingam et al, 2012). Recientemente, se caracterizó una proteína cinasa (C2PK) que se asocia a la fosfatidilserina, y cuya unión es clave para la formación de una copa fagocítica que es originada por el reordenamiento de actina (Somlata et al, 2011). Varias proteínas cinasas transmembranales amibianas también son importantes para la fagocitosis de las células apoptóticas y se ha observado que tienen un papel adicional en la citotoxicidad. Algunas de estas son las TMKB1-9 y TMK96 (PATMK), que regulan la adherencia y fagocitosis de estas células *in vitro* y son esenciales para establecer la colitis, pero no para la formación de absceso hepático amibiano (Marie & Petri, 2014).

Por otro lado, el paradigma secuencial de la adherencia y citotoxicidad e ingestión ha tomado otro giro con la caracterización de un nuevo evento patogénico, la trogocitosis, mecanismo por el cual *E. histolytica* ingiere pedazos de células vivas intactas (Marie & Petri, 2014). La trogocitosis es un proceso activo que se asemeja a la fagocitosis en muchas de sus características como el incremento de  $Ca^{2+}$  intracelular, y resulta en la muerte celular, pero las células muertas pueden no ser ingeridas totalmente (Ralston et al, 2014). Estas similitudes sugieren que la relación entre la adherencia, citólisis e ingestión puede ser más dinámica de como se había observado (Marie & Petri, 2014).

Uno de los principales efectos de la secreción de productos amibianos es la citotoxicidad independiente de contacto, afectando directamente la integridad de las uniones estrechas y la absorción de iones (Marie & Petri, 2014). Esto se debe principalmente a la secreción de prostaglandina E2 por el trofozoíto, la cual interacciona con el receptor EP4 de



las células epiteliales del intestino, alterando la localización de la claudina 4, lo que ocasiona una alteración en la integridad de las uniones estrechas e incrementa la secreción de  $\text{Cl}^-$  (Lejeune et al, 2011). Por otro lado, un análogo de la serotonina de *E. histolytica* inhibe la absorción de los iones  $\text{Na}^+$  y  $\text{Cl}^-$  y estimula la secreción de  $\text{Cl}^-$  en las asas intestinales (McGowan et al, 1983; McGowan et al, 1990). En la última década se observó la participación del complejo EhCPADH112 en la destrucción del tejido epitelial al interactuar con el complejo molecular de las uniones estrechas (Betanzos et al, 2013). También se ha observado que los trofozoítos inducen una desregulación transcripcional, desfosforilación, deslocalización y degradación de estas proteínas (Kissoon-Singh et al, 2013; Lejeune et al, 2011; Leroy et al, 2000).

Una vez que se han llevado a cabo todos estos mecanismos patogénicos y el material es ingerido, comienza el proceso de digestión en los fagolisosomas del trofozoíto, las funciones bactericidas y digestivas de estas estructuras son mediadas por proteasas, lisozimas, glicosidasas, amebaporos citolíticos y fosfolipasas (Okada et al, 2006; Serrano-Luna et al, 2013). Se ha observado que estas enzimas digestivas tienen un papel dinámico en la ameba, ya que pueden participar tanto en la digestión como en la virulencia. Recientemente se encontraron seis enzimas glicolíticas asociadas a la membrana que degradan los carbohidratos extracelulares a formas que pueden ser importadas al transporte amibiano (Biller et al, 2014). En otros parásitos patogénicos, las glicosidasas de superficie degradan a las proteínas del hospedero y participan en la captación de nutrientes, invasión y evasión del sistema inmune (Gomez-Arreaza et al, 2014). Sin embargo, la función de estas proteínas de superficie de la ameba es desconocida, aunque se ha observado que algunos productos secretados por *E. histolytica* presentan actividad de glicosidasa, incluyendo  $\beta$ -N-acetil-D-

glucosamidasa,  $\alpha$ - D-glucosidasa,  $\beta$ - D-galactosidasa,  $\beta$ -l-fucosidasa y  $\alpha$ -N-acetil- D-galactosaminidasa (Moncada et al, 2005). En adición a la actividad de glicosidasa, *E. histolytica* posee un armamento de proteasas. Las cisteínas proteasas amibianas tienen actividad catalítica contra una gran variedad de moléculas del hospedero. Esta actividad depende claramente de su concentración, localización (secretada, superficie, fagosoma/lisosoma) y pH en el ambiente intestinal (Marie & Petri, 2014). Ejemplos de estas cisteínas proteasas son i) EhCP112, la cual tiene la capacidad de unirse a los eritrocitos y degradar la hemoglobina, además de digerir componentes de la matriz extracelular (Ocadiz et al, 2005); y ii) CP5, que está relacionada con la degradación del moco intestinal (Marie & Petri, 2014). El bloqueo de las cisteína proteasas por métodos bioquímicos o genéticos comprometen la adherencia, citotoxicidad y la movilidad en este parásito (Serrano-Luna et al, 2013).

## **2. ANTECEDENTES PARTICULARES**

### **2.1. Regulación de la expresión génica en *E. histolytica***

La regulación espacio-temporal de la expresión de genes es un mecanismo subyacente en el desarrollo, homeostasis y adaptación al medio ambiente de todos los organismos (Gutierrez-Beltran et al, 2016). La expresión de genes en eucariontes es el resultado final de una multitud de procesos moleculares, incluyendo cambios estructurales en la cromatina para lograr un gen accesible para la transcripción, la transcripción del DNA a RNA, el “splicing” del RNAm, la edición y otras modificaciones covalentes del RNAm, la traducción del RNAm

en proteína y finalmente las modificaciones post-traduccionales necesarias para tener una proteína funcional (Nestler, 2009).

*E. histolytica* tiene la capacidad de modular la expresión de genes específicos en respuesta a una serie de condiciones ambientales como: el desarrollo, la respuesta al estrés, eventos de resistencia a fármacos, o durante la interacción de modelos de amibiasis experimental (Akbar et al, 2004; Bruchhaus et al, 2002; Sanchez et al, 1994). Sin embargo, se conoce poco de los mecanismos involucrados en la regulación de la expresión de la gran mayoría de esos genes. A la fecha se ha estudiado la regulación de la transcripción de algunos factores de virulencia, en donde se han identificado ciertos elementos en las regiones promotoras que regulan la transcripción basal, como la caja TATA y un elemento llamado GAAC, así como otros motivos reguladores río arriba que contribuyen a la regulación positiva o negativa de la transcripción (Azuara-Liceaga et al, 2005; Flores-Soto et al, 2005; Gilchrist et al, 1998; Perez et al, 1998; Romero-Diaz et al, 2007a; Schaenman et al, 2001; Singh et al, 2002; Singh et al, 1997). Por otra parte, también se han identificado algunos factores de transcripción de *E. histolytica* y los motivos que reconocen en las regiones promotoras (Tabla 2) (Pearson & Singh, 2010), entre estos se encuentra las proteínas de unión a la caja TATA (EhTBP y EhTRF1) (Luna-Arias et al, 1999), los factores de transcripción de unión a los elementos reguladores río arriba 1, 3 y 4 (URE1, URE3 y URE4) (Calixto-Galvez et al, 2011; Gilchrist et al, 2001; Schaenman et al, 2001), la proteína C/EBP, que regula la transcripción del gen de resistencia a multidrogas *EhPgp1* (Marchat et al, 2002), una proteína con homología a p53 de humano denominada Ehp53 (Mendoza et al, 2003), una familia de proteínas Myb (EhMybR2R3) que se unen al motivo consenso de reconocimiento Myb, el cual está presente en los promotores de diferentes familias de genes que están aso-

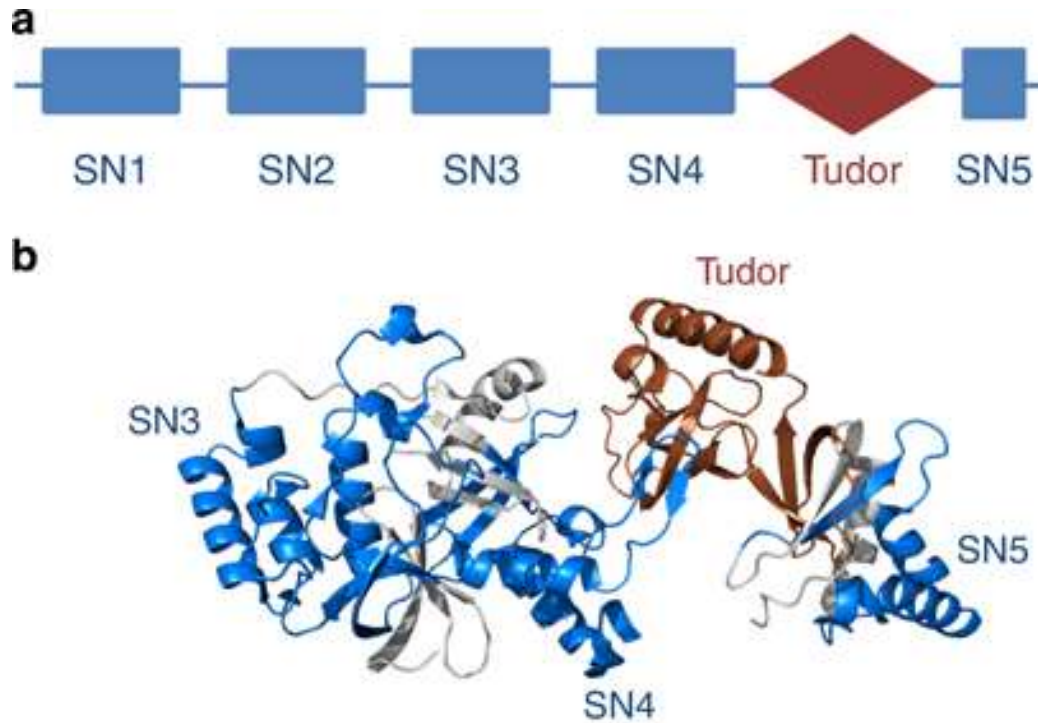
| DNA-binding motif   | Transcription factor | Assay performed  | Information gained   | Reference  |
|---|----------------------|--|--|--|
| TATTCTATT (URE3)  | URE3-BP              | Deletion/Replacement analysis<br>Yeast one hybrid<br>Microarray<br>EMSA<br>ChIP                    | Identification of DNA motif<br>Identification of URE3-BP<br>Proof of specific binding <i>in vitro</i><br>Proof of <i>in vivo</i> binding   | Purdy <i>et al.</i> (1996)<br>Gilchrist <i>et al.</i> (2001)<br>Gilchrist <i>et al.</i> (2008)<br>Gilchrist <i>et al.</i> (2001)<br>Gilchrist <i>et al.</i> (2003) |
| AAAAATGAATGGAAAAAATGAA<br>(URE4)  | EhEBP1 & 2           | Deletion/Replacement analysis<br>DNA affinity chromatography<br>EMSA                               | Identification of DNA motif<br>Identification of EhEBP1 and 2<br>Proof of specific binding <i>in vitro</i>   | Schaenman <i>et al.</i> (1998)<br>Schaenman <i>et al.</i> (2001)<br>Schaenman <i>et al.</i> (1998; 2001)   |
| TAACGG (Consensus Myb motif)  | EhMyb10              | Genome search<br>EMSA  | Identification of 32 Myb domain proteins<br>Proof of specific binding <i>in vitro</i>  | Meneses <i>et al.</i> (2010)   |
| CCCCC (EhMyb-dr)  | EhMyb-dr             | Microarray – stage conversion<br>Microarray – Myb-dr overexpression<br>MEME & Mاست<br>EMSA<br>ChIP | Identification of EhMyb-dr<br>Identification of co-regulated EhMyb-dr genes<br>Identification of DNA motif<br>Proof of specific binding <i>in vitro</i><br>Proof of <i>in vivo</i> binding | Ehrenkauf <i>et al.</i> (2007a)<br>Ehrenkauf <i>et al.</i> (2009)  |
| AGATTTTCT   | ECudA                | Genome search<br>EMSA  | Identification of CudA homolog<br>Proof of specific binding <i>in vitro</i>  | Yamada <i>et al.</i> (2008)  |
| TGTTGGTAGTTGAATTGGAAGAA<br>(Consensus C/EBP1 & C/EBPIII Motifs)                         | C/EBP                | Deletion/Replacement analysis<br>DNA Affinity Purification   | Identification of DNA motif<br>Partial purifications of proteins immunodepleted by human anti-C/EBP1<br>Proof of specific binding <i>in vitro</i>  | Marchat <i>et al.</i> (2002)   |
| GGACATGCCCGGGGCATGTCC<br>(Consensus p53 motif)  | Ehp53                | EMSA<br>EMSA   | Proof of specific binding <i>in vitro</i>  | Mendoza <i>et al.</i> (2003)   |
| DNA structure<br>e.g. Stem loops<br>Palindromes<br>Single-stranded DNA<br>Cruciform DNA | HMGB1                | Microarray<br>Ligase-mediated circularization assay<br>EMSA<br>Microarray                          | Identification of HMGB1<br>Proof of DNA bending<br>HMGB1 enhanced DNA binding of p53<br>Identification of genes modulated by HMGB1   | Gilchrist <i>et al.</i> (2006)<br>Abhyankar <i>et al.</i> (2008)   |
| TATTTAAA (Canonical TATA box for <i>E. histolytica</i> )                                | EhTBP                | EMSA   | Proof of specific binding <i>in vitro</i><br>Determined range of $K_D$ values for TATA box variants<br>EhTBP is more promiscuous than human and yeast TBPs                                 | de Dios-Bravo <i>et al.</i> (2005)   |
|   | EhTRF1               | Genome search<br>EMSA  | Identification of two additional TBP-related factors (EhTRF)<br>Proof of specific binding <i>in vitro</i>  | Castanon-Sanchez <i>et al.</i> (2010)  |

ciados a la transducción de señales, transporte vesicular, respuesta a choque térmico y virulencia (Meneses et al, 2010).

## **2.2. Tudor Staphylococcal Nuclease**

Como se mencionó anteriormente, la regulación de la expresión de genes es un conjunto de mecanismos moleculares altamente regulado que van desde el inicio de la transcripción hasta las modificaciones postraduccionales y que son fundamentales para la biología de todas las células. Cada uno de estos procesos es controlado por un gran repertorio de proteínas. Sin embargo, una proteína, conocida como Tudor Staphylococcal Nuclease (TSN), también nombrada como Tudor-SN, SND1 o p100 actúa en la mayoría de estos mecanismos durante la expresión de genes en eucariontes (Gutierrez-Beltran et al, 2016).

TSN es una proteína evolutivamente conservada encontrada en todos los linajes eucarióticos, excepto algunas levaduras como *Saccharomyces cerevisiae* (Gutierrez-Beltran et al, 2016). La conservación a lo largo de esta distancia evolutiva sugiere importantes funciones fisiológicas para TSN (Gutierrez-Beltran et al, 2016). La composición invariante de dominios de TSN comprende repeticiones en tándem de cuatro dominios tipo “nucleasa de estafilococo” (SN) en el extremo N terminal y un dominio Tudor fusionado a un dominio SN parcial en el extremo C terminal (Figura 4a y b) (Callebaut & Mornon, 1997; Gao et al, 2014; Ponting, 1997). Los dominios SN vienen de una superfamilia de unión a oligosacáridos/oligonucleótidos remarcablemente conservados a través de la evolución y comprende a proteínas que participan en la interacción con ácidos nucleicos, mientras que el



**Figura 4. Composición y estructura terciaria de TSN. A)** TSN presenta una arquitectura invariante de dominios incluyendo un tándem de cuatro dominios tipo SN seguido por un dominio Tudor y un quinto dominio SN. **B)** Modelo de cinta de TSN humana truncada. El dominio Tudor y tres dominios SN son coloreados en café y azul, respectivamente. (Gutierrez-Beltran et al, 2016)

dominio Tudor estructuralmente conservado participa en el reconocimiento y unión de residuos de lisina y arginina metilados en las proteínas blanco, siendo un factor clave para facilitar el ensamble de grandes complejos proteicos en compartimentos celulares discretos (Gutierrez-Beltran et al, 2016). La presencia simultánea de los dominios Tudor y SN en la misma proteína es intrigante y sugiere que durante la evolución, esta proteína, adquirió nuevas funciones moleculares adicionales a las canónicas para los dominios Tudor y SN. En adición, debido a la presencia de los múltiples dominios de TSN, esta proteína puede interactuar con ácidos nucleicos, proteínas individuales y complejos proteicos en una manera promiscua (Gutierrez-Beltran et al, 2016).

TSN se identificó por primera vez como un co-activador transcripcional de la proteína nuclear 2 del virus Epstein-Barr (EBNA2) (Tong et al, 1995) y subsecuentemente se describió como un co-regulador de los factores de transcripción Pim-1 (Leverson et al, 1998), STAT6, en la regulación de genes mediada por IL-4 (Valineva et al, 2005; Yang et al, 2002) y STAT5 involucrada en la señalización de la prolactina (Paukku et al, 2003). TSN también se identificó en el complejo formado por la ribonucleoproteína pequeña nuclear (snRNP) U5, la cual promueve el ensamble del “spliciosoma” *in vitro* (Yang et al, 2007). Adicionalmente, se ha descrito que TSN es parte del complejo de silenciamiento inducido por RNA (RISC) en humanos (Caudy et al, 2003). En insectos se encontró que TSN forma parte de los gránulos de estrés (Zhu et al, 2013) . En *Toxoplasma gondii* interacciona con la proteína argonauta (TgAgo) a través de un residuo metilado por una metiltransferasa de argininas (PRMT1) (Musiyenko et al, 2012), inclusive puede reconocer RNAs de doble cadena hipereditados (I-dsRNAs) (Scadden, 2005). TSN también ha sido aislada de la fracción del citoesqueleto del endosperma del arroz y de la planta del chícharo, sugiriendo

que en plantas esta proteína está involucrada en eventos relacionados con el citoesqueleto, incluyendo transporte de RNAm o traducción de proteínas (Abe et al, 2003; Sami-Subbu et al, 2001).

TSN es indispensable para el desarrollo normal y resistencia al estrés de las células (Gutierrez-Beltran et al, 2016). En los últimos años se ha analizado la partición de TSN en el desarrollo del cáncer, debido a que se ha observado que el aumento en la expresión de esta proteína está estrechamente asociada con varios tipos de cáncer, haciendo a TSN un atractivo blanco para la terapia anti cáncer y un marcador tumoral en potencia (Gutierrez-Beltran et al, 2016).

### **2.3. Tudor Staphylococcal Nuclease de *E. histolytica***

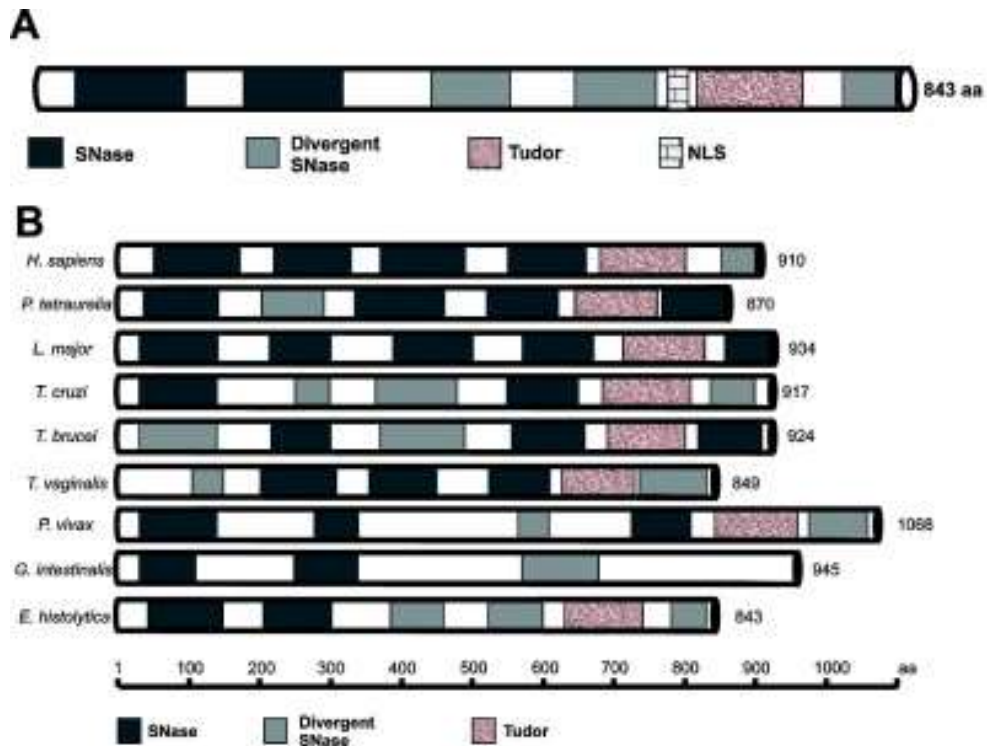
La proteína EhRabB de *E. histolytica* es un miembro de la familia de GTPasas pequeñas que participa en la fagocitosis y se localiza en vesículas citoplásmicas (Rodriguez et al, 2000). En el 2007 se reportó que la transcripción del gen *EhrabB* es activada por un motivo URE1 que se encuentra en la posición de -423 a la -413 en la región promotora de este gen (Romero-Diaz et al, 2007b) y la expresión de EhRabB se ve modulada a lo largo de la fagocitosis (Hernandes-Alejandro et al, 2013).

En el 2011, nuestro grupo de trabajo identificó a la proteína de unión al motivo URE1, Tudor Staphylococcal Nuclease de *E. histolytica* (EhTSN), previamente nombrada EhURE1-BP (Calixto-Galvez et al, 2011). Mediante análisis *in silico* se encontró que esta proteína presenta una señal de localización nuclear (NLS por sus siglas en inglés) en la posición 615 – 629 (Fig. 5A), sugiriendo que esta proteína está localizada en el núcleo.

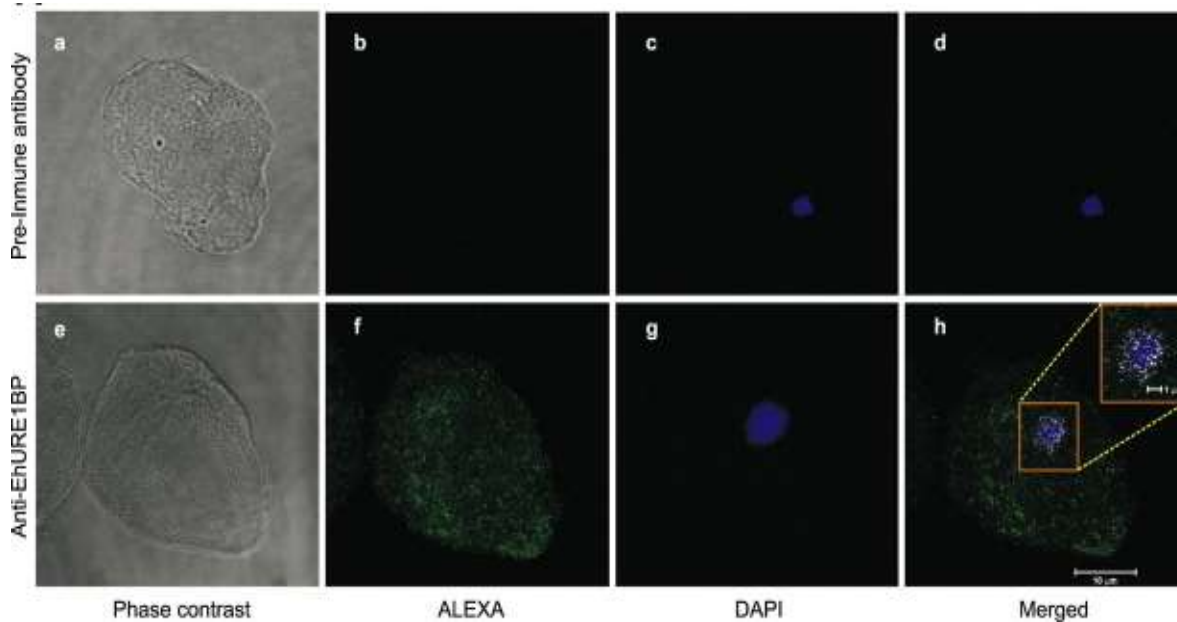


También se observó que esta molécula está constituida por diferentes dominios funcionales que incluyen: una repetición en tándem de dos dominios SN canónicos cercanos al extremo N-terminal (en las posiciones 56 – 149 y 204 – 306), tres dominios SN con baja homología a la secuencia canónica (TSN-like) en las posiciones 388 – 462, 526 – 601 y 781 – 832 y un dominio Tudor cerca del extremo C-terminal (posición 640 – 737) (Calixto-Galvez et al, 2011) (Fig. 5A). Esta proteína presenta un 21% de identidad y un 36% de similitud a la proteína humana TSN (Calixto-Galvez et al, 2011). Debido a la presencia de los dominios SN y Tudor y a su homología con miembros de la familia TSN (Fig. 5B), en este trabajo renombramos a la proteína como EhTSN.

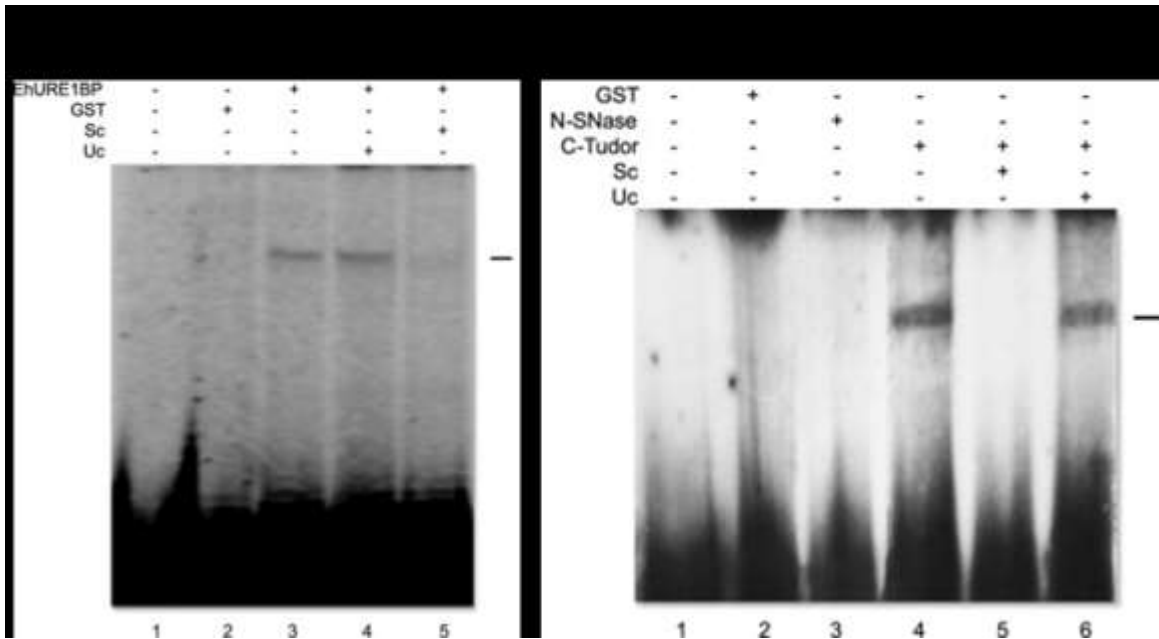
Por ensayos de inmunolocalización se demostró que esta proteína se localiza tanto en el citoplasma como en el núcleo (Fig. 6) (Calixto-Galvez et al, 2011). Mediante ensayos de cambio de movilidad electroforética (EMSA por sus siglas en inglés) y de super-retardamiento se determinó que tanto la proteína EhTSN nativa como la proteína EhTSN recombinante (rEhTSN) interactúan con el motivo URE1, siendo el dominio Tudor el responsable de llevar a cabo la interacción DNA–proteína (Fig. 7) (Calixto-Galvez et al, 2011). Estos resultados sugieren que EhTSN, semejante a los miembros TSN de otros organismos, puede ser una proteína multifuncional que participa como activador de la transcripción y que posiblemente esté involucrada en otras funciones celulares dependiendo de su localización celular. Sin embargo, esta suposición no ha sido experimentalmente comprobada.



**Figura 5. Esquema de la organización de la proteína de unión a URE1 de *Entamoeba histolytica* (EhTSN). A) Representación esquemática de EhTSN. La proteína identificada consta de 843 aminoácidos y presenta una señal de localización nuclear (NLS), dos dominios canónicos SNasa, tres dominios SNasa divergentes, y un dominio Tudor. B) Representación esquemática de las proteínas homologas a TSN del humano y los parásitos protozoarios. Las proteínas tipo TSN de diferentes protozoos se analizaron *in silico* y se compararon con la TSN de humanos. (Calixto-Galvez 2011).**



**Figura 6. Inmunolocalización subcelular de la proteína EhTSN.** Los trofozoítos de *E. histolytica* se fijaron y se incubaron con anticuerpos de conejo anti-EhTSN. A continuación, la unión de los anticuerpos se detectaron con IgG de cabra anti-IgG conejo conjugado con Alexa 488 (verde), y los núcleos se contratiñeron con DAPI (azul). Finalmente, las muestras se observaron mediante un microscopio confocal. **(a-d)** suero pre-inmune, **(e-h)** anticuerpos anti-EhTSN. **(a, e)** contraste de fase, **(b, f)** localización de EhTSN, **(c, g)** tinción con DAPI. **(d,h)** co-localización en el núcleo. El recuadro muestra una ampliación del núcleo. (Calixto-Galvez 2011).



**Figura 7. Unión de EhTSN al motivo URE1.** **A)** Ensayo de cambio de movilidad electroforética (EMSA) usando a la proteína recombinante EhTSN (rEhTSN) y a la etiqueta de GST (rGST) (usado como control negativo). **B)** EMSA usando los dominios recombinantes que contiene a los dos primeros dominios SNasa o al dominio Tudor. En los dos casos se marcó radiactivamente con un oligonucleótido de doble cadena conteniendo el motivo URE1 de la región promotora del gen *EhrabB* y se incubó con 1  $\mu$ g de las proteínas recombinantes y en el caso de rGST con 10  $\mu$ g. Línea 1, sonda libre; línea 2, control negativo usando rGST; línea 3, en **A)** rEhTSN en **B)** dominio SN; línea 4, **A)** rEhTSN + competidor inespecífico, en **B)** dominio Tudor; línea 5, **A)** rEhTSN + competidor específico, en **B)** dominio Tudor + competidor específico; línea 6, **B)** dominio Tudor + compositor inespecífico. Modificado de Calixto-Galvez 2011

### 3. JUSTIFICACIÓN

En todos los organismos la expresión génica es controlada tanto a nivel transcripcional como post-transcripcional. En eucariontes, TSN es una proteína multifuncional que participa en la regulación de la expresión génica a varios niveles. En *E. histolytica* EhTSN participa como un activador transcripcional y al igual que otras proteínas de esta familia, se localiza en núcleo y citoplasma. Sin embargo, hasta el momento se desconoce si EhTSN participa en otros eventos celulares. Por lo tanto, conocer las interacciones de EhTSN con otras proteínas y los genes que son regulados por este factor ayudará a discernir si participa en otros niveles de la expresión génica y otros eventos celulares.

#### **4. HIPÓTESIS**

EhTSN es una proteína multifuncional de *Entamoeba histolytica* que participa en la regulación de la expresión génica y otros procesos celulares.

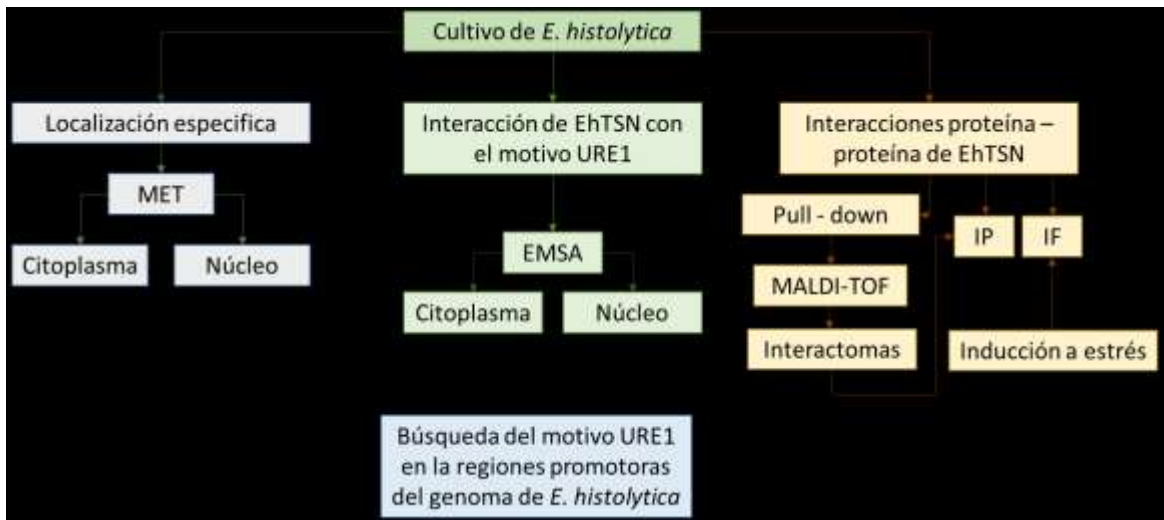
## **5. OBJETIVO**

Identificar genes que potencialmente sean regulados por EhTSN, así como las proteínas que interaccionan con ésta y proponer los eventos en los que participa en la biología de *E. histolytica*

### **5.1. OBJETIVOS PARTICULARES**

1. Identificar los genes que posean al motivo URE1 en su promotor, por lo que su transcripción sea potencialmente regulada por EhTSN.
2. Determinar la localización subcelular de EhTSN en los trofozoítos de *E. histolytica*.
3. Analizar la interacción de EhTSN citoplasmática con el motivo URE1.
4. Identificar proteínas de *E. histolytica* que interaccionan con EhTSN.
5. Analizar la localización de EhTSN durante el estrés por choque térmico.
6. Proponer un modelo de la participación de EhTSN en diferentes eventos celulares de *E. histolytica*.

## 6. DISEÑO EXPERIMENTAL





## **7. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **7.1 Cultivo de *E. histolytica***

Los trofozoítos de *E. histolytica* de la clona A de la sepa HM1:IMSS (Orozco et al, 1983), fueron cultivados en condiciones axénicas a 37 °C en medio TYI-S (Diamond et al, 1978) suplementado con 15% de suero bovino adulto (Microlab), 3% de mezcla de vitaminas de Diamond (North American Biologicals), 0.25 UI/ml de bencilpenicilina (Lakeside) y 35 µg/ml de estreptomina (Lakeside) (medio TYI-S-33). Los trofozoítos se cosecharon en la fase de crecimiento logarítmica para todos los experimentos. Para ello, los cultivos se incubaron en un baño de agua-hielo durante 5 min para despegar los trofozoítos de las paredes del frasco de cultivo. Entonces, se centrifugó a 900 xg durante 5 min a 4 °C y las células se lavaron dos veces con PBS (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.5 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 8 mM, NaCl 1.4 mM, KCl 2.7 mM, pH 7.4).

### **7.2. Inmunolocalización de EhTSN por microscopía electrónica de transmisión**

La microscopía electrónica se realizó como se describió (Segovia-Gamboa et al, 2011). Brevemente, los trofozoítos se fijaron con paraformaldehído al 4% y glutaraldehído al 0.1% en medio libre de suero por 1 h a temperatura ambiente. Las muestras fueron cubiertas en LR White y polimerizadas bajo UV a 4 °C por 16 h. Las secciones fueron obtenidas y montadas en rejillas de níquel cubiertas de formvar (Científica SENNA). Después, estas se incubaron con un anticuerpo policlonal de conejo anti-EhTSN (Calixto-Galvez et al, 2011) en una dilución 1:50. Un anticuerpo de cabra anti-conejo conjugado a partículas de oro de 30 nm (Ted Pella Inc.) se utilizó como anticuerpo secundario en una

dilución 1:60. El inmunomarcaje se realizó a temperatura ambiente. Las secciones se observaron en un microscopio de transmisión electrónica (JEM 1011, Jeol Ltd).

### **7.3. Extracción de proteínas**

Para obtener la fracción de proteínas totales, los trofozoítos se resuspendieron en solución de lisis (Tris-HCl, pH 7.5 20 mM, NaCl 150 mM, EDTA 1 mM, EGTA 1Mm, 1% NP-40, 1% desoxicolato de sodio) en presencia de una mezcla de inhibidores de proteasas (IP-1X) (PMSF 100 mM, Leupeptina 10  $\mu$ M, N-Ethylmaleimida 100 mM, PHMB 100 mM, E-64 10  $\mu$ M, y 5X Complete Protease inhibitors, Roche). Subsecuentemente, las muestras fueron sometidas tres veces a sonicación a una amplitud de 60 W en frío (sonicador ultrasónico de punta *Vibra-Cell Sonics<sup>R</sup>*) con intervalos de 10 seg. Finalmente, para obtener la fracción soluble, los extractos se centrifugaron a 20 000 x g por 15 min a 4 °C.

Las fracciones citoplasmáticos y nucleares de trofozoítos se obtuvieron como se describió previamente (Schreiber et al, 1989) con algunas modificaciones. Brevemente, 2 x10<sup>7</sup> trofozoítos se cosecharon y se lavaron como se describió anteriormente. Después, las células se resuspendieron en solución A fría (HEPES 10 mM, pH 7.9, MgCl<sub>2</sub> 1.5 mM, KCl 10 mM, DTT 0.5 mM) en presencia de IP-1X y se lisaron hipotónicamente al ser incubadas durante 20 min a 4 °C con 1% de NP-40. La integridad nuclear se monitoreó por microscopia óptica. Posteriormente, las muestras se centrifugaron a 20 000 x g por 15 min a 4 °C y el sobrenadante, correspondiente a la fracción citoplasmática (EC), se colectó y se almacenó a -70 °C hasta su uso. Los núcleos, contenidos en la pastilla, se resuspendieron y se incubaron durante 40 min a 4°C en 50  $\mu$ l de solución B (alta en sales) (HEPES 20 mM, pH 7.9, NaCl

420 mM, EDTA 1 mM, EGTA 1 mM, DTT 0.5 mM) en presencia de IP-1X. Después, se centrifugaron a 20 000 x g por 15 min a 4 °C, el sobrenadante, correspondiente a los extractos nucleares (EN), se colectó y se almacenó a -70 °C hasta su uso. La concentración de proteínas se determinó usando un ensayo colorimétrico (Bio-Rad *DC Protein Assay*), siguiendo las instrucciones del fabricante.

#### **7.4. Ensayos de Western blot**

Las fracciones proteicas se separaron por electroforesis en geles de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE) al 10%. Posteriormente, las proteínas se transfirieron a membranas de nitrocelulosa a 400 mA por 1.5 h (Towbin et al, 1979). Después, las membranas se tiñeron con rojo de Ponceau (rojo de Ponceau 0.1% y ácido acético 1%), para verificar la integridad de las muestras proteicas. A continuación, para bloquear las uniones inespecíficas, las membranas se incubaron con leche libre de grasas al 4% en PBS (PBS-leche) durante 1 h a 37°C. Posteriormente, las membranas se incubaron toda la noche a 4 °C con anticuerpos diluidos en PBS-leche: anti-EhSERCA (Martinez-Higuera et al, 2013) en una dilución 1:2000, anti-Histona 4 dimetilada en la lisina 20 (H4K20 me2) (Abcam) en una dilución 1:500 y anti-EhTSN en una dilución 1:6000. Después las membranas se incubaron durante 2 h a temperatura ambiente con un anticuerpo secundario anti-conejo marcado con peroxidasa (GeneTex). La unión antígeno-anticuerpo se reveló con el método quimioluminiscente ECL (GE Healthcare, United Kingdom), siguiendo el protocolo sugerido por el fabricante.

## 7.5. Ensayos de cambio de movilidad electroforética (EMSA)

Un oligonucleótido de doble cadena correspondiente al motivo URE1 de la región promotora del gen *EhrabB* (sentido 5'TCTTAAATATTTGGAAC3', antisentido 5'GTTCAAATATTTAAGA3') se marcó en su extremo 5' con ATP [ $\gamma$ - $^{32}$ P] con una T4 polinucleotido cinasa siguiendo el procedimiento estándar (Sambrook & Russell, 2001). Esta sonda se incubó con 30  $\mu$ g de EN o EC en un volumen final de 70  $\mu$ l de amortiguador de unión (HEPES 10 mM, pH 7.9, KCl 40 mM, DTT 1 mM, MgCl<sub>2</sub> 4 mM, espermidin 4 mM, glicerol 5%) a 4 °C por 30 min. Después de esto, el complejo DNA–proteína se resolvió en geles de poliacrilamida al 6% en condiciones no desnaturizantes a 130 V por 3 h y se analizó mediante un procesador de imágenes (phosphoimager analyzer, Bio-Rad). Para los ensayos de especificidad se realizaron ensayos de competencia usando un exceso molar de 1000 veces del mismo fragmento no marcado (competidor específico) o de un oligonucleótido de doble cadena con diferente secuencia (competidor inespecífico).

## 7.6. Ensayos de inmunoprecipitación

Para la inmunoprecipitación, los trofozoítos de *E. histolytica* se cosecharon y se lavaron dos veces con PBS y se obtuvieron las proteínas totales como se describió anteriormente. Para reducir la unión inespecífica de proteínas, los extractos se incubaron por 2 h a 4 °C con 50  $\mu$ l de perlas Dynabeads-proteína G (Invitrogen). Después, los mismos extractos se incubaron 2 h con 50  $\mu$ l de perlas acopladas al anticuerpo anti-EhTSN o a suero pre-inmune de conejo. Las perlas se concentraron magnéticamente y se lavaron tres veces con solución de lavado (Invitrogen). Las proteínas unidas al complejo perlas-anticuerpo se

disociaron con amortiguador de muestra de Laemmli (Tris-HCl 50 mM, pH 6.8, SDS 2%, glicerol 10%,  $\beta$ -mercaptoethanol 1%, EDTA 12.5 mM, and azul de bromofenol 0.002%) y se hirvieron por 10 min. A continuación, las proteínas inmunoprecipitadas se separaron por PAGE-SDS 10% y se analizaron por Western blot usando anticuerpos contra: i) EhTSN en una dilución 1:6000; ii) la subunidad  $\beta$  de la EhRNA pol II (amablemente donado por el Dr. Juan Pedro Luna-Arias del CINVESTAV-IPN, México) a una dilución de 1:40 000; iii) EhPRMT-A (Medina-Gomez, 2015) en una dilución 1:300 y iv) EhPFO en una dilución 1:1000.

### **7.7. Ensayos de inmunolocalización**

Para estos ensayos, el anticuerpo anti-EhTSN (producido en conejo) se unió covalente a Alexa Fluor 555 (Invitrogen) utilizando el equipo Molecular Probes Antibody Labeling kit (Life Technologies) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Trofozoítos de *E. histolytica*, se pusieron en cubreobjetos y se incubaron en medio TYI-S-33 a 37 °C durante 30 min para permitir que se adhirieran a los cubreobjetos. Pasado este tiempo, las células se fijaron y permeabilizaron con metanol frío por 10 min y posteriormente se incubaron con una solución de bloqueo (suero de caballo 10%, albúmina de suero bovino 3%, glicina 10 mM in PBS) por 60 min a temperatura ambiente. Después, las muestras se incubaron toda la noche a 4 °C con el anticuerpo anti-EhTSN (dilución 1:100) covalentemente marcado con Alexa Fluor 555. Entonces, las muestras se lavaron varias veces y se incubaron durante 2 h a temperatura ambiente con anticuerpos monoclonales de ratón anti-14-3-3 (dilución 1:100) (GeneTex) o anti-HSP70 (dilución 1:200) (GeneTex) o con un

anticuerpo policlonal de ratón anti- EhPRMT-A (dilución 1:50) y después con un anticuerpo secundario anti-IgG de ratón conjugado a Alexa Fluor 488 (dilución 1:300) (Invitrogen). Finalmente, los núcleos fueron teñidos con 4',6-Diamidino-2-fenilindol (DAPI) 300 nM y las muestras se observaron a través de un microscopio confocal (Carl Zeiss LSM 700) usando el software ZEN 2009. En los ensayos de co-localización de EhTSN y HSP70 durante el estrés térmico, los trofozoítos se incubaron a 42 °C durante 2 h antes de realizar los ensayos de inmunofluorescencia.

En el caso de la co-localización con EhPFO y EhRNAPol II, cuyos anticuerpos se generaron en conejo, estos se unieron covalentemente a Biotina (ThermoFisher), siguiendo las instrucciones de manufactura. En estos ensayos, después de la incubación con anti-EhTSN (dilución 1:100), los trofozoítos se incubaron con anti-EhPFO (Rodriguez et al., 1998) (dilución 1:200) o anti-EhRNA pol II (dilución 1:500). Después, se incubaron con estreptavidina acoplada a FITC (SIGMA) en una dilución 1:200. Finalmente, las muestras se analizaron por microscopía confocal.

## **7.8. Ensayos de Pull-down**

Los ensayos de pull-down se realizaron como se describió (Brymora et al, 2004) usando como cebo la proteína recombinante GST-EhTSN (rEhTSN) (Calixto-Galvez et al, 2011) y como presa extractos totales de trofozoítos. Para ello, se mezclaron 100 µg de la proteína rEhTSN con 500 µl de perlas de Glutathione Sepharose<sup>TM</sup> 4B (GE Healthcare) toda la noche a 4 °C. Después, la columna de Glutathione Sepharose – rEhTSN se lavó con

amortiguador de lavado 1 (Tris-Cl 20 mM, pH 7.4, NaCl 150 mM y Triton X-100 0.2%) y se almacenó a 4 °C hasta su uso.

Por otro lado, para eliminar interacciones inespecíficas, los extractos de proteínas totales de trofozoítos (1 mg) fueron subsecuentemente pasados a través de las columnas de Glutathione Sepharose vacía y acopladas a GST antes de ser pasados a través de la columna de Glutathione Sepharose acoplada a rEhTSN. Después de la interacción y exhaustivos lavados con amortiguador de lavado 2 (Tris-HCl 20 mM, pH 7.4 and NaCl 150 mM) y amortiguador de lavado 3 (Tris-HCl 20 mM, pH 7.4), las proteínas unidas a rEhTSN se eluyeron usando el amortiguador de muestra de Laemmli. Las proteínas eluidas se sometieron a SDS-PAGE al 10% seguido por una tinción con azul brillante de Coomassie. Finalmente, estas proteínas fueron extraídas, digeridas con tripsina y sujetas a análisis de espectrometría de masas. Para cuestiones de reproducibilidad, se realizaron tres ensayos independientes de pull-down.

## **7.9. Espectrometría de masas LC-MS/MS**

Para la espectrometría de masas en tándem de cromatografía líquida (LC-MS/MS), todos los experimentos se realizaron en un sistema de cromatografía de nano flujo líquido “nanoAcquity”, acoplado a un espectrómetro de masas con una trampa lineal de iones LTQ Velos (Thermo Fisher Scientific) equipado con un nano electrospray de iones. Para estos ensayos se utilizaron los siguientes reactivos: solvente A (ácido fórmico al 1%) y solvente B (acetonitrilo al 100% en ácido fórmico al 0.1%). A continuación, a partir de 3 µl de proteínas digeridas con tripsina, se acoplaron a una pre-columna (Symmetry® C18, 5 µm, 180 µm x

20 mm, Waters). Posteriormente, estas proteínas se pasaron a través de una columna capilar de 10 cm UPLC (ID BEH-C18 1.7  $\mu\text{m}$  particle size 100  $\mu\text{m}$ ). La temperatura de la columna se controló a 35 °C. Los péptidos se separaron por un método de gradiente de 60 min a una tasa de flujo de 400 nl/min. El gradiente se programó de la siguiente manera: 3 – 50% del solvente B (por arriba de 30 min), 50 – 85% del solvente B (por arriba de 2 min), 85% del solvente B (por arriba de 4 min) y 3% del solvente B (por arriba de 22 min). Los péptidos se obtuvieron por medio de una fuente de nano electrospray en el espectrómetro de masas por medio de una punta estándar recubierta de silicio (NewObjective). El espectrómetro de masas se manipuló en un modo dependiente de adquisición de datos con el fin de alternar automáticamente entre el escaneo completo (400–1600  $m/z$ ) y subsecuente se obtuvo la información de los péptidos después de la disociación inducida por colisión en la espectrometría de masas en tándem (CID MS/MS) dentro de la trampa lineal de iones con una exclusión dinámica activada. Para la disociación se utilizó helio como gas de colisión a una energía de colisión normalizada al 35% y un tiempo de activación de 10 ms. La adquisición de datos se obtuvo por el software Xcalibur 2.0.7 (Thermo Fisher Scientific).

#### **7.10. Evaluación de los datos obtenidos en la espectrometría de masas**

Los datos de la espectrometría se obtuvieron del software Proteome Discoverer versión 1.3 y se compararon en una base de datos de *E. histolytica* (18,800 entradas). La búsqueda se ejecutó bajo los siguientes parámetros: una ventana de 2 Da principal de ion MS, una ventana de 1 Da de ion MS/Ms y dos fisiones perdidas permitidas. La iodoacetamida derivada de la cisteína (carbamida metil cisteína) se especificó en la solicitud como una modificación fija y oxidación de la metionina como una modificación variable.



### 7.11. Análisis bioinformáticos

La búsqueda del motivo URE1 en el genoma de *E. histolytica* se realizó con la colaboración de la Dra. Elisa I. Azuara-Liceaga y el M. en C. Helios Cárdenas Hernández del Posgrado en Ciencias Genómicas de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México (UACM). Se utilizó un programa de búsqueda en el genoma de *E. histolytica* bajo los siguientes criterios: i) inclusión de los genes por el codón de inicio ATG, ii) exclusión de genes que contienen intrones, y finalmente iii) selección de 1000 pb río arriba del codón de inicio. Los motivos URE1 previamente caracterizados AATAATAGGAA, TAAAATAGGAA (Purdy et al, 1996) y AATATTTGGAA (Romero-Diaz et al, 2007b) se buscaron en las regiones promotoras de los genes filtrados.

Para caracterizar a las proteínas obtenidas en la espectrometría de masas se realizó una búsqueda de estas en la base de datos UniProt (<http://www.uniprot.org>) y se agruparon de acuerdo a los procesos biológicos en los que participan. La base de datos STRING 10.0 (<http://string-db.org>) se utilizó para analizar las interacciones conocidas y predichas de las proteínas involucradas y así formar una red de relaciones entre ellas (Interactoma). Para estos análisis usamos un valor de confianza media de 0.400 y no se filtraron nodos desconectados.

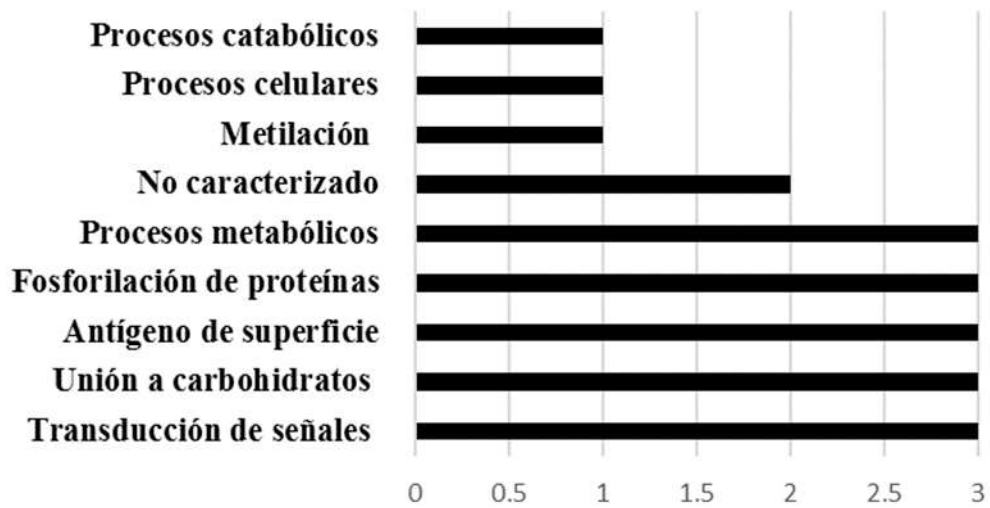
## 8. RESULTADOS

TSN es una proteína evolutivamente conservada de protozoarios a plantas y animales, lo que sugiere que cumple funciones biológicas importantes, por ejemplo, participando virtualmente en todas las vías de la expresión de genes, desde la transcripción hasta el silenciamiento inducido por RNA (Gutierrez-Beltran et al, 2016). En *E. histolytica* EhTSN se caracterizó primero como un factor de transcripción de unión al motivo URE1 que activa la expresión del gen *EhrabB* (Calixto-Galvez et al, 2011; Romero-Diaz et al, 2007b). A partir de esta observación y con el fin de encontrar otros genes que contengan el motivo URE1 en su región promotora, se realizó una búsqueda del motivo URE1 en el genoma de *E. histolytica* y se encontraron 39 genes que poseen este motivo en su región promotora (Tabla 3), con una distancia variable al sitio de inicio de la transcripción que va de -31 a -495 pb. En esta búsqueda se encontraron tanto los genes que previamente se han caracterizado por tener el motivo URE1 (*EhrabB* y *hgl5*), como otros cuyos productos participan en el metabolismo, señalización, en antígenos de superficie y en metilación de proteínas (Fig. 8). Estos resultados sugieren que EhTSN posiblemente participa en la regulación de la expresión de otros genes diferentes a los ya descritos.

### 8.1. EhTSN se localiza en diferentes compartimentos celulares

Previamente se demostró por ensayos de inmunofluorescencia que EhTSN se encuentra en el citoplasma y el núcleo de *E. histolytica* (Calixto-Galvez et al, 2011). Desde los años 80's se ha sugerido que la localización de las proteínas determina su actividad y función biológica, por tal motivo, se analizó la localización de EhTSN en ambos compor-

|            |      |  |             |
|------------|------|--|-------------|
| EHI_133900 | -56  | galactose-inhibitable lectin 170 kDa subunit, putative | AATAATAGGAA |
| EHI_150510 | -215 | ribosomal protein L11 methyltransferase, putative      | AATAATAGGAA |
| EHI_077500 | -56  | galactose-specific adhesin 170kD subunit               | AATAATAGGAA |
| EHI_103900 | -318 | nucleosome-binding protein 1, putative                 | TAAAATAGGAA |
| EHI_188600 | -367 | dentin sialophospho protein precursor, putative        | TAAAATAGGAA |
| EHI_067850 | -226 | Rab family GTPase                                      | TAAAATAGGAA |
| EHI_005260 | -367 | surface antigen ariel1, putative                       | TAAAATAGGAA |
| EHI_147740 | -432 | serine/threonine kinase, putative                      | AATATTTGGAA |
| EHI_089990 | -72  | lysozyme, putative                                     | AATATTTGGAA |
| EHI_033720 | -404 | DEAD/DEAH box helicase, putative                       | AATATTTGGAA |

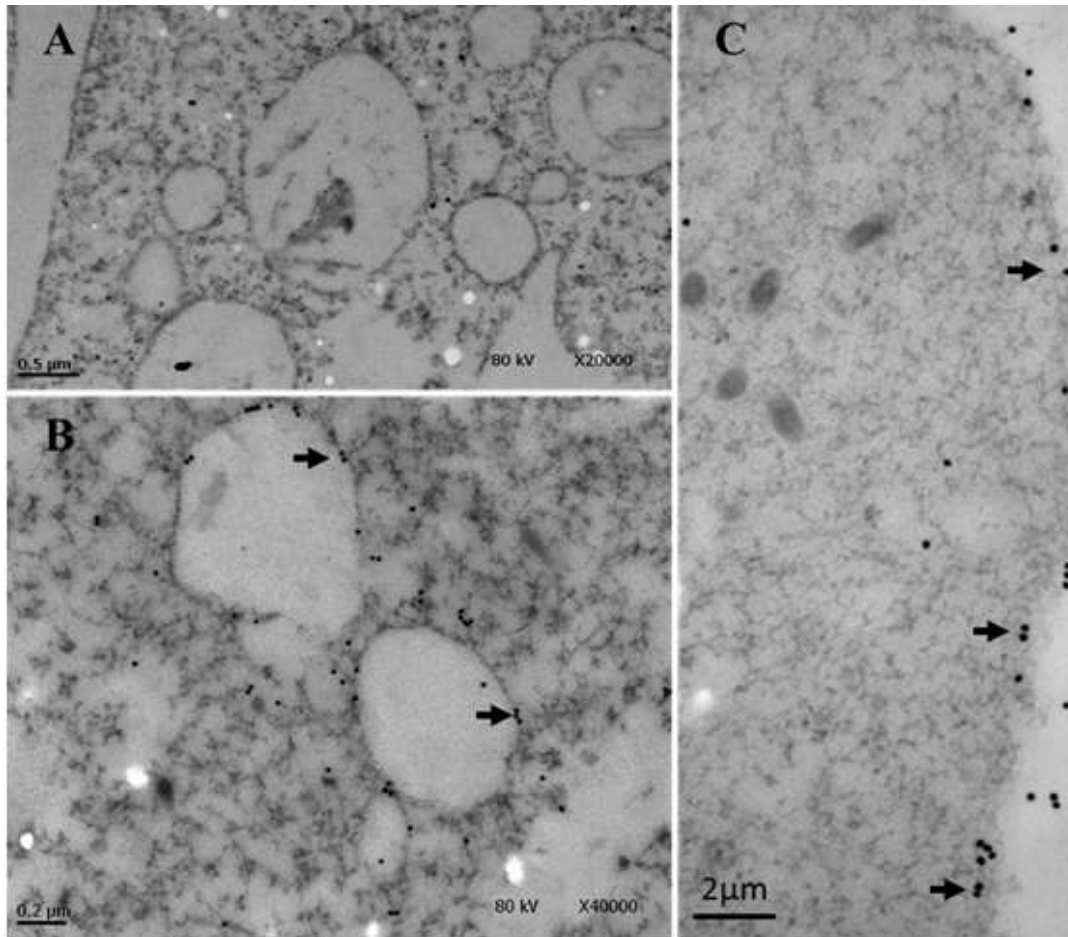


**Figura 8. Procesos biológicos en los que participan los genes que presentan el motivo URE1 en su región promotora en *E. histolytica*.**

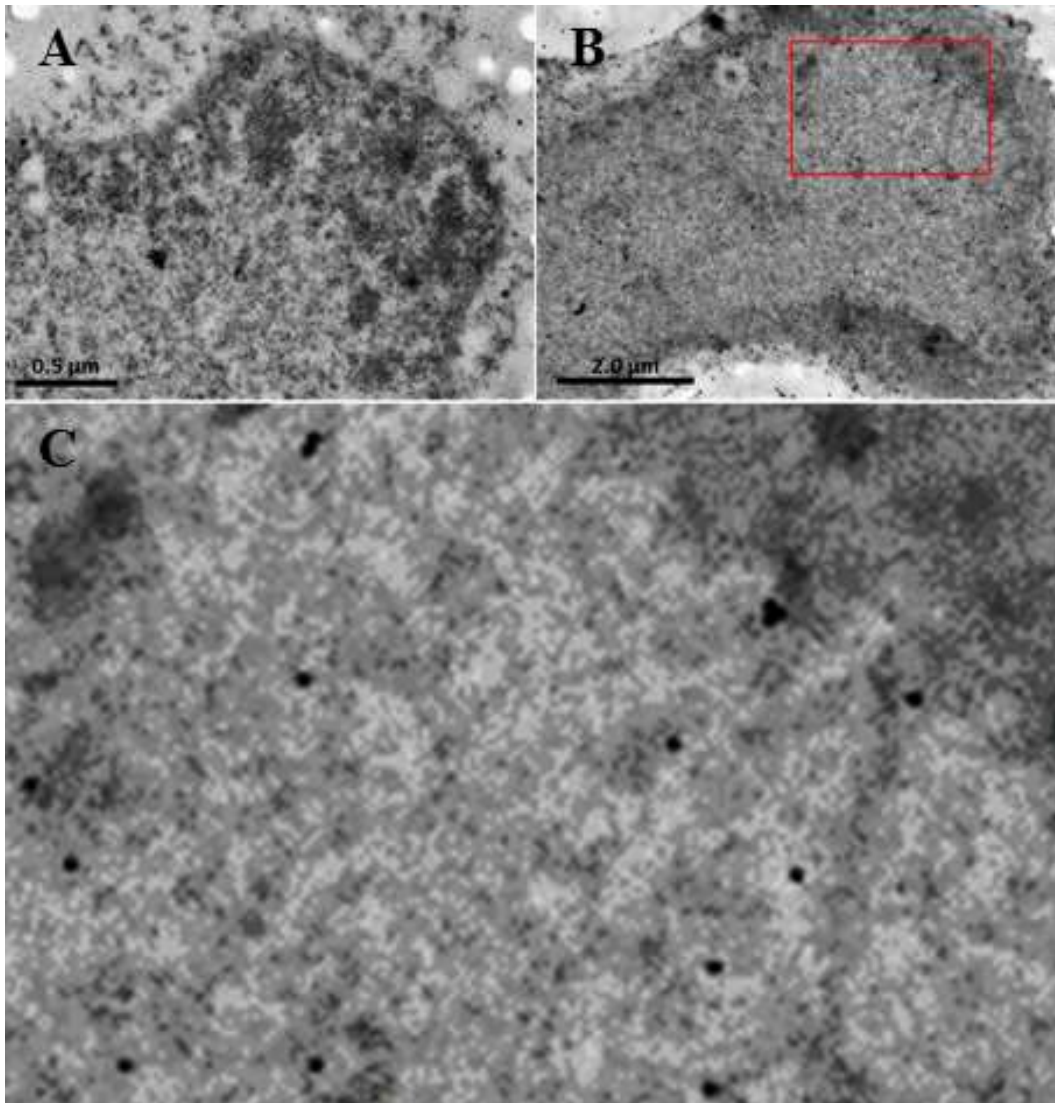
timentos, por ensayos de inmunomicroscopía electrónica. En estos experimentos detectamos que EhTSN se encuentra dispersa en el citosol, asociada a la membrana de pequeñas vesículas citoplasmáticas (~0.6  $\mu\text{m}$ ) (Fig. 9B), así como a la membrana plasmática (Fig. 9C). Por otra parte, EhTSN nuclear fue detectada en regiones donde no está condensada la cromatina (eucromatina) y en sitios muy cercanos a la heterocromatina, pero no dentro de ésta (Fig. 10B-C). En otros sistemas, se ha reportado que en estos sitios se localizan las regiones favorables para la expresión de los genes, por lo que se les conoce como “fábricas de transcripción” (Fedorova & Zink, 2008). Así, la localización en el núcleo apoya la idea de que EhTSN participa en la transcripción de genes en *E. histolytica*, y queda por investigar su función en los diversos sitios donde se localiza en el citoplasma.

## **8.2. EhTSN citoplasmática y nuclear interaccionan con el DNA**

La mayoría de los factores de transcripción de unión al DNA se localizan en el núcleo, pero también se pueden encontrar en diferentes regiones celulares, como son el citosol, membrana y mitocondria, sugiriendo otros papeles diferentes a la de factor o cofactor transcripcional (Min et al, 2016). Por tal motivo analizamos si EhTSN citoplasmática conserva su capacidad de unirse al motivo URE1, tal y como lo hace la EhTSN nuclear, por medio de ensayos de movilidad electroforética (EMSA por sus siglas en inglés) usando extractos citoplasmáticos. Para comprobar la pureza de estos extractos se realizó un ensayo de Western blot utilizando anticuerpos que reconocen marcadores citoplásmicos o nucleares. En estos ensayos, un anticuerpo contra la bomba SERCA, localizada en el retículo endoplásmico (Martínez-Higuera et al., 2013), reconoció a esta proteína solo en los extractos citoplasmáticos, mientras que una marca epigenética de dimetilación del residuo de lisina 20



**Figura 9. Inmunolocalización de EhTSN en citoplasma.** Las secciones de los trofozoítos se incubaron con anticuerpo anti-EhTSN y con un anticuerpo anti-IgGs de conejo conjugado a partículas de oro de 30  $\mu\text{m}$ . **A)** Control negativo, suero pre-inmune. **B)** y **C)** Detección de EhTSN. Las flechas indican la detección de EhTSN en pequeñas vesículas en **(B)** y cercana o en la membrana plasmática en **(C)**.

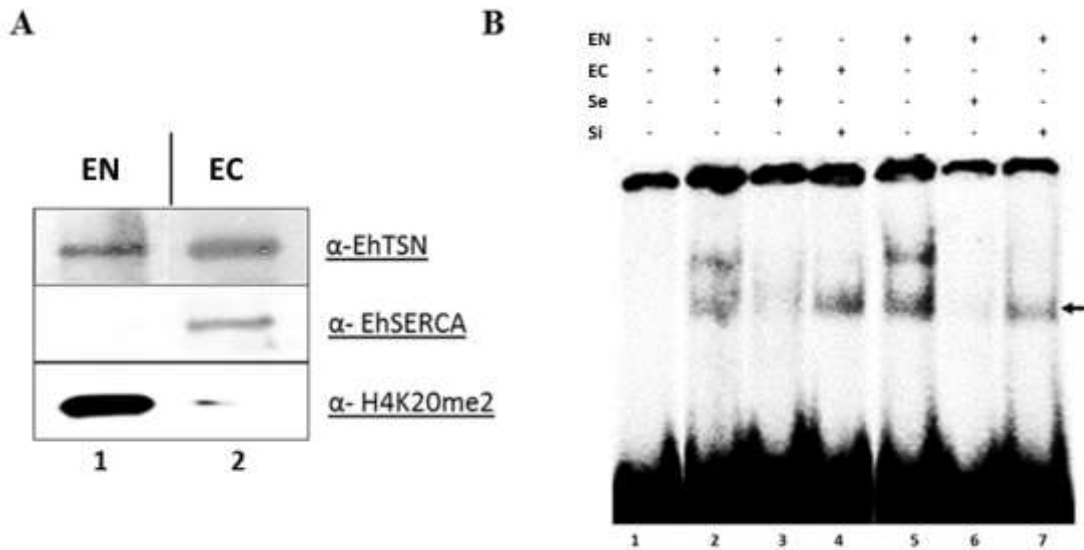


**Figura 10. Inmunolocalización de EhTSN en el núcleo.** Las secciones de los trofozoítos se incubaron con anticuerpo anti-EhTSN y con un anticuerpo anti-IgGs de conejo conjugado a partículas de oro de 30  $\mu\text{m}$ . **A)** Control negativo, suero pre-inmune. **B)** Detección de EhTSN. **C)** Aumento de la sección marcada en **B)**.

de la histona H4 (H4K20 me<sub>2</sub>) fue detectada solo en los extractos nucleares (Fig. 11A), indicando un fraccionamiento correcto. Como era esperado, el anticuerpo anti-EhTSN detectó a la proteína en ambos compartimentos (Fig. 11A).

Una vez validada la pureza de las fracciones obtenidas, se realizaron los experimentos de EMSA usando como sonda el motivo URE1 presente en el promotor del gen *EhRabB* (Romero-Díaz et al., 2007). Los resultados mostraron que la EhTSN citoplásmica es capaz de formar complejos con el elemento URE1, de la misma forma que lo hace la proteína EhTSN presente en el núcleo (Fig. 11B). En ambos casos se formaron dos complejos DNA-proteína, sin embargo, el complejo superior desaparece en la presencia de un exceso molar de 1000 veces del elemento URE1 no marcado (competidor específico) y también cuando se utilizó un competidor inespecífico, en contraste, la formación del complejo inferior desapareció en la presencia del competidor específico, pero permaneció en presencia de un competidor inespecífico, indicando que solo este complejo DNA – proteína es específico (Fig. 11B). Finalmente, el complejo formado por EhTSN citoplasmática presenta una menor intensidad comparada a la intensidad mostrada por EhTSN nuclear (Fig. 11B), sugiriendo una menor capacidad de unión, aunque se requieren ensayos cuantitativos para confirmar esta observación. De cualquier manera, estos resultados sugieren que EhTSN citoplasmática puede ser un factor de transcripción parcialmente inactivo, o posiblemente puede estar realizando otras funciones en el citoplasma.





**Figura 11. Unión de EhTSN citoplasmática y nuclear al motivo URE1.** **A)** Fraccionamiento celular. Extractos nucleares (EN) y citoplasmáticos (EC) de trofozoítos se obtuvieron, se separaron por PAGE-SDS y fueron analizados por Western blot usando anticuerpos anti-EhTSN, anti-EhSERCA (marcador citoplasmático) y anti-H4K20me2 (marcador nuclear). **B)** Ensayo de cambio de movilidad electroforética (EMSA). Un oligonucleótido de doble cadena conteniendo el motivo URE1 de la región promotora del gen *EhrabB* se marcó radiactivamente y se incubó con 30  $\mu$ g de EN o EC. Estas muestras se cargaron en un gel de poliacrilamida al 6% en condiciones no desnaturalizantes y se expusieron. La especificidad del complejo DNA-proteína se analizó al incubar la misma sonda no marcada en un exceso molar de 1000 veces (competidor específico, Se) o un oligonucleótido de doble cadena con diferente secuencia (competidor inespecífico, Si). La flecha indica el complejo DNA-proteína específico.

### **8.3. EhTSN interacta con la RNA polimerasa II (EhRNAPol II) y con una metiltransferasa de argininas (EhPRMT-A)**

Como se demostró previamente (Calixto-Gálvez et al., 2011) y en nuestros resultados anteriores, EhTSN se une al elemento URE1, un motivo regulador en *cis* que activa la transcripción de algunos genes de *E. histolytica*, incluyendo *EhrabB* y *Ehhgl5* (Calixto-Gálvez et al, 2011; Romero-Díaz et al, 2007b). Por lo tanto, es posible que la proteína EhTSN tenga la capacidad de unirse a la EhRNAPol II para activar la transcripción. Para comprobar esta hipótesis realizamos ensayos de inmunoprecipitación usando el anticuerpo anti-EhTSN. Como esperábamos, en los ensayos de Western blot se detectó a la subunidad  $\beta$  de la EhRNAPol II entre las proteínas inmunoprecipitadas (Fig. 12A). Para confirmar la interacción entre EhTSN y EhRNAPol II realizamos ensayos de inmunofluorescencia en trofozoítos. En estos experimentos, observamos la co-localización de EhTSN y EhRNAPol II en el núcleo de los trofozoítos. (Fig. 12B). Estos resultados confirman que, posiblemente, EhTSN interacta con la maquinaria de transcripción lo cual podría indicar un papel funcional en el inicio de la transcripción en este parásito.

En eucariontes, la transcripción también es regulada por la metilación de residuos de lisina y arginina en las histonas (Bedford & Clarke, 2009b), y se ha reportado que en otros sistemas TSN se asocia con proteínas que presentan argininas metiladas, entre las que se encuentran algunos factores de transcripción (Zheng et al, 2013). Así, la metilación de argininas en histonas y en otras proteínas pudiera ser posiblemente un evento importante para la interacción con la proteína EhTSN permitiendo así la regulación de diversos procesos celulares, incluida la transcripción. Esta modificación post-traducciona es catalizada por enzimas llamadas metiltransferasas de argininas (PRMT's), y en *E. histolytica* se encontraron



cinco de estas proteínas (Borbolla-Vazquez et al, 2015). Para determinar si la metilación de argininas pudiera ser importante en la función biológica de EhTSN realizamos ensayos de inmunoprecipitación con anti-EhTSN y mediante Western blot observamos que una metiltransferasa de *E. histolytica* llamada EhPRMT-A se encuentra dentro del complejo proteico inmunoprecipitado (Fig. 12A). Además, por medio de ensayos de inmunofluorescencia observamos que EhTSN co-localiza con EhPRMT-A en la membrana plasmática, en citoplasma y en núcleo (Fig. 12B), sugiriendo que la metilación de proteínas es necesaria para acoplar una o más funciones celulares en las que puede participar EhTSN.

Por otro lado, estas asociaciones observadas de EhTSN con EhRNAPol II y EhPRMT-A se analizaron en la base de datos STRING 10.0 (Fig. 12C), observando que el complejo proteico predicho involucra también a EhPRMT-5 (EHI\_158560), a la histona 4 (EHI\_023230), al factor de inicio de la transcripción putativo STP5 (EHI\_187280) y a diferentes subunidades de las RNA polimerasas I y III (EHI\_088230, EHI\_038570) entre otras. Estos datos sugieren que EhTSN, aparte de estar involucrada con la activación de la transcripción, posiblemente también regule la metilación de histonas en eventos epigenéticos de *E. histolytica*.

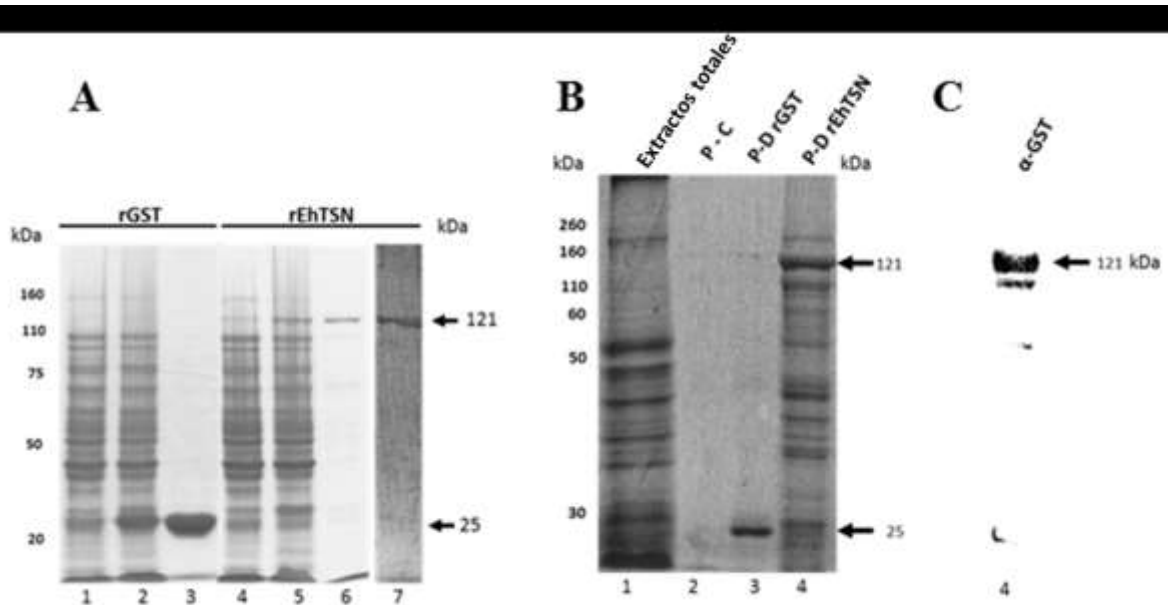
#### **8.4. EhTSN se asocia a proteínas involucradas en diferentes procesos celulares**

Bajo la hipótesis de que los miembros de la familia TSN son proteínas conservadas, multifuncionales (Jariwala et al, 2015), buscamos por medio de ensayos de pull-down, otras proteínas de *E. histolytica* que se puedan estar asociando a EhTSN, usando como cebo a la proteína recombinante rEhTSN inmovilizada en una columna de glutatión-Sepharosa. Para

ello, primero expresamos a la proteína recombinante (rEhTSN), la cual está fusionada a la etiqueta de GST (Calixto-Gálvez et al., 2011) y verificamos su unión a las perlas. El análisis por PAGE-SDS mostró una eficiente inducción de la proteína recombinante, así como la unión exclusiva de ésta a las perlas de glutatión-Sepharosa (Fig. 13A). En estos ensayos también se vió una buena expresión y unión a las perlas de la proteína GST (Fig. 13A), que fue usada para el pre-aclaramiento en los ensayos de pull-down.

Una vez acoplada rEhTSN a las perlas, ésta se usó como cebo en los ensayos de pull-down y a los extractos totales de trofozoítos de *E. histolytica* como presa. En estos ensayos los extractos de *E. histolytica* fueron previamente pre-aclarados a través de columnas de Sepharosa y GST-Sepharosa, donde no se encontró una interacción inespecífica significativa (Fig. 13B, carriles 2 y 3, respectivamente). En contraste, el análisis por PAGE-SDS de la elución de la columna rEhTSN-Sepharosa mostró varias bandas con diferentes pesos moleculares que van de <20 a ~160 kDa (Fig. 13B, línea 4). La banda más prominente presentó un peso molecular de ~121 kDa, el cual es el peso molecular esperado de rEhTSN (95 kDa de EhTSN y 26 kDa de la etiqueta de GST). Esta banda fue detectada por medio de Western blot utilizando un anticuerpo anti-GST (Fig. 13C), confirmando la identidad de la proteína recombinante.

Para identificar a las proteínas asociadas a rEhTSN, las bandas fueron extraídas del gel, analizadas por medio LC-MS/MS e identificadas en la base de datos de *E. histolytica* (<http://amoebadb.org/amoeba/>). Así, se lograron identificar 31 proteínas diferentes (Tabla 4) que, de acuerdo a su función, se clasificaron en siete procesos celulares (Fig. 14 A). Trece de estas proteínas son enzimas que participan en diferentes funciones metabólicas, principalmente en el catabolismo de la glucosa, cuatro son proteínas de membrana y del



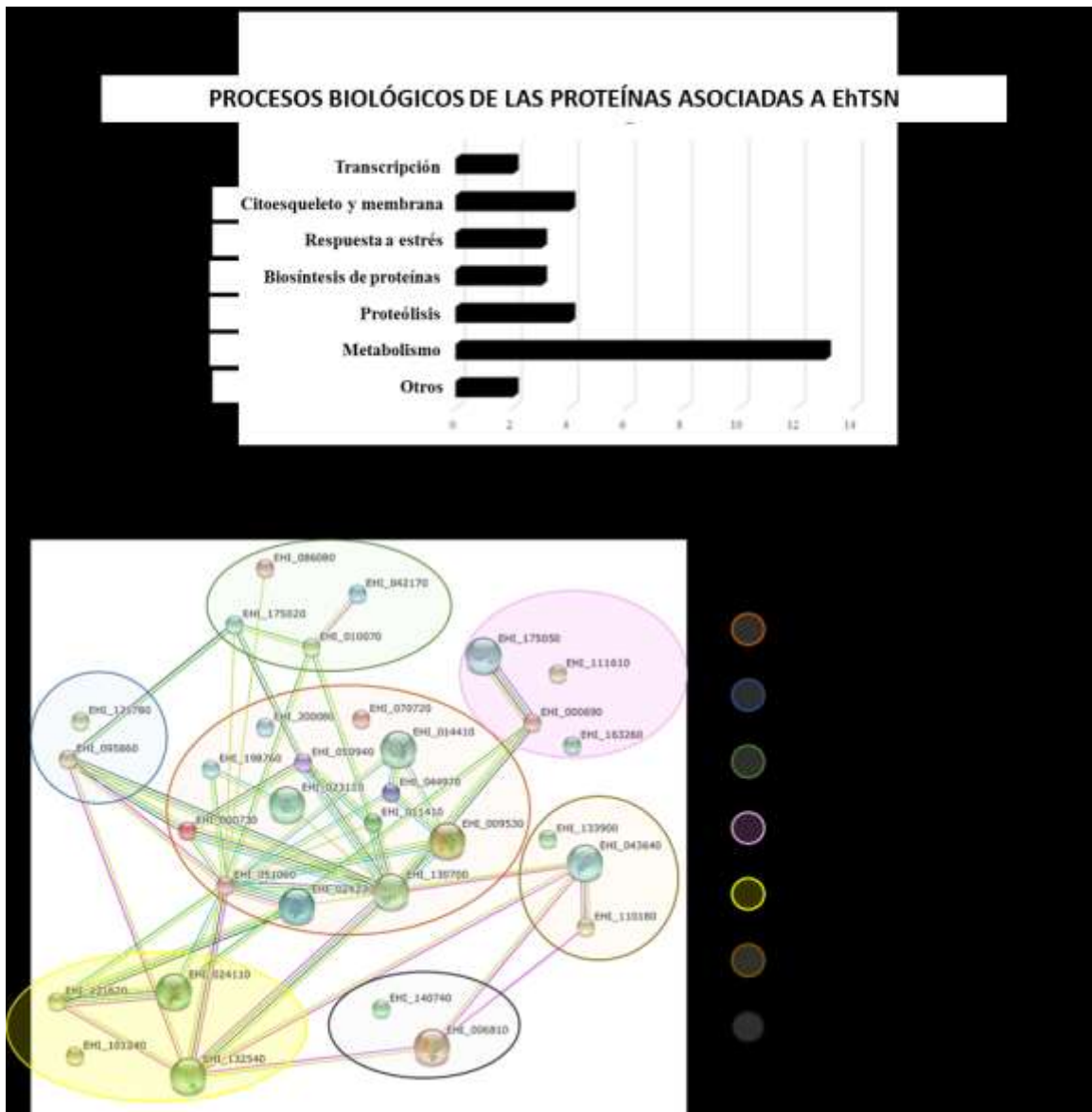
**Figura 13. Ensayos de Pull-down.** A) Expresión y purificación de GST y EhTSN recombinantes. Las proteínas recombinantes (rGST y rEhTSN) se indujeron, purificaron y se analizaron por PAGE-SDS teñido con azul de Coomassie. Líneas 1 y 4, extractos de bacterias no inducidas; líneas 2 y 5, extractos de bacterias inducidas; líneas 3 y 6, proteínas recombinantes purificadas; línea 7, Western blot de rEhTSN usando un anticuerpo anti-EhTSN. B) Pull-down. Los extractos de trofozoítos se pasaron a través de la columna de Glutathine Sepharose 4B sola, la columna Glutathine Sepharose acoplada a rGST y finalmente la columna de Glutathine Sepharose acoplada a rEhTSN. Las proteínas de cada paso se analizaron por PAGE-SDS y se tiñeron con azul de Coomassie. Línea 1, extractos totales de trofozoítos; línea 2, elución de la columna sola; línea 3, elución de la columna acoplada a rGST; línea 4, elución de la columna acoplada a rEhTSN. C) Identificación de rEhTSN en el Pull-down. Una fracción de la elución de la columna acoplada a rEhTSN se sometió a Western blot usando un anticuerpo anti-GST. P-C= Pre-limpiado, P-D= Pull-down.

**Tabla 4. Identificación de proteínas asociadas a rEhTSN en *Entamoeba histolytica*.**

| Locí ID                         | Anotación   | Función molecular  |
|---------------------------------|---|--|
| <b>Actividad metabólica</b>     |   |  |
| EHI_051060                      | Pyruvate:ferredoxin oxidoreductase                                  | Cadena de transporte de electrones                           |
| EHI_009530                      | Pyruvate phosphate dikinase   | Procesos metabólicos del piruvato                            |
| EHI_050940                      | 2,3-bisphosphoglycerate-independent Phosphoglycerate mutase         | Procesos catabólicos de la glucosa                           |
| EHI_000730                      | PPi-dependent phosphofructokinase                                   | Glucolisis   |
| EHI_044970                      | Malic enzyme  | Procesos metabólicos del malato                              |
| EHI_070720                      | L-myo-inositol-1-phosphate synthase                                 | Actividad cintetasa del Inositol 3-fosfato                   |
| EHI_130700                      | Enolase   | Glucolisis   |
| EHI_011410                      | Transketolase   | Actividad catalítica   |
| EHI_198760                      | Alcohol dehydrogenase 3   | Actividad oxidoreductasa                                     |
| EHI_023110                      | Alcohol dehydrogenase   | Actividad oxidoreductasa                                     |
| EHI_200080                      | Purine nucleoside phosphorylase                                     | Procesos metabólicos de nucleosidos                          |
| EHI_024230                      | Cysteine synthase type II   | procesos biosintéticos de la cisteína a partir de la serina  |
| EHI_014410                      | Malate dehydrogenase  | Actividad oxidoreductasa                                     |
| <b>Transcripción</b>            |   |  |
| EHI_095860                      | DNA-directed RNA polymerase, beta subunit Domain containing protein | Transcripción  |
| EHI_121780                      | Enhancer binding protein-1  | Transcripción  |
| <b>Proteólisis</b>              |   |  |
| EHI_042170                      | Aminoacyl-histidine dipeptidase                                     | Proteólisis  |
| EHI_086080                      | Proteasome alpha subunit  | Procesos catabólicos de proteínas dependientes de ubiquitina |
| EHI_010070                      | <i>Xaa-Pro dipeptidase</i>  | Procesos celulares   |
| EHI_175020                      | Peptidase   | Procesos celulares   |
| <b>Biosíntesis de proteínas</b> |   |  |
| EHI_175050                      | Aspartyl-tRNA synthetase  | Biosíntesis de proteínas                                     |
| EHI_111610                      | Tryptophanase   | Metabolism de amino ácidos                                   |
| EHI_000690                      | Seryl-tRNA synthetase   | Amino acilacion de la serina tRNA                            |
| <b>Respuesta a estrés</b>       |   |  |
| EHI_024110                      | Thioredoxin reductase   | Remoción de radicales de superóxido                          |

|  |  |   |
|--|--|---|
| EHI_121620                             | Peroxiredoxin                                | Actividad antioxidante  |
| EHI_132540                             | Heat shock protein70, hsp70A2                | Respuesta a estrés  |
| <b><i>Citoesqueleto y membrana</i></b> |  |   |
| EHI_110180                             | Myosin-2 heavy chain, non-muscle             | Proteína motor  |
| EHI_043640                             | Actin  | Citoesqueleto   |
| EHI_133900                             | Galactose-inhibitable lectin 170 kDa subunit | Integral de membrana  |
| EHI_163260                             | Copine                                       | Localizada en los sitios de adhesión de integrinas y es requerida para la estabilidad de los miofilamentos en <i>C. elegans</i> . |
| <b><i>Otros</i></b>                    |  |   |
| EHI_140740                             | Proteína hipotética                          | Actividad sulfotransferasa  |
| EHI_006810                             | 14-3-3-3                                     | Señalización  |





**Figura 14. Interactoma de EhTSN.** A) Procesos biológicos en los que participan las proteínas asociadas a EhTSN (<http://www.uniprot.org>). B) Red de interacción proteica. Se usó la base de datos de interacción proteína-proteína STRING (<http://string-db.org>) para predecir sus procesos biológicos, así como la red de interacciones proteicas en donde esas están involucradas.

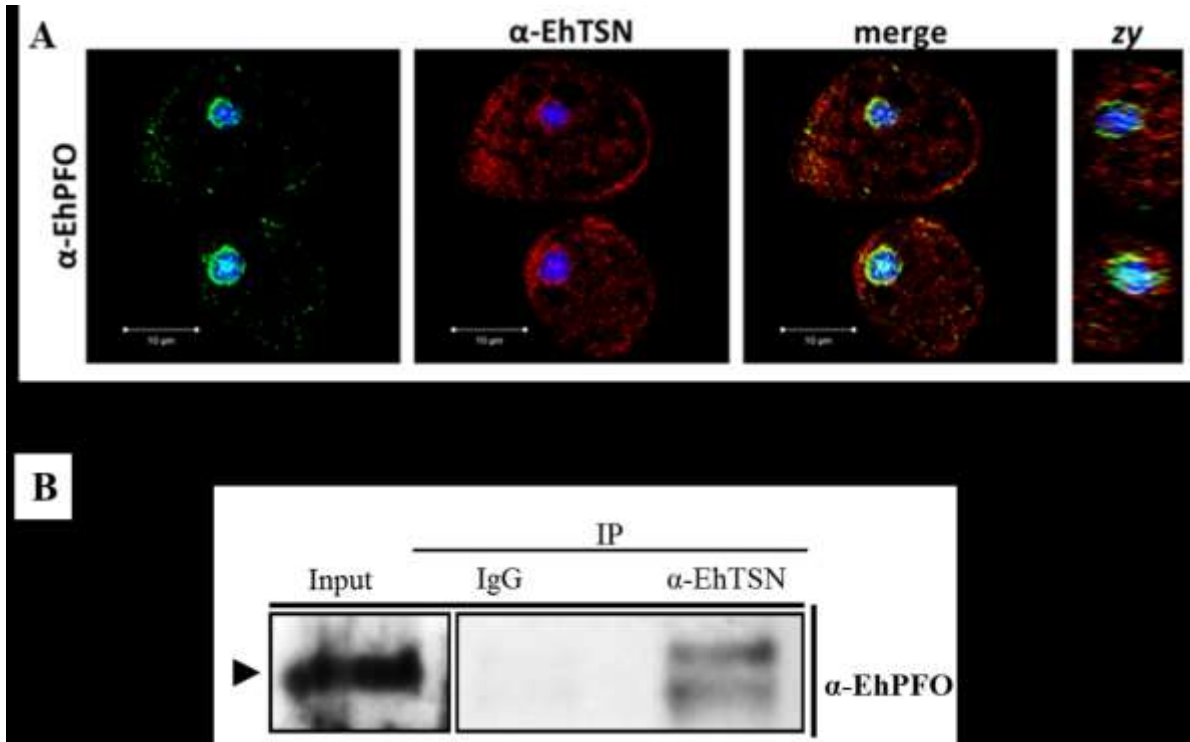
citoesqueleto o que regulan su estructuración, dos tienen la función de realizar o regular la transcripción, tres participan en la respuesta a estrés, tres en la biosíntesis de proteínas, cuatro en la degradación de proteínas y finalmente dos proteínas con función desconocida (Fig. 14A).

Estas proteínas se analizaron en la base de datos STRING 10 para crear una red de proteínas que interactúan con EhTSN. Los resultados sugieren que estas 32 proteínas pueden crear 48 posibles interacciones entre ellas con un valor de  $p$  de  $2.07e^{-10}$  (Fig. 14B). Las interacciones de estas 31 proteínas con EhTSN aún no se han reportados en la base de datos de *E. histolytica*.

### **8.5. EhTSN interactúa con la enzima piruvato:ferredoxina oxidoreductasa de *E. histolytica* (EhPFO)**

Para confirmar las interacciones de EhTSN con algunas de las proteínas detectadas en los ensayos de pull-down y proponer en que procesos biológicos está involucrada EhTSN, realizamos ensayos de co-localización, seleccionando proteínas implicadas en el metabolismo (PFO), eventos de señalización (14-3-3) y respuesta a estrés (HSP70). Para estos ensayos, el reconocimiento de EhPFO se realizó con anticuerpos contra la proteína recombinante (rEhPFO) (Rodríguez et al, 1998)

Los ensayos de inmunofluorescencia mostraron que EhTSN y EhPFO co-localizan en pequeños puntos dispersos en el citoplasma, cercanos o en la membrana y en la periferia nuclear (Fig. 15A). Para confirmar la interacción de EhTSN con EhPFO se realizaron ensayos de inmunoprecipitación con anti EhTSN. Como esperábamos, el anticuerpo contra EhPFO



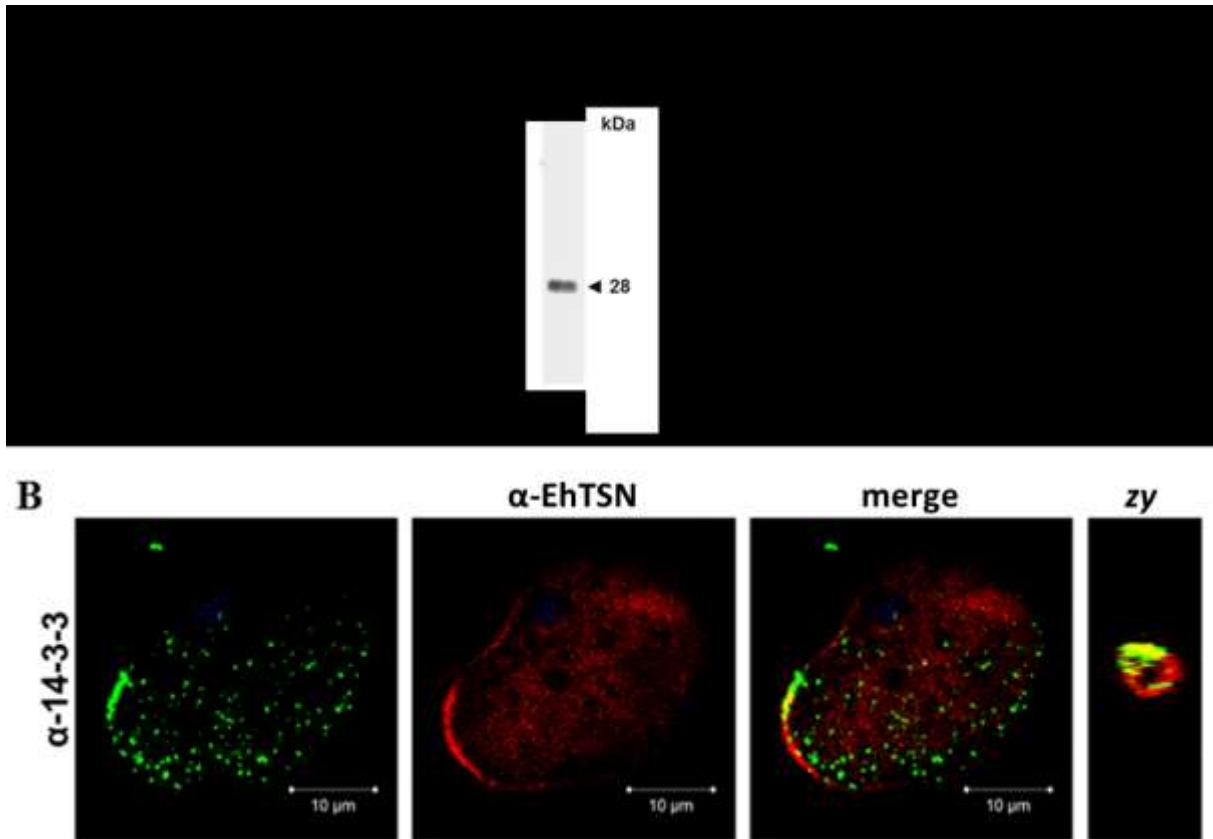
**Figura 15. Asociación de EhTSN con EhPFO.** **A)** Inmunoprecipitación. Los extractos totales de trofozoítos fueron inmunoprecipitados utilizando un anticuerpo anti-EhTSN. Estos complejos inmunoprecipitados se analizaron por Western blot usando anticuerpos contra EhPFO. **B)** Inmunofluorescencia. Los trofozoítos se fijaron, permeabilizaron y se incubaron con anti-EhPFO. Después se incubaron con anti-EhTSN acoplado a Alexa Fluor 555 (rojo). Finalmente, los núcleos se tiñeron con DAPI y las muestras se analizaron en el microscopio confocal. *zy*, se obtuvo del núcleo de la amiba.

detectó a la proteína correspondiente en los complejos inmunoprecipitados con anti EhTSN (Figura 15B). Estos resultados confirman el hallazgo de interacción de EhPFO en los ensayos de pull-down, apoyando la hipótesis de la participación de EhTSN en procesos metabólicos en los trofozoítos de *E. histolytica*.

### **8.6. EhTSN interacciona con la proteína 14-3-3**

Para confirmar la asociación de EhTSN con la proteína 14-3-3 se realizaron ensayos de co-localización mediante inmunofluorescencia utilizando anticuerpos comerciales contra la proteína 14-3-3 de humano. Primero analizamos la especificidad de los anticuerpos mediante ensayos de Western blot sobre extractos totales de trofozoítos. Estos ensayos revelaron el reconocimiento de una sola banda de 28 kDa (Fig. 16A), el peso esperado para la proteína 14-3-3 de *E. histolytica*.

Una vez confirmada la especificidad de los anticuerpos contra 14-3-3, se realizaron los experimentos de inmunofluorescencia, donde se encontró que EhTSN y 14-3-3 co-localizan en algunas regiones de la membrana plasmática y en la periferia nuclear (Fig. 16B). Estos resultados confirmaron los datos obtenidos de los ensayos de pull-down, indicando que existe interacción de EhTSN con 14-3-3 y sugiriendo que EhTSN posiblemente tiene un papel en alguna o en varias de las vías de señalización en las que participa 14-3-3.

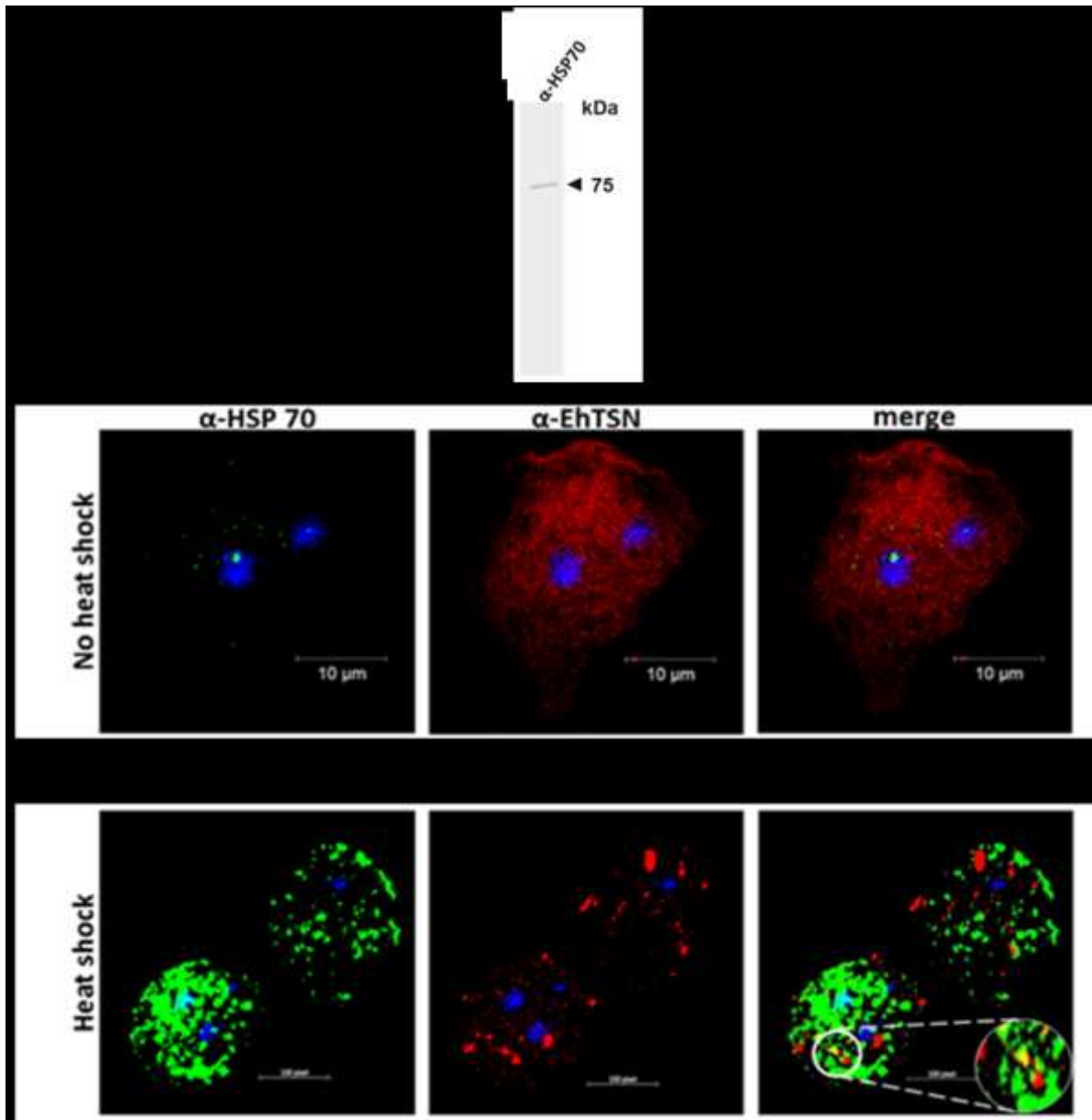


**Figura 16. Asociación de EhTSN con 14-3-3.** **A)** Inmunoreactividad de anticuerpos contra 14-3-3. Extractos totales de trofozoítos de *E. histolytica* se analizaron por Western blot usando anticuerpos contra la proteína de humano 14-3-3. **B)** Inmunofluorescencia. Los trofozoítos se fijaron, permeabilizaron y se incubaron con anti-14-3-3 y subsecuentemente con anti-IgGs de ratón acoplado a Alexa Fluor 488 (verde). Después se incubaron con anti-EhTSN acoplado a Alexa Fluor 555 (rojo). Finalmente, los núcleos se tiñeron con DAPI y las muestras se analizaron en el microscopio confocal. *zy*, se obtuvo del punto de co-localización en la membrana plasmática.

### **8.7. EhTSN se relocaliza en gránulos durante el choque térmico**

Para observar la asociación de EhTSN con HSP70 se utilizaron anticuerpos contra la proteína heteróloga de humano. Los ensayos de Western blot sobre proteínas totales de trofozoítos mostraron que estos anticuerpos reconocen una sola banda de 75 kDa (Fig. 17A), el peso esperado para la proteína HSP70 amibiana. En los experimentos de inmunofluorescencia observamos en trofozoítos crecidos bajo condiciones normales una pequeña expresión de EhHSP70 con algunos sitios de co-localización con EhTSN (Fig. 17B). Sin embargo, cuando los trofozoítos se sometieron a un estrés térmico (2 h a 42 °C), las amibas mostraron una alta expresión de EhHSP70, detectando a esta proteína en estructuras citoplasmáticas (Fig. 17C). Estas estructuras son similares a las reportadas previamente como gránulos de estrés (SG por sus siglas en inglés) (Katz et al, 2014a). De igual manera, en los trofozoítos sometidos a estrés térmico, EhTSN fue concentrada en las estructuras parecidas a SG, co-localizando con EhHSP70 (Fig. 17 C). Estos resultados sugieren que EhTSN tiene un papel durante la respuesta a estrés en los trofozoítos de *E. histolytica*.

Todos estos resultados sugieren que EhTSN participa en la regulación de la expresión génica, metabolismo, señalización y respuesta al estrés en los trofozoítos de *E. histolytica*.



**Figura 17. Asociación de EhTSN con HSP70.** **A)** Inmunoreactividad de anticuerpos contra HSP70. Extractos totales de trofozoítos de *E. histolytica* se analizaron por Western blot usando anticuerpos contra la proteína de humano HSP70. **B)** Inmunofluorescencia de trofozoítos bajo condiciones normales, o **C)** sometidos a choque térmico (42 °C) por 2 h, se fijaron, permeabilizaron y se incubaron con anti-HSP70 y subsecuentemente con anti-IgGs de ratón acoplado a Alexa Fluor 488 (verde). Después se incubaron con anti-EhTSN acoplado a Alexa Fluor 555 (rojo). Finalmente, los núcleos se tiñeron con DAPI y las muestras se analizaron en el microscopio confocal. Circulo blanco, aumento en un posible granulo de estrés.

## 9. DISCUSIÓN

La amibiasis es la infección del tracto gastrointestinal por *E. histolytica* un protozoo parásito que es capaz de invadir la mucosa intestinal y extenderse a otros órganos, principalmente el hígado (Espinosa-Cantellano & Martínez-Palomo, 2000). La amibiasis se considera un problema de salud pública a nivel mundial afectando a países en vías de desarrollo con una morbilidad de 100,000 personas al año (1997; Ali et al, 2008). *E. histolytica* ocasiona daño en el hospedero por medio de diferentes mecanismos moleculares de patogenicidad (Espinosa-Cantellano & Martínez-Palomo, 2000). Estos mecanismos patogénicos están regulados por diferentes factores de virulencia (García-Rivera et al, 1999; Hernández-Alejandro et al, 2013; Loftus et al, 2005; Ocadiz et al, 2005; Petri et al, 1987; Rodríguez et al, 2000), varios de los cuales se han caracterizado. Sin embargo, poco se conoce de los mecanismos de regulación de la expresión genética en este parásito (Hackney et al, 2007).

Previamente se identificó a la proteína que se une a URE1, un motivo regulador en *cis* de la transcripción situado en la región promotora de los genes *EhrabB* y *hgl5* (Calixto-Galvez et al, 2011), cuyos productos de estos genes están involucrados en la virulencia del parásito. Esta proteína, EhTSN, pertenece a la familia de proteínas multifuncionales TSN (también conocidas como SND1, Tudor-SN o p100), y se encuentra en la mayoría de los eucariontes, excepto en *Saccharomyces cerevisiae*, participando en diferentes funciones celulares, como virtualmente en todas las vías de la regulación de la expresión de los genes, esto posiblemente debido a su estructura molecular que incluye a los dominios funcionales Tudor y SNasa, llevando a TSN a interactuar con ácidos nucleicos, proteínas individuales y complejos proteicos (Gutiérrez-Beltrán et al, 2016). Gracias a estas interacciones, TSN está



involucrada virtualmente en todas las vías de la expresión de genes, que van desde la transcripción hasta las modificaciones post-traduccionales (Gutierrez-Beltran et al, 2016).

Previamente se caracterizó a EhTSN como un activador de la transcripción de *EhrabB* que se une al motivo URE1 en la región promotora de este gen (Calixto-Galvez et al, 2011). En este trabajo también se encontró que este motivo regulador URE1 está presente en la región promotora de otros genes relacionados con virulencia, eventos de señalización, metabolismo, tráfico vesicular, antígenos de superficie y otros procesos celulares como ciclo celular (Tabla 3, Fig. 8), sugiriendo que el papel de EhTSN como activador transcripcional está relacionado con mecanismos patogénicos, supervivencia y proliferación de *E. histolytica*. Además, detectamos a EhTSN en regiones de eucromatina y cerca, pero no dentro, de la cromatina condensada (Fig. 10), en regiones similares a las que en otras células se ha propuesto como “fábricas de transcripción” (Fedorova & Zink, 2008). En adición a esto, también encontramos que EhTSN se asocia con la subunidad  $\beta$  de la RNAPol II y de la RNAPol III y también con EhBP1 (Enhancer-binding protein 1) (Fig. 12 y Tabla 4), uno de los factores de transcripción que se une al motivo URE4 (Schaenman et al, 2001), el cual también es un motivo de activación en *cis* para la transcripción del gen *hgl5* (Purdy et al, 1996). Todos estos resultados confirman la hipótesis de que EhTSN está involucrada en la regulación de la transcripción de este parásito.

Otra de las maneras en que EhTSN puede regular la transcripción, es por medio de una asociación con proteínas metiladas, ya que se ha demostrado que esta proteína tiene un “bolsillo” o “pocket” aromático que permite la unión a los grupos metilos de proteínas metiladas (Shaw et al, 2007). En concordancia, al ocurrir la unión de los factores de transcripción al DNA se recluta también una gran variedad de co-activadores, como las

proteínas metiltransferasas de argininas (PRMT's), las cuales realizan la metilación de histonas ocasionando un re-arreglo de la cromatina (Borbolla-Vazquez et al, 2015). Además, las PRMT's también metilan proteínas no-histonas que participan en la transcripción y otros eventos celulares (Bedford & Clarke, 2009a). Aquí, demostramos la presencia de EhPRMT-A en un complejo inmunoprecipitado con EhTSN y la co-localización de ambas proteínas en el núcleo y citoplasma del trofozoíto (Fig.12), sugiriendo que la asociación de EhTSN con proteínas (histonas y/o no-histonas) metiladas por EhPRMT-A puede estar implicada en la regulación de la expresión génica a diferentes niveles, como la transcripción, , así como en otras funciones celulares, como la señalización y translocación de proteínas (Fig. 18), eventos en los cuales la metilación de proteínas está involucrada (Bedford & Clarke, 2009a; Morita et al, 2013; Musiyenko et al, 2012).

EhTSN también se localiza en el citoplasma, membrana plasmática y en la membrana de pequeñas vesículas citoplasmáticas de los trofozoítos (Fig. 9). Observando, que la proteína EhTSN citoplasmática conserva, al menos parcialmente, la habilidad de interactuar con el motivo URE1 (Fig. 11), sugiriendo que la proteína citoplasmática posiblemente sea un factor de transcripción potencial que requiere de algunas modificaciones post-traduccionales, como la fosforilación y/o dimerización para ser translocado al núcleo, como ocurre con otros factores de transcripción (Reich & Liu, 2006; Van Der Heide et al, 2004). Una de las asociaciones de EhTSN detectadas en este trabajo fue con la proteína que pertenece a la familia 14-3-3 (Tabla 4), cuyos miembros en otros sistemas regulan una variedad de procesos a través de una asociación directa con proteínas que son fosforiladas en serinas/treoninas (Morrison, 2009). En *E. histolytica*, 14-3-3 puede estar reteniendo en el citoplasma a EhTSN evitando que se transloque al núcleo y que actúe como activador transcripcional (Fig. 18),

como se ha demostrado para BZR1 y bZIP (Gampala et al, 2007; Igarashi et al, 2001). Alternativamente, 14-3-3 puede actuar como un co-activador transcripcional de EhTSN (Fig.18), debido a que se ha demostrado en otros sistemas la asociación de 14-3-3 con proteínas de unión al DNA que participan en la activación de la transcripción a través del contacto con el complejo de pre-iniciación de la transcripción (Pan et al, 1999).

Por otro lado, EhTSN citoplasmática también puede participar en otras funciones gracias a su capacidad de formar complejos con otras proteínas involucradas en diferentes procesos celulares, como el control de la viabilidad celular bajo condiciones de estrés, entre otras (Fig. 18). Se ha propuesto que después de la percepción de condiciones de estrés, TSN se relocaliza en gránulos citoplasmáticos para: (i) suprimir la transcripción; y (ii) reprimir vías específicas, debido a la re-distribución de TSN evitando la asociación con otras proteínas y así reprimiendo su papel multifuncional (Gutierrez-Beltran et al, 2016). En este trabajo, identificamos a EhHSP70 como una proteína asociada a EhTSN. En trofozoítos crecidos bajo condiciones normales, EhHSP70 muestra una baja expresión, así como poca asociación con EhTSN (Fig. 17). Interesantemente, la localización nuclear de EhTSN disminuye en trofozoítos sujetos a estrés térmico, re-localizándose y acumulándose en asociación con EhHSP70 (Fig. 17) en estructuras similares a las previamente reportadas como gránulos de estrés (SGs) (Katz et al, 2014b). También encontramos que EhTSN se asocia a tioredoxina reductasa y a peroxiredoxina (Tabla 4), enzimas que ayudan a prevenir el daño causado por el estrés oxidativo en los trofozoítos (Arias et al, 2012; Jeelani & Nozaki, 2016). Con esto hipotetizamos que los trofozoítos bajo condiciones de estrés provocan el secuestro de EhTSN en los gránulos de estrés (Fig. 18), evitando sus diversas funciones, ayudando así a la adaptación y supervivencia de los trofozoítos en dichas condiciones.

También se ha propuesto que bajo tiempos prolongados de estrés se induce la degradación EhTSN, inhabilitando su papel pro-supervivencia y disparando la muerte celular (Gutierrez-Beltran et al, 2016). De igual forma, en este trabajo detectamos la asociación de EhTSN con la subunidad  $\alpha$  del proteosoma (Tabla 4), sugiriendo la posible degradación de EhTSN por el proteosoma bajo largos periodos de estrés (Fig. 18). En concordancia con esto, también se ha reportado la asociación de TSN con la subunidad  $\alpha$  del proteosoma en el carcinoma hepatocelular, conduciendo a esta proteína a una degradación (Rajasekaran et al, 2016).

En nuestros ensayos de pull-down, también encontramos asociación de EhTSN con proteínas relacionadas al citoesqueleto (Tabla 4). Esta asociación concuerda con una de las funciones de TSN en plantas, siendo identificada como una proteína localizada en el citoesqueleto en el arroz y la planta del chicharo (Sami-Subbu et al, 2001). Una de las principales características de TSN es la interacción con el RNA, y su localización en el citoesqueleto se cree que está involucrada con el transporte y/o traducción de éste (Abe et al, 2003; Sami-Subbu et al, 2001). Al momento desconocemos si EhTSN se une al RNA, sin embargo, debido a que las proteínas TSN de diferentes organismos tienen esta capacidad (Gao et al, 2015; Yan et al, 2014), postulamos que EhTSN posiblemente también tiene un papel en el transporte del RNA (Fig. 18).

Otras proteínas asociadas a EhTSN, detectadas en los ensayos de pull-down, son la lectina Gal/GalNac, una glicoproteína de anclaje a acil-glicosil-fosfatidilinositol (GPI) involucrada en la adherencia (Aguirre Garcia et al, 2015), y una proteína involucrada en el tráfico de membranas debido a su propiedad de unión a fosfolípidos (copina) (Tabla 4). Interesantemente, ya ha sido reportado que TSN de carcinoma hepatocelular se asocia a la

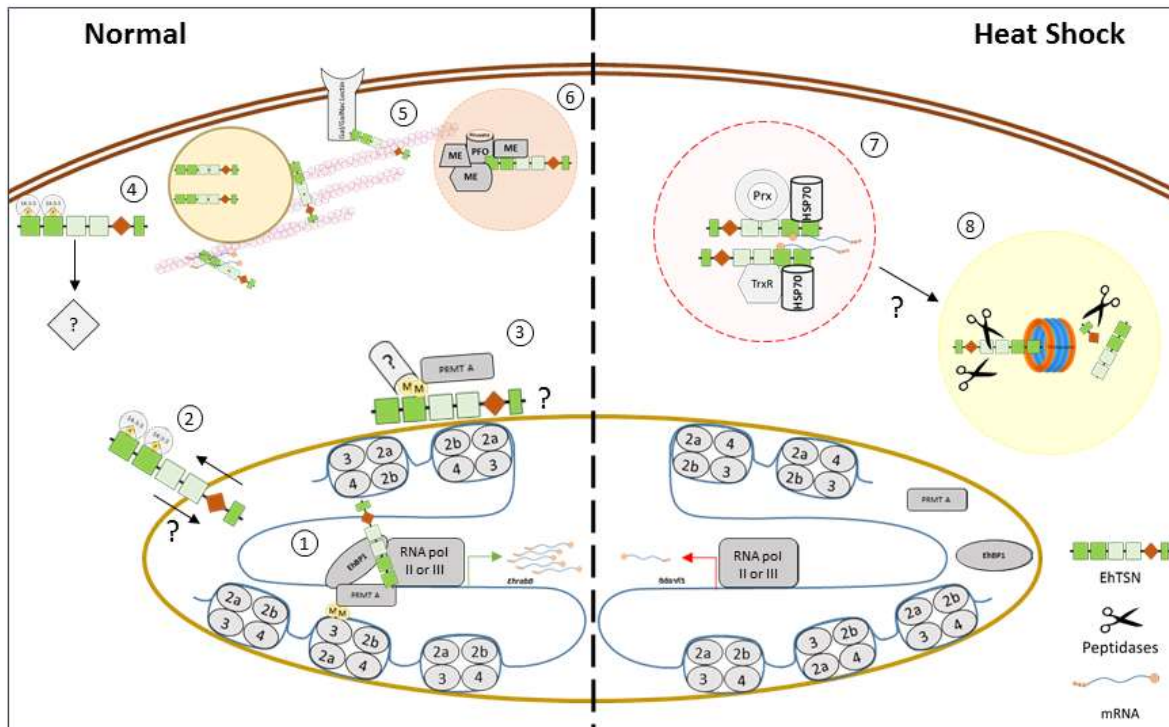
galectina 3 (una lectina) y a acilglicoreceptores (Rajasekaran et al, 2016), pero aún no ha sido investigada la función celular implicada en esta asociación. Debido a la asociación de EhTSN al citoesqueleto proponemos que esta proteína también pudiera participar en el transporte de proteínas de anclaje a fosfolípidos hacia la membrana plasmática (Fig. 18).

Por último, en los ensayos de pull-down, la mayoría de las proteínas encontradas en asociación con EhTSN están involucradas en el metabolismo y producción de energía (Tabla 4). Se sabe muy poco acerca del papel de TSN en estos procesos celulares en otros organismos, sin embargo, Rajasekaran *et al.* (2016) identificaron en carcinoma hepatocelular la asociación de TSN con algunas enzimas que participan en la transferencia de electrones. Nuestros resultados muestran la asociación de EhTSN con enzimas involucradas en la glicolisis y producción de energía, como EhPFO, enzima que es esencial para el metabolismo energético de *E. histolytica* (Pineda et al, 2010). Mediante ensayos de co-localización y de inmunoprecipitación confirmamos la asociación de EhTSN con EhPFO (Fig. 15), apoyando la hipótesis de que EhTSN tiene algún papel en algunos procesos metabólicos de este parásito. Posiblemente EhTSN actúa como una proteína de andamiaje, asociándose a varios miembros de las vías glicolítica y de producción de energía (Fig. 18), formando un complejo que aumenta la eficiencia metabólica.

Aunque la mayoría de las funciones descritas para TSN están presentes en la mayoría de los eucariontes, no existe una conservación estricta de todas sus funciones en los diferentes reinos. Por ejemplo, en plantas, TSN se encuentra exclusivamente en el citoplasma, indicando que no participa en eventos de transcripción y “splicing” (Gutierrez-Beltran et al, 2016). En el caso de *E. histolytica*, nosotros no detectamos asociación de EhTSN con proteínas involucradas en el “splicing” o en el complejo de silenciamiento inducido por RNA

(RISC por sus siglas en ingles), procesos en donde TSN tiene un importante papel en otros organismos, incluidos algunos protozoarios (Hossain et al, 2010; Musiyenko et al, 2012). Estos resultados sugieren que posiblemente EhTSN no participe en estos eventos moleculares. Alternativamente, una de las posibles causas por las que no encontramos asociación al “spliceosoma” o a RISC es que para ello se requieran algunas modificaciones post-traduccionales en EhTSN, las cuales no están presentes en la proteína recombinante usada para los ensayos de pull-down. Por otro lado, se ha reportado que TSN está involucrada en el mecanismo de muerte celular programada, debido a un sitio de corte por caspasas o metacaspasas, siendo un mecanismo evolutivamente conservado en la apoptosis (Gutierrez-Beltran et al, 2016). En *E. histolytica* aún no se han reportado actividad enzimática por caspasas o metacaspasas (Nandi et al, 2010); así, si la proteólisis de EhTSN tiene un papel en la muerte celular programada en *E. histolytica*, ésta debe llevarse a cabo por otras proteasas, entre las cuales pueden estar las proteasas como dipeptidasas y endopeptidasas detectadas en los ensayos de pull-down (Tabla 4).

La confirmación del papel multifuncional de EhTSN podría probarse mediante el silenciamiento de la expresión de EhTSN. Sin embargo, en un trabajo previo (datos no mostrados) realizado en colaboración con el Dr. David Mirelman del Weizmann Institute of Science en Israel se intentó sin éxito el silenciamiento epigenético de EhTSN mediante el sistema que utiliza la cepa G3 (Mirelman et al, 2006), lo que indica que esta proteína es esencial para *E. histolytica*, probablemente debido a su importante participación en la expresión genética, metabolismo y respuesta a estrés, entre otros procesos celulares.



**Figura 18. Participación de EhTSN en varios procesos biológicos.** Nuestros resultados sugieren que bajo condiciones normales EhTSN participa en 1) regulación de la transcripción, por su habilidad de interactuar con el DNA y otras proteínas del complejo de pre-iniciación, como RNAPol II, RNAPol III, factores de transcripción (como EhBP1), EhPRMT-A y 14-3-3, entre otros. Alternativamente, la asociación de EhTSN con 2) 14-3-3 o 3) EhPRMT-A puede inhibir o promover el transporte nuclear de EhTSN, manteniéndolo como un factor de transcripción inactivo o activo, respectivamente, 4) la asociación con 14-3-3 también se observó cerca de la membrana, posiblemente participando en eventos de señalización. 5) Por su asociación con el citoesqueleto EhTSN puede participar en el transporte intracelular de RNA o proteínas (como la lectina Gal/GalNAc). 6) Finalmente EhTSN bajo las mismas condiciones posiblemente también participa como una proteína de andamiaje asociándose a EhPFO y otras enzimas en complejos para potenciar la glucólisis y producción de energía. Por otra parte, bajo condiciones de estrés, 7) EhTSN puede ser secuestrada en gránulos de estrés, al igual que HSP70 y/o otras proteínas involucradas en la respuesta al estrés oxidativo, evitando así sus funciones normales. Si las condiciones de estrés son prolongadas, 8) EhTSN puede ser degradada por la vía del proteosoma. ME= enzimas metabólicas, Prx= Peroxirredoxina, TrxR= Tioeredoxina reductasa, M= grupo metilo, P= grupo fosfato.

## 10. CONCLUSIONES

- 1) EhTSN participa en la regulación transcripcional de *E. histolytica*, ya que:
  - a) El motivo URE1, al cual se une EhTSN, se detectó en la región promotora de genes involucrados en diversos eventos celulares, como metabolismo, señalización y tráfico vesicular, entre otros.
  - b) EhTSN nuclear se localiza en regiones de eucromatina posiblemente las denominadas “fábricas de transcripción”.
  - c) EhTSN se asocia con con la RNA polimerasa II y la RNA polimerasa III.
- 2) EhTSN citoplásmica tiene la capacidad de unirse al motivo URE1y se localiza en diferentes compartimentos.
- 3) EhTSN se asocia con proteínas involucradas en diversos procesos celulares, sugiriendo un papel multifuncional.
- 4) EhTSN se relocaliza en gránulos de estrés y se asocia con HSP70 durante el choque térmico, sugiriendo un papel importante en la respuesta a estrés.

En resumen, en este trabajo reportamos evidencias de que EhTSN es una proteína multifuncional en *E. histolytica*, incluyendo la regulación transcripcional, el metabolismo y la respuesta a estrés.



## 11. PERSPECTIVAS

- 1) Analizar la participación de EhTSN en la transcripción de genes que presentan el motivo URE1 en su región promotora.
- 2) Identificar la interacción de la proteína EhTSN en las regiones promotoras que contiene el motivo URE1
- 3) Evaluar la participación de EhTSN en la regulación de la expresión génica en trofozoítos sometidos a diferentes condiciones de estrés.
- 4) Evaluar el efecto del silenciamiento transitorio de EhTSN en la biología de *E. histolytica*.

## 12. BIBLIOGRAFÍA

(1997) WHO/PAHO/UNESCO report. A consultation with experts on amoebiasis. Mexico City, Mexico 28-29 January, 1997. *Epidemiological bulletin* **18**: 13-14

Abe S, Sakai M, Yagi K, Hagino T, Ochi K, Shibata K, Davies E (2003) A Tudor protein with multiple SNc domains from pea seedlings: cellular localization, partial characterization, sequence analysis, and phylogenetic relationships. *Journal of experimental botany* **54**: 971-983

Aguirre Garcia M, Gutierrez-Kobeh L, Lopez Vancell R (2015) Entamoeba histolytica: adhesins and lectins in the trophozoite surface. *Molecules* **20**: 2802-2815

Akbar MA, Chatterjee NS, Sen P, Debnath A, Pal A, Bera T, Das P (2004) Genes induced by a high-oxygen environment in Entamoeba histolytica. *Molecular and biochemical parasitology* **133**: 187-196

Ali IK, Clark CG, Petri WA, Jr. (2008) Molecular epidemiology of amebiasis. *Infection, genetics and evolution : journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases* **8**: 698-707

Arias DG, Regner EL, Iglesias AA, Guerrero SA (2012) Entamoeba histolytica thioredoxin reductase: molecular and functional characterization of its atypical properties. *Biochimica et biophysica acta* **1820**: 1859-1866

Azuara-Liceaga E, Flores-Soto E, Lopez-Camarillo C, Orozco E (2005) Entamoeba histolytica: structural and functional analysis of the Ehadh12 gene promoter. *Experimental parasitology* **110**: 280-285

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

Bedford MT, Clarke SG (2009b) Protein Arginine Methylation in Mammals: Who, What, and Why. *Mol Cell* **33**: 1-13

Betanzos A, Javier-Reyna R, Garcia-Rivera G, Banuelos C, Gonzalez-Mariscal L, Schnoor M, Orozco E (2013) The EhCPADH12 complex of Entamoeba histolytica interacts with

tight junction proteins occludin and claudin-1 to produce epithelial damage. *PloS one* **8**: e65100

Biller L, Matthiesen J, Kuhne V, Lotter H, Handal G, Nozaki T, Saito-Nakano Y, Schumann M, Roeder T, Tannich E, Krause E, Bruchhaus I (2014) The cell surface proteome of *Entamoeba histolytica*. *Molecular & cellular proteomics : MCP* **13**: 132-144

Borbolla-Vazquez J, Orozco E, Betanzos A, Rodriguez MA (2015) *Entamoeba histolytica*: protein arginine transferase 1a methylates arginine residues and potentially modify the H4 histone. *Parasite Vector* **8**

Bruchhaus I, Roeder T, Lotter H, Schwerdtfeger M, Tannich E (2002) Differential gene expression in *Entamoeba histolytica* isolated from amoebic liver abscess. *Molecular microbiology* **44**: 1063-1072

Brymora A, Valova VA, Robinson PJ (2004) Protein-protein interactions identified by pull-down experiments and mass spectrometry. *Current protocols in cell biology* **Chapter 17**: Unit 17 15

Caballero-Salcedo A, Viveros-Rogel M, Salvatierra B, Tapia-Conyer R, Sepulveda-Amor J, Gutierrez G, Ortiz-Ortiz L (1994) Seroepidemiology of amebiasis in Mexico. *The American journal of tropical medicine and hygiene* **50**: 412-419

Calixto-Galvez M, Romero-Diaz M, Garcia-Munoz A, Salas-Casas A, Pais-Morales J, Galvan IJ, Orozco E, Rodriguez MA (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

Callebaut I, Mornon JP (1997) The human EBNA-2 coactivator p100: multidomain organization and relationship to the staphylococcal nuclease fold and to the tudor protein involved in *Drosophila melanogaster* development. *The Biochemical journal* **321 ( Pt 1)**: 125-132

Caudy AA, Ketting RF, Hammond SM, Denli AM, Bathoorn AM, Tops BB, Silva JM, Myers MM, Hannon GJ, Plasterk RH (2003) A micrococcal nuclease homologue in RNAi effector complexes. *Nature* **425**: 411-414

Cavalier-Smith T (1993) Kingdom protozoa and its 18 phyla. *Microbiological reviews* **57**: 953-994

Christy NC, Petri WA, Jr. (2011) Mechanisms of adherence, cytotoxicity and phagocytosis modulate the pathogenesis of *Entamoeba histolytica*. *Future microbiology* **6**: 1501-1519

Diamond LS, Harlow DR, Cunnick CC (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

Ehrenkaufer GM, Singh U (2008) Transcriptional regulatory networks in *Entamoeba histolytica*. *Current drug targets* **9**: 931-937

Eichinger D (2001) A role for a galactose lectin and its ligands during encystment of *Entamoeba*. *The Journal of eukaryotic microbiology* **48**: 17-21

Espinosa-Cantellano M, Martinez-Palomo A (2000) Pathogenesis of intestinal amebiasis: from molecules to disease. *Clinical microbiology reviews* **13**: 318-331

Fedorova E, Zink D (2008) Nuclear architecture and gene regulation. *Biochimica et biophysica acta* **1783**: 2174-2184

Flores-Soto E, Azuara-Liceaga E, Lopez-Camarillo C, Orozco E (2005) The *Entamoeba histolytica* Ehcp112 gene has a distal and weak promoter. *Experimental parasitology* **110**: 286-291

Gampala SS, Kim TW, He JX, Tang W, Deng Z, Bai MY, Guan S, Lalonde S, Sun Y, Gendron JM, Chen H, Shibagaki N, Ferl RJ, Ehrhardt D, Chong K, Burlingame AL, Wang ZY (2007) An essential role for 14-3-3 proteins in brassinosteroid signal transduction in *Arabidopsis*. *Developmental cell* **13**: 177-189

Gao X, Fu X, Song J, Zhang Y, Cui X, Su C, Ge L, Shao J, Xin L, Saarikettu J, Mei M, Yang X, Wei M, Silvennoinen O, Yao Z, He J, Yang J (2015) Poly(A)(+) mRNA-binding protein Tudor-SN regulates stress granules aggregation dynamics. *The FEBS journal* **282**: 874-890

Gao X, Shi X, Fu X, Ge L, Zhang Y, Su C, Yang X, Silvennoinen O, Yao Z, He J, Wei M, Yang J (2014) Human Tudor staphylococcal nuclease (Tudor-SN) protein modulates the kinetics of AGTR1-3'UTR granule formation. *FEBS letters* **588**: 2154-2161

Garcia-Rivera G, Rodriguez MA, Ocadiz R, Martinez-Lopez MC, Arroyo R, Gonzalez-Robles A, Orozco E (1999) Entamoeba histolytica : a novel cysteine protease and an adhesin form the 112 kDa surface protein. *Molecular microbiology* **33**: 556-568

Ghosh S, Frisardi M, Ramirez-Avila L, Descoteaux S, Sturm-Ramirez K, Newton-Sanchez OA, Santos-Preciado JI, Ganguly C, Lohia A, Reed S, Samuelson J (2000) Molecular epidemiology of Entamoeba spp.: evidence of a bottleneck (Demographic sweep) and transcontinental spread of diploid parasites. *Journal of clinical microbiology* **38**: 3815-3821

Gilchrist CA, Holm CF, Hughes MA, Schaenman JM, Mann BJ, Petri WA, 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

Gilchrist CA, Mann BJ, Petri WA, Jr. (1998) Control of ferredoxin and Gal/GalNAc lectin gene expression in Entamoeba histolytica by a cis-acting DNA sequence. *Infection and immunity* **66**: 2383-2386

Gomez-Arreaza A, Acosta H, Quinones W, Concepcion JL, Michels PA, Avilan L (2014) Extracellular functions of glycolytic enzymes of parasites: unpredicted use of ancient proteins. *Molecular and biochemical parasitology* **193**: 75-81

Gutierrez-Beltran E, Denisenko TV, Zhivotovsky B, Bozhkov PV (2016) Tudor staphylococcal nuclease: biochemistry and functions. *Cell Death Differ* **23**: 1739-1748

Hackney JA, Ehrenkauf GM, Singh U (2007) Identification of putative transcriptional regulatory networks in Entamoeba histolytica using Bayesian inference. *Nucleic acids research* **35**: 2141-2152

Haque R, Huston CD, Hughes M, Houghton E, Petri WA, Jr. (2003a) Amebiasis. *The New England journal of medicine* **348**: 1565-1573

Haque R, Mondal D, Kirkpatrick BD, Akther S, Farr BM, Sack RB, Petri WA, Jr. (2003b) Epidemiologic and clinical characteristics of acute diarrhea with emphasis on Entamoeba histolytica infections in preschool children in an urban slum of Dhaka, Bangladesh. *The American journal of tropical medicine and hygiene* **69**: 398-405

Hernandes-Alejandro M, Calixto-Galvez M, Lopez-Reyes I, Salas-Casas A, Cazares-Apatiga J, Orozco E, Rodriguez MA (2013) The small GTPase EhRabB of *Entamoeba histolytica* is differentially expressed during phagocytosis. *Parasitology research* **112**: 1631-1640

Hossain MJ, Korde R, Singh PK, Kanodia S, Ranjan R, Ram G, Kalsey GS, Singh R, Malhotra P (2010) *Plasmodium falciparum* Tudor Staphylococcal Nuclease interacting proteins suggest its role in nuclear as well as splicing processes. *Gene* **468**: 48-57

Hughes MA, Petri WA, Jr. (2000) Amebic liver abscess. *Infectious disease clinics of North America* **14**: 565-582, viii

Igarashi D, Ishida S, Fukazawa J, Takahashi Y (2001) 14-3-3 proteins regulate intracellular localization of the bZIP transcriptional activator RSG. *The Plant cell* **13**: 2483-2497

Jariwala N, Rajasekaran D, Srivastava J, Gredler R, Akiel MA, Robertson CL, Emdad L, Fisher PB, Sarkar D (2015) Role of the staphylococcal nuclease and tudor domain containing 1 in oncogenesis. *Int J Oncol* **46**: 465-473

Jeelani G, Nozaki T (2016) *Entamoeba* thiol-based redox metabolism: A potential target for drug development. *Molecular and biochemical parasitology* **206**: 39-45

Katz S, Trebicz-Geffen M, Ankri S (2014a) Stress granule formation in *Entamoeba histolytica*: cross-talk between EhMLBP, EhRLE3 reverse transcriptase and polyubiquitinated proteins. *Cell Microbiol* **16**: 1211-1223

Katz S, Trebicz-Geffen M, Ankri S (2014b) Stress granule formation in *Entamoeba histolytica*: cross-talk between EhMLBP, EhRLE3 reverse transcriptase and polyubiquitinated proteins. *Cell Microbiol* **16**: 1211-1223

Kissoon-Singh V, Moreau F, Trusevych E, Chadee K (2013) *Entamoeba histolytica* exacerbates epithelial tight junction permeability and proinflammatory responses in Muc2(-/-) mice. *The American journal of pathology* **182**: 852-865

Lejeune M, Moreau F, Chadee K (2011) Prostaglandin E2 produced by *Entamoeba histolytica* signals via EP4 receptor and alters claudin-4 to increase ion permeability of tight junctions. *The American journal of pathology* **179**: 807-818

Leroy A, Lauwaet T, De Bruyne G, Cornelissen M, Mareel M (2000) Entamoeba histolytica disturbs the tight junction complex in human enteric T84 cell layers. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* **14**: 1139-1146

Levenson JD, Koskinen PJ, Orrico FC, Rainio EM, Jalkanen KJ, Dash AB, Eisenman RN, Ness SA (1998) Pim-1 kinase and p100 cooperate to enhance c-Myb activity. *Mol Cell* **2**: 417-425

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

Lorenzi HA, Puiu D, Miller JR, Brinkac LM, Amedeo P, Hall N, Caler EV (2010) New assembly, reannotation and analysis of the Entamoeba histolytica genome reveal new genomic features and protein content information. *PLoS neglected tropical diseases* **4**: e716

Luna-Arias JP, Hernandez-Rivas R, de Dios-Bravo G, Garcia J, Mendoza L, 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

Marchat LA, Gomez C, Perez DG, Paz F, Mendoza L, Orozco E (2002) Two CCAAT/enhancer binding protein sites are cis-activator elements of the Entamoeba histolytica EhPgp1 (mdr-like) gene expression. *Cell Microbiol* **4**: 725-737

Marie C, Petri WA, Jr. (2014) Regulation of virulence of Entamoeba histolytica. *Annual review of microbiology* **68**: 493-520

Martinez-Higuera A, Salas-Casas A, Calixto-Galvez M, Chavez-Munguia B, Perez-Ishiwara DG, Ximenez C, Rodriguez MA (2013) Identification of calcium-transporting ATPases of Entamoeba histolytica and cellular localization of the putative SERCA. *Experimental parasitology* **135**: 79-86

McGowan K, Kane A, Asarkof N, Wicks J, Guerina V, Kellum J, Baron S, Gintzler AR, Donowitz M (1983) *Entamoeba histolytica* causes intestinal secretion: role of serotonin. *Science* **221**: 762-764

McGowan K, Piver G, Stoff JS, Donowitz M (1990) Role of prostaglandins and calcium in the effects of *Entamoeba histolytica* on colonic electrolyte transport. *Gastroenterology* **98**: 873-880

Medina-Gomez C (2015) Caracterización de las proteínas metiltransferasas de arginina PRMT-5 y PRMT-A de *Entamoeba histolytica*. Infectómica y Patogénesis Molecular CINVESTAV,

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

Meneses E, Cardenas H, Zarate S, Briebe LG, Orozco E, Lopez-Camarillo C, Azuara-Liceaga E (2010) The R2R3 Myb protein family in *Entamoeba histolytica*. *Gene* **455**: 32-42

Min KW, Lee SH, Baek SJ (2016) Moonlighting proteins in cancer. *Cancer letters* **370**: 108-116

Mirelman D, Anbar M, Nuchamowitz Y, Bracha R (2006) Epigenetic silencing of gene expression in *Entamoeba histolytica*. *Archives of medical research* **37**: 226-233

Moncada D, Keller K, Chadee K (2005) *Entamoeba histolytica*-secreted products degrade colonic mucin oligosaccharides. *Infection and immunity* **73**: 3790-3793

Morita Y, Shibutani T, Nakanishi N, Nishikura K, Iwai S, Kuraoka I (2013) Human endonuclease V is a ribonuclease specific for inosine-containing RNA. *Nature communications* **4**: 2273

Morrison DK (2009) The 14-3-3 proteins: integrators of diverse signaling cues that impact cell fate and cancer development. *Trends in cell biology* **19**: 16-23

Musiyenko A, Majumdar T, Andrews J, Adams B, Barik S (2012) PRMT1 methylates the single Argonaute of *Toxoplasma gondii* and is important for the recruitment of Tudor



nuclease for target RNA cleavage by antisense guide RNA. *Cellular microbiology* **14**: 882-901

Nandi N, Sen A, Banerjee R, Kumar S, Kumar V, Ghosh AN, Das P (2010) Hydrogen peroxide induces apoptosis-like death in *Entamoeba histolytica* trophozoites. *Microbiology* **156**: 1926-1941

Nestler EJ (2009) *Molecular neuropharmacology: a foundation for clinical neuroscience*, 2 edn. New York.

Ocadiz R, Orozco E, Carrillo E, Quintas LI, Ortega-Lopez J, Garcia-Perez RM, Sanchez T, Castillo-Juarez BA, Garcia-Rivera G, Rodriguez MA (2005) EhCP112 is an *Entamoeba histolytica* secreted cysteine protease that may be involved in the parasite-virulence. *Cellular microbiology* **7**: 221-232

Okada M, Huston CD, Oue M, Mann BJ, Petri WA, Jr., Kita K, Nozaki T (2006) Kinetics and strain variation of phagosome proteins of *Entamoeba histolytica* by proteomic analysis. *Molecular and biochemical parasitology* **145**: 171-183

Orozco E, Guarneros G, Martinez-Palomo A, Sanchez T (1983) *Entamoeba histolytica*. Phagocytosis as a virulence factor. *The Journal of experimental medicine* **158**: 1511-1521

Pan S, Sehnke PC, Ferl RJ, Gurley WB (1999) Specific interactions with TBP and TFIIB in vitro suggest that 14-3-3 proteins may participate in the regulation of transcription when part of a DNA binding complex. *The Plant cell* **11**: 1591-1602

Paukku K, Yang J, Silvennoinen O (2003) Tudor and nuclease-like domains containing protein p100 function as coactivators for signal transducer and activator of transcription 5. *Molecular endocrinology* **17**: 1805-1814

Pearson RJ, Singh U (2010) Approaches to characterizing *Entamoeba histolytica* transcriptional regulation. *Cell Microbiol* **12**: 1681-1690

Perez DG, Gomez C, Lopez-Bayghen E, Tannich E, Orozco E (1998) Transcriptional analysis of the EhPgp5 promoter of *Entamoeba histolytica* multidrug-resistant mutant. *The Journal of biological chemistry* **273**: 7285-7292

Petri WA, Jr. (2002) Pathogenesis of amebiasis. *Current opinion in microbiology* **5**: 443-447

Petri WA, Jr., Haque R, Mann BJ (2002) The bittersweet interface of parasite and host: lectin-carbohydrate interactions during human invasion by the parasite *Entamoeba histolytica*. *Annual review of microbiology* **56**: 39-64

Petri WA, Jr., Smith RD, Schlesinger PH, Murphy CF, Ravdin JI (1987) Isolation of the galactose-binding lectin that mediates the in vitro adherence of *Entamoeba histolytica*. *The Journal of clinical investigation* **80**: 1238-1244

Pineda E, Encalada R, Rodriguez-Zavala JS, Olivos-Garcia A, Moreno-Sanchez R, Saavedra E (2010) Pyruvate:ferredoxin oxidoreductase and bifunctional aldehyde-alcohol dehydrogenase are essential for energy metabolism under oxidative stress in *Entamoeba histolytica*. *The FEBS journal* **277**: 3382-3395

Ponting CP (1997) P100, a transcriptional coactivator, is a human homologue of staphylococcal nuclease. *Protein science : a publication of the Protein Society* **6**: 459-463

Purdy JE, Pho LT, Mann BJ, Petri WA, Jr. (1996) Upstream regulatory elements controlling expression of the *Entamoeba histolytica* lectin. *Molecular and biochemical parasitology* **78**: 91-103

Rabinowitz S, Horstmann H, Gordon S, Griffiths G (1992) Immunocytochemical characterization of the endocytic and phagolysosomal compartments in peritoneal macrophages. *The Journal of cell biology* **116**: 95-112

Rajasekaran D, Jariwala N, Mendoza RG, Robertson CL, Akiel MA, Dozmorov M, Fisher PB, Sarkar D (2016) Staphylococcal Nuclease and Tudor Domain Containing 1 (SND1 Protein) Promotes Hepatocarcinogenesis by Inhibiting Monoglyceride Lipase (MGLL). *The Journal of biological chemistry* **291**: 10736-10746

Ralston KS, Petri WA, Jr. (2011) Tissue destruction and invasion by *Entamoeba histolytica*. *Trends in parasitology* **27**: 254-263

Ralston KS, Solga MD, Mackey-Lawrence NM, Somlata, Bhattacharya A, Petri WA, Jr. (2014) Trophocytosis by *Entamoeba histolytica* contributes to cell killing and tissue invasion. *Nature* **508**: 526-530

Ravdin JI, Guerrant RL (1981) Role of adherence in cytopathogenic mechanisms of *Entamoeba histolytica*. Study with mammalian tissue culture cells and human erythrocytes. *The Journal of clinical investigation* **68**: 1305-1313

Reich NC, Liu L (2006) Tracking STAT nuclear traffic. *Nature reviews Immunology* **6**: 602-612

Rodriguez MA, Garcia-Perez RM, Garcia-Rivera G, Lopez-Reyes I, Mendoza L, Ortiz-Navarrete V, Orozco E (2000) An *Entamoeba histolytica* rab-like encoding gene and protein: function and cellular location. *Molecular and biochemical parasitology* **108**: 199-206

Rodriguez MA, Garcia-Perez RM, Mendoza L, Sanchez T, Guillen N, Orozco E (1998) The pyruvate : ferredoxin oxidoreductase enzyme is located in the plasma membrane and in a cytoplasmic structure in *Entamoeba*. *Microb Pathogenesis* **25**: 1-10

Rodriguez MA, Orozco E (1986) Isolation and characterization of phagocytosis- and virulence-deficient mutants of *Entamoeba histolytica*. *The Journal of infectious diseases* **154**: 27-32

Romero-Diaz M, Gomez C, Lopez-Reyes I, Martinez MB, Orozco E, Rodriguez MA (2007a) Structural and functional analysis of the *Entamoeba histolytica* EhrabB gene promoter. *Bmc Molecular Biology* **8**

Romero-Diaz M, Gomez C, Lopez-Reyes I, Martinez MB, Orozco E, Rodriguez MA (2007b) Structural and functional analysis of the *Entamoeba histolytica* EhrabB gene promoter. *Bmc Mol Biol* **8**: 82

Sambrook J, Russell DW (2001) *Molecular cloning. A laboratory Manual*, Third edn. New York: Col Spring Habor Laboratory Press.

Sami-Subbu R, Choi SB, Wu Y, Wang C, Okita TW (2001) Identification of a cytoskeleton-associated 120 kDa RNA-binding protein in developing rice seeds. *Plant molecular biology* **46**: 79-88

Sanchez L, Enea V, Eichinger D (1994) Identification of a developmentally regulated transcript expressed during encystation of *Entamoeba invadens*. *Molecular and biochemical parasitology* **67**: 125-135

Scadden AD (2005) The RISC subunit Tudor-SN binds to hyper-edited double-stranded RNA and promotes its cleavage. *Nature structural & molecular biology* **12**: 489-496

Schaenman JM, Gilchrist CA, Mann BJ, Petri WA, Jr. (2001) Identification of two *Entamoeba histolytica* sequence-specific URE4 enhancer-binding proteins with homology to the RNA-binding motif RRM. *The Journal of biological chemistry* **276**: 1602-1609

Schreiber E, Matthias P, Muller MM, Schaffner W (1989) Rapid detection of octamer binding proteins with 'mini-extracts', prepared from a small number of cells. *Nucleic acids research* **17**: 6419

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

Serrano-Luna J, Pina-Vazquez C, Reyes-Lopez M, Ortiz-Estrada G, de la Garza M (2013) Proteases from *Entamoeba* spp. and Pathogenic Free-Living Amoebae as Virulence Factors. *Journal of tropical medicine* **2013**: 890603

Shaw N, Zhao M, Cheng C, Xu H, Saarikettu J, Li Y, Da Y, Yao Z, Silvennoinen O, Yang J, Liu ZJ, Wang BC, Rao Z (2007) The multifunctional human p100 protein 'hooks' methylated ligands. *Nature structural & molecular biology* **14**: 779-784

Singh U, Gilchrist CA, Schaenman JM, Rogers JB, Hockensmith JW, Mann BJ, Petri WA (2002) Context-dependent roles of the *Entamoeba histolytica* core promoter element GAAC in transcriptional activation and protein complex assembly. *Molecular and biochemical parasitology* **120**: 107-116

Singh U, Purdy J, Mann BJ, Petri WA, Jr. (1997) Three conserved cis-acting sequences in the core promoter control gene expression in the protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. *Archives of medical research* **28 Spec No**: 41-42

Somlata, Bhattacharya S, Bhattacharya A (2011) A C2 domain protein kinase initiates phagocytosis in the protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. *Nature communications* **2**: 230

Stanley SL, Jr. (2003) Amoebiasis. *Lancet* **361**: 1025-1034

Tanyuksel M, Petri WA, Jr. (2003) Laboratory diagnosis of amebiasis. *Clinical microbiology reviews* **16**: 713-729

Tong X, Drapkin R, Yalamanchili R, Mosialos G, Kieff E (1995) The Epstein-Barr virus nuclear protein 2 acidic domain forms a complex with a novel cellular coactivator that can interact with TFIIE. *Molecular and cellular biology* **15**: 4735-4744

Towbin H, Staehelin T, Gordon J (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **76**: 4350-4354

Vaithilingam A, Teixeira JE, Miller PJ, Heron BT, Huston CD (2012) Entamoeba histolytica cell surface calreticulin binds human c1q and functions in amebic phagocytosis of host cells. *Infection and immunity* **80**: 2008-2018

Valineva T, Yang J, Palovuori R, Silvennoinen O (2005) The transcriptional co-activator protein p100 recruits histone acetyltransferase activity to STAT6 and mediates interaction between the CREB-binding protein and STAT6. *The Journal of biological chemistry* **280**: 14989-14996

Van Der Heide LP, Hoekman MF, Smidt MP (2004) The ins and outs of FoxO shuttling: mechanisms of FoxO translocation and transcriptional regulation. *The Biochemical journal* **380**: 297-309

Ximenez C, Moran P, Rojas L, Valadez A, Gomez A (2009) Reassessment of the epidemiology of amebiasis: state of the art. *Infection, genetics and evolution : journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases* **9**: 1023-1032

Yan C, Yan Z, Wang Y, Yan X, Han Y (2014) Tudor-SN, a component of stress granules, regulates growth under salt stress by modulating GA20ox3 mRNA levels in Arabidopsis. *Journal of experimental botany* **65**: 5933-5944

Yang J, Aittomaki S, Pesu M, Carter K, Saarinen J, Kalkkinen N, Kieff E, Silvennoinen O (2002) Identification of p100 as a coactivator for STAT6 that bridges STAT6 with RNA polymerase II. *The EMBO journal* **21**: 4950-4958

Yang J, Valineva T, Hong J, Bu T, Yao Z, Jensen ON, Frilander MJ, Silvennoinen O (2007) Transcriptional co-activator protein p100 interacts with snRNP proteins and facilitates the assembly of the spliceosome. *Nucleic acids research* **35**: 4485-4494

Zheng SS, Moehlenbrink J, Lu YC, Zalmas LP, Sagum CA, Carr S, McGouran JF, Alexander L, Fedorov O, Munro S, Kessler B, Bedford MT, Yu Q, La Thangue NB (2013) Arginine Methylation-Dependent Reader-Writer Interplay Governs Growth Control by E2F-1. *Mol Cell* **52**: 37-51

Zhu L, Tatsuke T, Mon H, Li Z, Xu J, Lee JM, Kusakabe T (2013) Characterization of Tudor-sn-containing granules in the silkworm, *Bombyx mori*. *Insect biochemistry and molecular biology* **43**: 664-674

### 13. APÉNDICE

Publicaciones realizadas durante el desarrollo de esta tesis doctoral.

**Javier Cázares-Apátiga**, Christian Medina-Gómez, Bibiana Chávez-Munguía, Esther Orozco, Carlos Vázquez-Calzada, Aarón Martínez-Higuera, Mario A. Rodríguez. 2017. The Tudor Staphylococcal Nuclease protein of *Entamoeba histolytica* participates in different cellular processes. En vías de publicación.

Martínez-Higuera A, Herrera-Martínez M, Chávez-Munguía B, Valle-Solís M, Muñiz-Lino MA, **Cázares-Apátiga J**, Rodríguez MA. 2015. *Entamoeba invadens*: Identification of a SERCA protein and effect of SERCA inhibitors on encystation. *Microb Pathog*.

Hernandes-Alejandro M, Calixto-Gálvez M, López-Reyes I, Salas-Casas A, **Cázares-Apátiga J**, Orozco E, Rodríguez MA. 2013. The small GTPase EhRabB of *Entamoeba histolytica* is differentially expressed during phagocytosis. *Parasitol Res*.

Mercedes Calixto-Gálvez, **G. Javier Cázares-Apátiga**, Jessica Borbolla-Vázquez, Mario Hernandes-Alejandro, Jonnatan Pais-Morales, Andrés Salas-Casas, Mario A. Rodríguez. 2012. -Histone-modifying proteins and DNA-methyltransferases in the epigenetic regulation of protozoa parasites. *Current Trends in microbiology*.