



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

**UNIDAD ZACATENCO**

**DEPARTAMENTO DE INFECTÓMICA Y PATOGÉNESIS MOLECULAR**

**“Caracterización de un intercambiador de sodio-calcio en trofozoítos de**

***Entamoeba histolytica*”**

**T E S I S**

Que presenta

**M. en C. MARTHA IRIS VALLE SOLIS**

Para obtener el grado de

**DOCTORA EN CIENCIAS**

**EN**

**INFECTÓMICA Y PATOGÉNESIS MOLECULAR**

Director de la Tesis:

**DR. MARIO ALBERTO RODRÍGUEZ RODRÍGUEZ**

**Ciudad de México**

**Enero, 2019**

Este trabajo se realizó con el apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) con el número de CVU 418500, en el Laboratorio 2 del departamento de Infectómica y Patogénesis Molecular del CINVESTAV-IPN, bajo la dirección del Dr. Mario Alberto Rodríguez Rodríguez.

Dedico esta tesis a mis padres  
y hermanas que, aunque digan  
que soy el ejemplo de la familia,  
lo que soy es gracias a ustedes.  
También a mis tíos y abuelos  
por su gran apoyo, los amo.

“La familia no es algo importante. Lo es todo.”

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Dr. Mario Alberto Rodríguez Rodríguez el cual considero una gran persona, un gran investigador por permitirme desarrollar en su laboratorio, el cual considero como una segunda casa por la buena convivencia y buen trato de compañerismo y además permitirme la oportunidad de realizar este trabajo bajo su tutoría, por guiarme y brindarme su apoyo.

A mis asesores la Dra. Esther Orozco Orozco, el Dr. Ricardo Félix Grijalva, el Dr. Guillermo Pérez Ichiwuara y el Dr. Juan Ernesto Ludert por sus consejos, observaciones y comentarios en el transcurso del desarrollo de la tesis para ayudar a comprender y mejorar este trabajo.

A la Dra. Bibiana Chávez Munguía y Liz Salazar por su apoyo para la realización y observación de la microscopia electrónica.

A las Doctoras Guillermina García y Miriam Huerta por su orientación, paciencia, consejos, buen trato y guía en el desarrollo de algunos experimentos.

A la Dra. Jeni Bolaños Rebolledo, Jenita una gran persona con mucha humanidad, paciencia, lealtad y compañerismo por ser una gran amiga y compañera de laboratorio que, aunque no fue mucho el tiempo, pero si el necesario para brindarme ayuda para terminar los últimos experimentos clave para culminar esta tesis, muchas gracias por tu apoyo acertado.

Al C. Carlos Vázquez Calzada, mi gran amigo Primi por tu gran paciencia, conocimiento, apoyo y palabras de aliento (cuando más las necesitaba). Por esa gran disposición de tiempo para checar muestras en las sesiones de microscopia confocal. Muchas gracias por aguantarme estos más de 7 años en el laboratorio.

Al Dr. Javier Cazares Apatiga, por ese apoyo incondicional de compañeros y amigos justo cuando lo necesitaba, muchas gracias papi. Aunque a veces me

haces enojar, pero sabes cuánto te quiero por todos estos años de compañerismo y amistad.

A la Dra. Cinthia Dionicio mejor conocida como piyi, por tu gran amistad a lo largo del doctorado tus risas y locuras no hubieran hecho muy amena esta estadía gracias baby.

Al Químico Víctor Hugo Rosales por ese gran apoyo tanto laboral como sentimental, eres un gran hombre con mucho sentido del humor, filántropo y un gran corazón generoso. Gracias te quiero muchísimo.

Y así quisiera ir escribiendo y agradeciendo a cada una de las grandes personas que me apoyaron, ayudaron, brindaron su amistad e hicieron agradable mi trayecto por Cinvestav sin embargo espero no se sientan mal, pero saben que los quiero y aprecio bastante. Muchas gracias Ramon (Monchirri), Tania (Mijares), Susana (Susy), Mario Nieves (profesor), Christian, Arturo (espero no me publiques papi por no escribirte en un apartado solo jeje), Josue (Tempris), Mitzi (Mana), Salome (Mana), Emilio (Harry), Fátima, Laura, Moisés (Moy), Eduardo (Flaco), Diana, Alfredo & Eli (Los Chikis) y Rafa (Arjona).

## ÍNDICE

		Página
1	RESUMEN	1
2	ABSTRACT	3
3	ANTECEDENTES GENERALES	5
3.1	Amibiasis	5
3.2	Epidemiología	5
3.3	Biología de <i>Entamoeba histolytica</i>	6
3.4	Ciclo de Vida	10
3.5	Mecanismo de Patogenicidad	13
3.6	Homeostasis del calcio	18
3.6.1	Canales de calcio	18
3.6.1.1	Canales de calcio dependientes de voltaje (VGCCS)	20
3.6.1.2	Canales de calcio regulados por depósitos intracelulares (SOCCS)	20
3.6.1.3	Receptores de potencial transitorio (TRP)	22
3.6.1.4	Canales liberadores de calcio	23
3.6.2	ATPasas de calcio	24
3.6.2.1	ATPasas de calcio de membrana plasmática (PMCA)	24
3.6.2.2	ATPasas de calcio de retículo sarco/endoplásmico (SERCA)	24
3.6.2.3	ATPasas de calcio de las vías secretoras (SPCA)	26
3.6.3	Intercambiadores de calcio	26
3.6.3.1	Topología y estructura	28
3.6.3.2	Inhibidores	29
3.7	Transporte de calcio en protozoarios parásitos	30
4	ANTECEDENTES PARTICULARES	32

4.1	Importancia del calcio en <i>Entamoeba</i> sp.	32
4.2	Canales iónicos en <i>E. histolytica</i>	33
4.3	ATPasas de calcio en <i>E. histolytica</i>	33
4.4	Identificación de un posible intercambiador sodio/calcio en <i>E. histolytica</i> (EhCCX)	35
5	JUSTIFICACIÓN	37
6	HIPÓTESIS	37
7	OBJETIVO GENERAL	38
8	OBJETIVOS PARTICULARES	38
9	ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	39
10	MATERIALES Y MÉTODOS	40
10.1	Cultivo de <i>E. histolytica</i> y <i>E. dispar</i>	40
10.2	Identificación y caracterización <i>in silico</i> de un intercambiador catión/calcio de <i>E. histolytica</i>	40
10.3	Modelaje molecular	40
10.4	Diseño del péptido antigénico	41
10.5	Inmunización	41
10.6	Manejo ético de los animales	42
10.7	Extracción de proteínas totales	42
10.8	Cuantificación de proteínas	42
10.9	Electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE)	43
10.10	Western blot	43
10.11	Microscopia de inmunofluorescencia	45
10.12	Microscopia electrónica de transmisión (MET)	46
10.13	Aislamiento de DNA genómico de trofozoítos de <i>E. histolytica</i>	47
10.14	Diseño de oligonucleótidos iniciadores y PCR	47
10.15	Electroforesis de DNA en geles de agarosa	49

10.16	Preparación de células competentes de <i>Escherichia coli</i>	49
10.17	Transformación de células competentes	50
10.18	Clonación del gen <i>Ehccx</i> en el vector PCR 4 TOPO	50
10.19	Extracción de DNA en pequeña cantidad (MINIPREP)	50
10.20	Extracción de DNA en mediana cantidad (MIDIPREP)	51
10.21	Clonación del gen <i>Ehccx</i> en el vector pNeo	52
10.22	Transfección de trofozoítos	53
10.23	Aislamiento de RNA de trofozoítos de <i>E. histolytica</i>	53
10.24	Obtención de cDNA	54
10.25	Diseño de oligonucleótidos y RT-PCR en tiempo real	54
10.26	Niveles intracelulares de Ca <sup>2+</sup>	55
10.27	Muerte celular inducida por peróxido de hidrógeno	56
10.28	Obtención de eritrocitos humanos	56
10.29	Eritrofagocitosis	56
10.30	Actividad citopática	56
10.31	Migración celular	57
10.32	Análisis estadístico	57
11	RESULTADOS	58
11.1	Análisis <i>in silico</i> del intercambiador sodio/calcio de <i>E. histolytica</i>	58
11.2	Expresión del gen <i>Ehccx</i> en trofozoítos de <i>E. histolytica</i>	63
11.3	Localización subcelular de la proteína EhCCX	66



11.4	Expresión y localización del intercambiador en la amiba no patógena <i>Entamoeba dispar</i>	73
11.5	Análisis de la expresión y localización de EhCCX bajo condiciones de estrés	76
11.6	Análisis de la expresión y localización de EhCCX durante la eritrofagocitosis	78
11.7	La sobreexpresión de EhCCX modifica los niveles de calcio en los trofozoítos	83
11.8	La sobreexpresión de EhCCX retarda la muerte celular programada inducida por peróxido de hidrógeno	86
11.9	La sobreexpresión de EhCCX incrementa la virulencia <i>in vitro</i>	87
12	DISCUSIÓN	92
13	CONCLUSIÓN	98
14	PERSPECTIVAS	98
15	BIBLIOGRAFÍA	99

## ÍNDICE DE FIGURAS

		Página
Figura 1	Incidencia de casos de amibiasis en México del año 2000 al 2011	8
Figura 2	Formas de vida de <i>E. histolytica</i>	9
Figura 3	Ciclo de vida de <i>E. histolytica</i>	12
Figura 4	Microscopia electrónica de barrido de amibiasis intestinal experimental en conejillos de indias	14
Figura 5	Moléculas que participan en la regulación de la concentración intracelular de calcio	19
Figura 6	Filogenia de la superfamilia antiporter catión/calcio (CaCA)	28
Figura 7	Dominios estructurales del intercambiador de <i>E. histolytica</i>	61
Figura 8	Estructura 3D del intercambiador de <i>E. histolytica</i>	62
Figura 9	Análisis filogenético del posible intercambiador de <i>E. histolytica</i>	64
Figura 10	Expresión del gen <i>EhCCX</i> en trofozoítos de <i>E. histolytica</i>	67
Figura 11	Reconocimiento de la proteína EhCCX por anticuerpos específicos	69
Figura 12	Localización subcelular de la proteína EhCCX en trofozoítos de <i>E. histolytica</i>	70
Figura 13	Ensayos de Co-localización	74
Figura 14	Expresión y localización subcelular de CCX en <i>E. dispa</i>	77
Figura 15	Expresión y localización de EhCCX expuestos a 1 mM de peróxido de hidrogeno y a choque térmico	79
Figura 16	Expresión y localización de EhCCX durante la fagocitosis.	81

<b>Figura 17</b>	<b>Clonación y secuenciación del gen <i>Ehccx</i></b>	<b>84</b>
<b>Figura 18</b>	<b>Comparación de las secuencias de aminoácidos de EHI_001770 y EhCCX</b>	<b>88</b>
<b>Figura 19</b>	<b>Sobreexpresión de EhCCX en trofozoítos de <i>E. histolytica</i></b>	<b>89</b>
<b>Figura 20</b>	<b>Calcio citosólico y muerte celular programada en trofozoítos que sobrepresan EhCCX</b>	<b>90</b>
<b>Figura 21</b>	<b>Efecto de la sobreexpresión de EhCCX en la virulencia <i>in vitro</i></b>	<b>91</b>

## ÍNDICE DE TABLAS

		Pagina
Tabla 1	Clasificación taxonómica	7
Tabla 2	Condiciones para la amplificación del gen <i>Ehccx</i>	48
Tabla 3	Condiciones para los ensayos de RT-PCR en tiempo real	55
Tabla 4	Comparación de los intercambiadores Sodio/Calcio de <i>E. histolytica</i> con proteínas ortólogos de diferentes organismos	59

## ÍNDICE DE ABREVIATURAS

NCX	Intercambiadores de sodio/calcio
NCKX	Intercambiadores de sodio/potasio/calcio
CCX	Intercambiadores catión/calcio
YRBG	intercambiadores de bacterias
PMCA	ATPasas de membrana plasmática
SERCA	ATPasas del retículo sarco/endoplásmico
SPCA	ATPasas de calcio de vías secretoras
Gal/Gal	Lectina de E. histolytica con afinidad a Galactosa y a Nacetil-D-galactosamina
NAc	galactosamina
DNA	Acido desoxirribonucleico
RNA	Ácido ribonucleico
kDa	kilodaltones
MDCK	Línea celular de riñon de perro "Madin-Darby canine kidney" MET Microscopía Electrónica de Transmisión
SREHP	proteína rica en serinas
MAC	complejo de ataque a la membrana
AHA	absceso hepático amibiano
MAC	complejo de ataque a la membrana
CP	cisteínas proteinasas
GTPasa	guanosina trifosfatasa
TRP	Receptores de potencial transitorio
VGCCs	Canales de calcio dependientes de voltaje
SOCCs	Canales de calcio regulados por depósitos intracelulares
STIM1	Molecula de interacción estromal 1
DAG	Diacilglicerol
RyR	Receptor de rianodina
IP3R	Receptor de inositol trifosfato
CaM	Calmodulina
XIP	Peptido inhibidor de intercambiador
CaBPs	Proteínas unidoras de calcio

PBS	Amortiguador salino de fosfatos "Phosphatebuffered saline"
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa "Polymerase chain reaction"
PFA	Paraformaldehído
RT-PCR	Retrotranscripción –reacción en cadena de la polimerasa "Retro transcriptase-polymerase chain reaction"
SBA	Suero bovino adulto
SDS	Electroforesis en geles de policrilamida con dodecil sulfato de sodio "Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel"
PAGE	Electrophoresis
TA	Temperatura ambiente
PSA	Persulfato de amonio
DAPI	4,6-diamino-2-fenilindol
DO	Densidad óptica

## 1 RESUMEN

El ion calcio es una importante molécula de señalización, ya que actúa como segundo mensajero controlando una variedad de funciones celulares, como secreción de hormonas, transcripción de genes, contracción muscular, división celular, diferenciación y permeabilidad a iones sodio y potasio, entre otras. Para que la señalización por calcio funcione correctamente este debe ser regulado en su concentración intracelular. Son varios los mecanismos responsables de controlar los niveles fisiológicos de calcio, ya sea por el exporte al medio externo o al transporte a diferentes compartimentos intracelulares. Proteínas del tipo de bombas de calcio, como PMCA o SERCA, o intercambiadores, como sodio/calcio (NCX), sodio/potasio/calcio (NCKX) o catión/calcio (CCX), entre otras, son responsables de mantener los niveles de calcio citoplásmicos. En *Entamoeba histolytica*, el parásito responsable de la amibiasis en el humano, el ion calcio tiene un papel importante en el proceso patogénico, ya que al bloquear el transporte de este ion se ven afectadas la adhesión y la citólisis. El calcio también participa en la exocitosis de vesículas ácidas y en la regulación transcripcional de este parásito, además de regular el enquistamiento en *E. invadens*, un parásito de reptiles que se utiliza como modelo para el estudio del enquistamiento del género *Entamoeba*. Sin embargo, poco se sabe de la regulación de la concentración citoplásmica del ion en el parásito. En este trabajo se identificó y se caracterizó funcionalmente un intercambiador de calcio en *E. histolytica*. El análisis *in silico* de esta proteína mostró que pertenece a la familia de intercambiadores catión/calcio, por lo que se le nombró como EhCCX. Mediante ensayos de inmunofluorescencia e inmunomicroscopía electrónica utilizando anticuerpos dirigidos contra un péptido específico de EhCCX mostraron que el intercambiador se localiza en la membrana plasmática y en la membrana de algunas vacuolas citoplásmicas de los trofozoítos amibianos. Sin embargo, después de 10 min de eritrofagocitosis, EhCCX se localizó principalmente en la membrana plasmática. Además, los niveles de expresión de esta proteína en *E. histolytica* son mayores que los de la ortóloga en la amiba no patógena

*E. dispar*. La expresión de EhCCX también aumentó en trofozoítos incubados con peróxido de hidrógeno. Por otra parte, los trofozoítos que sobreexpresaron este intercambiador contenían niveles citosólicos de calcio mayores que los trofozoítos control, pero la expulsión de calcio después de la adición de peróxido de hidrógeno fue más eficiente en los trofozoítos que sobreexpresaron EhCCX; consecuentemente, la muerte celular programada de estos parásitos se retardó con respecto a la de los trofozoítos control. Interesantemente, la sobreexpresión de EhCCX aumentó la virulencia *in vitro* de los trofozoítos. Todos estos resultados confirman el papel de EhCCX en el transporte de calcio y sugieren que el flujo de este ion a través del intercambiador juega un papel importante en la muerte celular programada y en la virulencia de *E. histolytica*.



## 2 ABSTRACT

Calcium is an important signaling molecule, since it acts as a second messenger controlling a variety of cellular functions, such as hormone secretion, gene transcription, muscle contraction, cell division, differentiation and permeability to sodium and potassium ions, among others. For the correct function of the calcium signaling, this ion must be regulated in its intracellular concentration. There are several mechanisms responsible for controlling the physiological levels of calcium, either by export it to the external environment or by transport it to different intracellular compartments. Proteins of the calcium pump type, such as PMCA or SERCA, or exchangers, such as sodium/calcium (NCX), sodium/potassium/calcium (NCKX) or cation/calcium (CCX), among others, are in charge to maintain the levels of cytoplasmic calcium. In *Entamoeba histolytica*, the parasite responsible for human amoebiasis, calcium plays an important role in the pathogenic process, since the blockage of the ion transport affected the adhesion and cytolysis. Calcium also participates in the exocytosis of acidic vesicles and in the transcriptional regulation of this parasite, in addition to regulate the encystation of *E. invadens*, a parasite of reptiles that is used as a model for the study of encystation in the genus *Entamoeba*. However, little is known about the regulation of the cytoplasmic concentration of the ion in the parasite. In this work, a calcium exchanger of *E. histolytica* was identified and functionally characterized. The *in silico* analysis of this protein showed that it belongs to the cation/calcium exchanger family, so it was named EhCCX. Immunofluorescence and electron immunomicroscopy assays using antibodies directed against a specific EhCCX peptide showed that the exchanger is located in the plasma membrane and in the membrane of some cytoplasmic vacuoles of the trophozoites. However, after 10 min of erythrophagocytosis, EhCCX was located mainly in the plasma membrane. In addition, the expression levels of this protein in *E. histolytica* are greater than those of the orthologue in the nonpathogenic amoeba *E. dispar*. The expression of EhCCX also increased in trophozoites incubated with hydrogen peroxide. On the other hand, the trophozoites that overexpressed

this exchanger contained higher cytosolic calcium levels than the control trophozoites, but the calcium excretion after the addition of hydrogen peroxide was more efficient in the trophozoites that overexpressed EhCCX; consequently, the programmed cell death of these parasites was delayed with respect to that of the control trophozoites. Interestingly, overexpression of EhCCX increased the *in vitro* virulence of the trophozoites. All these results confirm the role of EhCCX in the transport of calcium and suggest that the flow of this ion through the exchanger plays an important role in the programmed cell death and in the virulence of *E. histolytica*.

### **3 ANTECEDENTES GENERALES**

#### **3.1 Amibiasis**

La amibiasis es una enfermedad gastrointestinal aguda o crónica del ser humano causada por la infección con el parásito protozooario *Entamoeba histolytica*, el cual puede vivir en el intestino grueso o invadir la mucosa intestinal causando lesiones; además, puede diseminarse a diferentes órganos, principalmente el hígado (Zlobl, 2001). La amibiasis presenta una distribución mundial, sin embargo, afecta principalmente a países en vías de desarrollo, donde las condiciones socioeconómicas e higiénicas son deficientes (Barron et al, 2008). Esta enfermedad es responsable de aproximadamente 70 a 100 mil muertes al año en todo el mundo, por lo que es la cuarta causa principal de muerte debida a la infección por protozoos (después de la malaria, la enfermedad de Chagas y la leishmaniosis) y la tercera causa de morbilidad causada por este grupo de organismos (Choudhuri & Rangan, 2012; Espinosa-Cantellano & Martinez-Palomo, 2000). La amibiasis es producida por la ingestión de quistes maduros a partir del agua, alimentos o manos contaminadas con heces (Trejos-Suárez & Castaño-Osorio, 2009). Esta parasitosis afecta principalmente el colon y al penetrar la mucosa del intestino puede ocasionar colitis o abscesos en otros órganos, principalmente en hígado, seguido por cerebro, pulmón y piel (Blessmann et al, 2002).

#### **3.2 Epidemiología**

La amibiasis es de distribución mundial; se presenta a cualquier edad, aunque es más frecuente en niños y adultos jóvenes(Ximenez et al, 2007). En especial, las infecciones se presentan frecuentemente en los países y regiones en vías de desarrollo como América latina, Asia y África. Las zonas con mayor endemia son los países tropicales y subtropicales, además de implicar factores sociodemográficos y de accesibilidad a los servicios sanitarios(Ximenez et al, 2007). Se considera que el 10% de la población mundial está infectada y 90% de ellos no presentan síntomas (Ximenez et al, 2007). Según la Organización Mundial de la Salud (OMS) hay 500 millones de nuevas infecciones por año y

aproximadamente 70,000 a 100,000 muertes a nivel mundial (Botero & Restrepo, 1998; Christy & Petri, 2011; Ximenez et al, 2007). En México, se reporta que esta enfermedad ha disminuido considerablemente (Figura 1), hasta el 2011 la tasa de incidencia es de alrededor de 419,554 casos (SUIVE/DGE/Secretaria de Salud/Estados Unidos Mexicanos 2011).

### **3.3 Biología de *Entamoeba histolytica***

*E. histolytica* fue descubierta en 1873 en Rusia por Friedrich Lösch, quien la aisló de un paciente con disentería (Gómez et al, 2007). Este parásito pertenece al género *Entamoeba* (Tabla 1), en el cual sólo tres especies producen infección en el humano: *E. histolytica*, *E. dispar* y *E. moshkovskii*, siendo *E. histolytica* la más invasiva (Martinez Palomo, 1987; Ximenez et al, 2007). *E. histolytica* es un protozooario que presenta dos formas en su ciclo de vida: el quiste y el trofozoíto, donde el trofozoíto es la forma invasiva y el quiste es la forma infectiva. El trofozoíto coloniza la mucosa intestinal del colon donde se multiplica por fisión binaria (Ximenez et al, 2007).

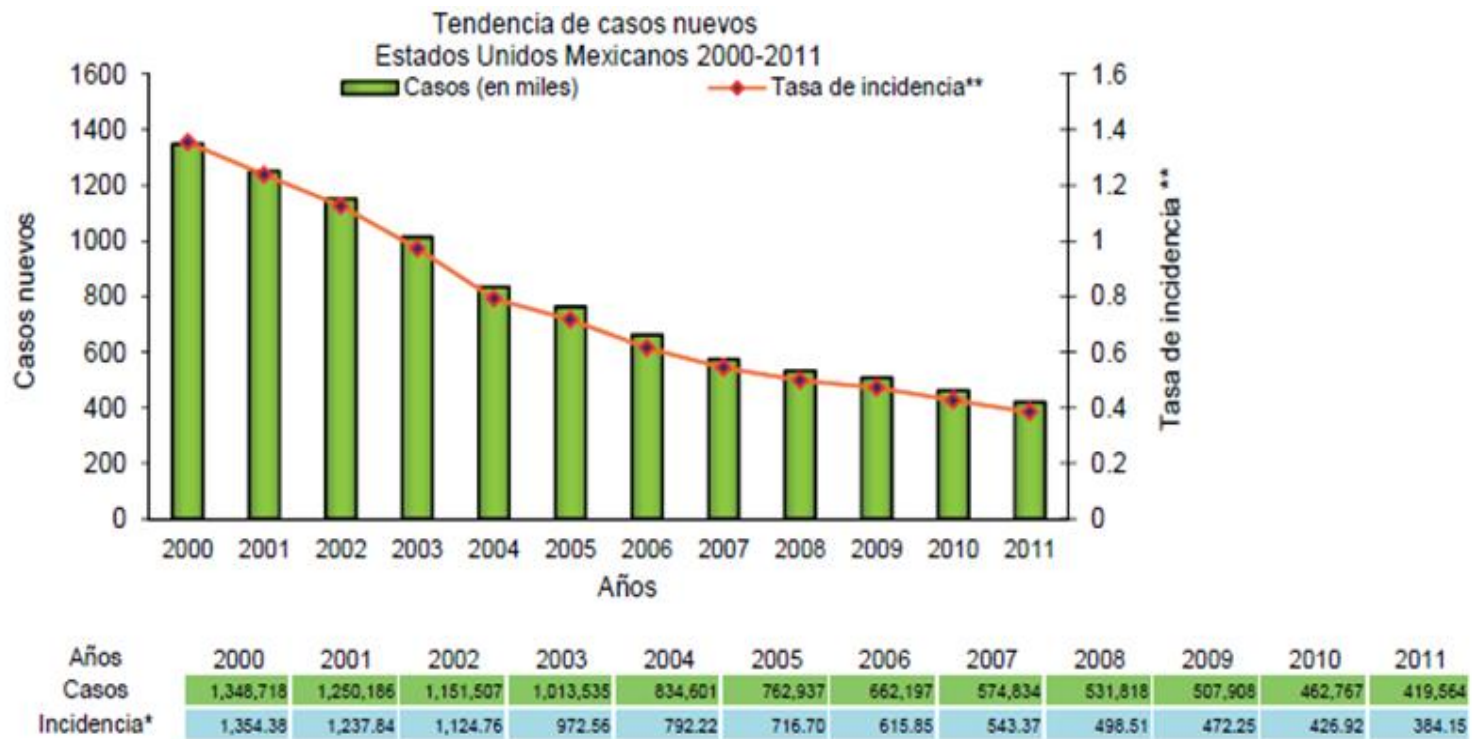
Los quistes son estructuras redondeadas de 10 a 16  $\mu\text{m}$  (Figura 2), que presentan en su interior de 1 a 4 núcleos y una pared gruesa compuesta de quitina que les confiere resistencia cuando el parásito se encuentra fuera del huésped (Gillespie & Pearson, 2001). El trofozoíto tiene un diámetro de 20 a 40  $\mu\text{m}$  (Figura 2), en general presenta un solo núcleo y emite un pseudópodo amplio, hialino y transparente, el cual se proyecta al exterior de la célula y presenta una apariencia granulosa; su núcleo presenta un cariosoma compacto central y cromatina en gránulos uniformes en tamaño y localización, carece de mitocondrias, aparato de Golgi y retículo endoplásmico bien desarrollados, lisosomas típicos y citoesqueleto organizado (Gómez et al, 2007; Ximenez et al, 2007).

El trofozoíto es una célula muy móvil capaz de ingerir gran variedad de partículas, incluyendo bacterias y eritrocitos (Martinez Palomo, 1987). Su movimiento es por la formación de pseudópodos y los microtúbulos se observan durante la división nuclear. Además de los pseudópodos, también forma

filopodios, los cuales son proyecciones fagocíticas con vacuolas orientadas al exterior y a una región caudal (Martinez Palomo, 1987). El trofozoíto es muy sensible a los cambios de temperatura, pH y osmolaridad (Bailey, 1992). Su citoesqueleto está formado por actina, miosina y tubulina (Bailey, 1992). El núcleo del trofozoíto mide de 3 a 5  $\mu\text{m}$  de diámetro, y generalmente cada trofozoíto contiene un núcleo, aunque pueden encontrarse células con más de un núcleo, así como células multinucleadas gigantes (Meza et al, 1990).

**Tabla 1. Clasificación taxonómica**

<b>Reino</b>	<b>Protista</b>
<b>Phylum</b>	Sarcomastigophora
<b>Subphylum</b>	Sarcodina
<b>Superclase</b>	Rhizopoda
<b>Clase</b>	Lobosea
<b>Familia</b>	Entamoebidae
<b>Orden</b>	Amoebida
<b>Género</b>	<i>Entamoeba</i>
<b>Especie</b>	<i>Entamoeba histolytica</i>



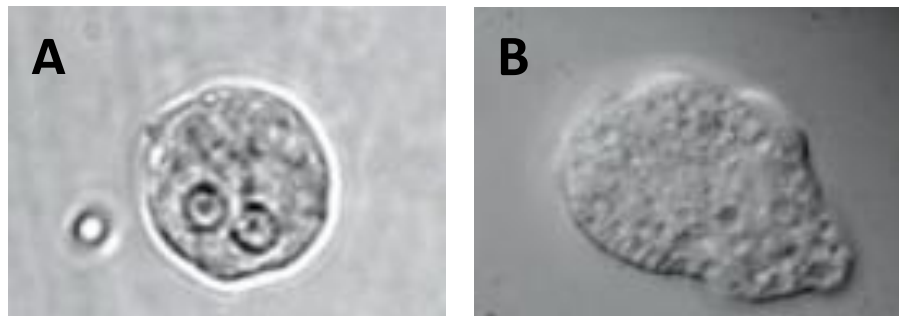
FUENTE: SUIVE/DGE/Secretaría de Salud/Estados Unidos Mexicanos 2011

\* Tasa de incidencia por 100 000 habitantes

\*\* Tasa de incidencia por 100 habitantes

**Figura 1. Incidencia de casos de amibiasis en México del año 2000 al 2011. (Datos tomados de SUIVE/DGE/Secretaría de Salud/Estados Unidos Mexicanos 2011)**

La membrana nuclear de *E. histolytica* consiste en una doble capa de 120 nm de grosor con numerosos poros de 50 a 65 nm de diámetro distribuidos de manera irregular (Kretschmer, 1994; Ravdin et al, 1988a). Una característica importante del núcleo es que cuenta con cromatina periférica que está compuesta principalmente de RNA y que podría ser la región correspondiente al nucléolo de las células eucariotas y el endosoma central podría ser el sitio de condensación del DNA (Martinez-Palomo, 1986).



**Figura 2. Formas de vida de *E. histolytica*.** A) Fase quística o de resistencia, B) Fase de trofozoíto, también conocida como fase móvil (Ximenez et al, 2011).

En el citoplasma de *E. histolytica* se encuentra una red de vacuolas y vesículas, algunas de las cuales podrían corresponder al retículo endoplásmico y al aparato de Golgi (Ghosh et al, 1999; Teixeira & Huston, 2008). Gran parte del citoplasma se encuentra ocupado por vacuolas circulares de aproximadamente 0.5 a 9  $\mu\text{m}$  (Martinez-Palomo, 1986). Mediante técnicas de tinción, bioquímicas y estructurales, se han logrado identificar vacuolas de macro y micropinocitosis, lisosomas primarios y secundarios, cuerpos residuales, vacuolas autofágicas y ribosomas, los cuales se observan como cúmulos helicoidales con 300 nm de longitud y 40 nm de diámetro (Martinez-Palomo, 1986; Ravdin et al, 1988a).

En el 2005 se publicó el genoma de *E. histolytica* (Loftus et al, 2005), reportando un tamaño de 20,799 kb, en donde el 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 receptores tipo cinasa, una transferencia horizontal de genes bacterianos a gran escala y una expansión de genes involucrados en la fagocitosis, transporte vesicular, virulencia y traducción de señales que regulan las funciones del citoesqueleto (Loftus et al, 2005). Aproximadamente el 30% de los genes predichos no presentan homólogos en otros organismos (Ehrenkauf & Singh, 2008).

### **3.4 Ciclo de vida**

El ciclo de vida de *E. histolytica* es relativamente simple, consiste de dos fases principales: un quiste infectivo y una forma invasiva (trofozoíto) (Figura 2). El quiste tetranucleado es la forma infecciosa del parásito. Es resistente a cloración, ácido gástrico y desecación, además puede sobrevivir en un ambiente húmedo por varias semanas (Gillespie & Pearson, 2001). El ciclo (Figura 3) inicia con la ingestión de quistes infecciosos, a través de agua y alimentos contaminados. Los quistes viajan por el aparato digestivo hasta el íleon donde se desenquistan y dan lugar a un protoplasto desnudo tetranucleado. Cada uno de los núcleos se divide y el protoplasto da origen a ocho trofozoítos metaquísticos uninucleados que migran al ciego y se adhieren a la mucosa del intestino delgado y grueso y se dividen por fisión binaria (Martínez-Palomo, 1986). Los trofozoítos pueden seguir cualquiera de las siguientes vías (Figura 3): 1) vivir en el intestino como comensales; 2) enquistarse; 3) invadir la mucosa intestinal y producir desde síntomas leves hasta disentería grave; 4) invadir otros órganos, lo que les impedirá completar su ciclo de vida, ya que no regresan al lumen del intestino ó 5) salir del huésped con las heces para morir inmediatamente debido a su poca resistencia a las condiciones atmosféricas (Martínez-Palomo, 1986). El enquistamiento se realiza en el lumen del intestino grueso y cuando el quiste madura aparecen cuatro núcleos y el ciclo de vida se completa cuando es expulsado con las



heces al medio ambiente, donde resisten las condiciones externas hasta que logran infectar un nuevo huésped (Martinez-Palomo, 1986). Eventualmente, los trofozoítos que se instalan en el epitelio intestinal, atacan e invaden la mucosa causando disentería amibiana, también pueden migrar por los vasos sanguíneos a sitios extraintestinales, como pulmones, cerebro e hígado, donde pueden formar abscesos (Figura 3) (Sehgal et al, 1996). Este último es el sitio extraintestinal más común de la enfermedad, lo que da como resultado una marcada destrucción del tejido, con reclutamiento de neutrófilos, necrosis celular y formación de microabscesos, que gradualmente se unen (Mortimer & Chadee, 2010). La mayoría de los pacientes presentan un absceso único; sin embargo también se pueden formar múltiples abscesos (Sehgal et al, 1996). El absceso más común es en el hígado (absceso hepático amibiano, AHA), en tanto que los abscesos cerebrales son una invasión extraintestinal extremadamente rara y asociada con altas tasas de mortalidad (Pritt & Clark, 2008)

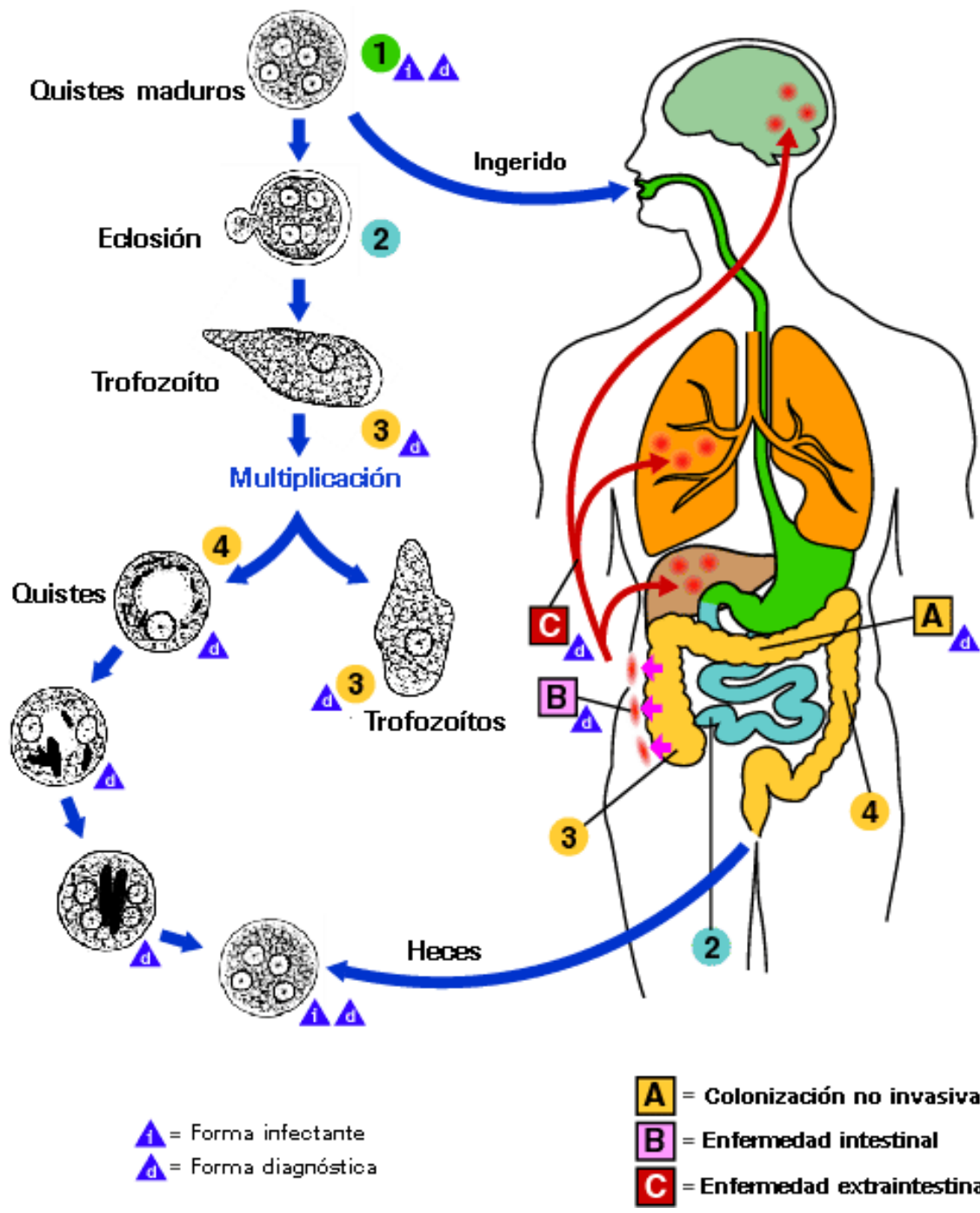
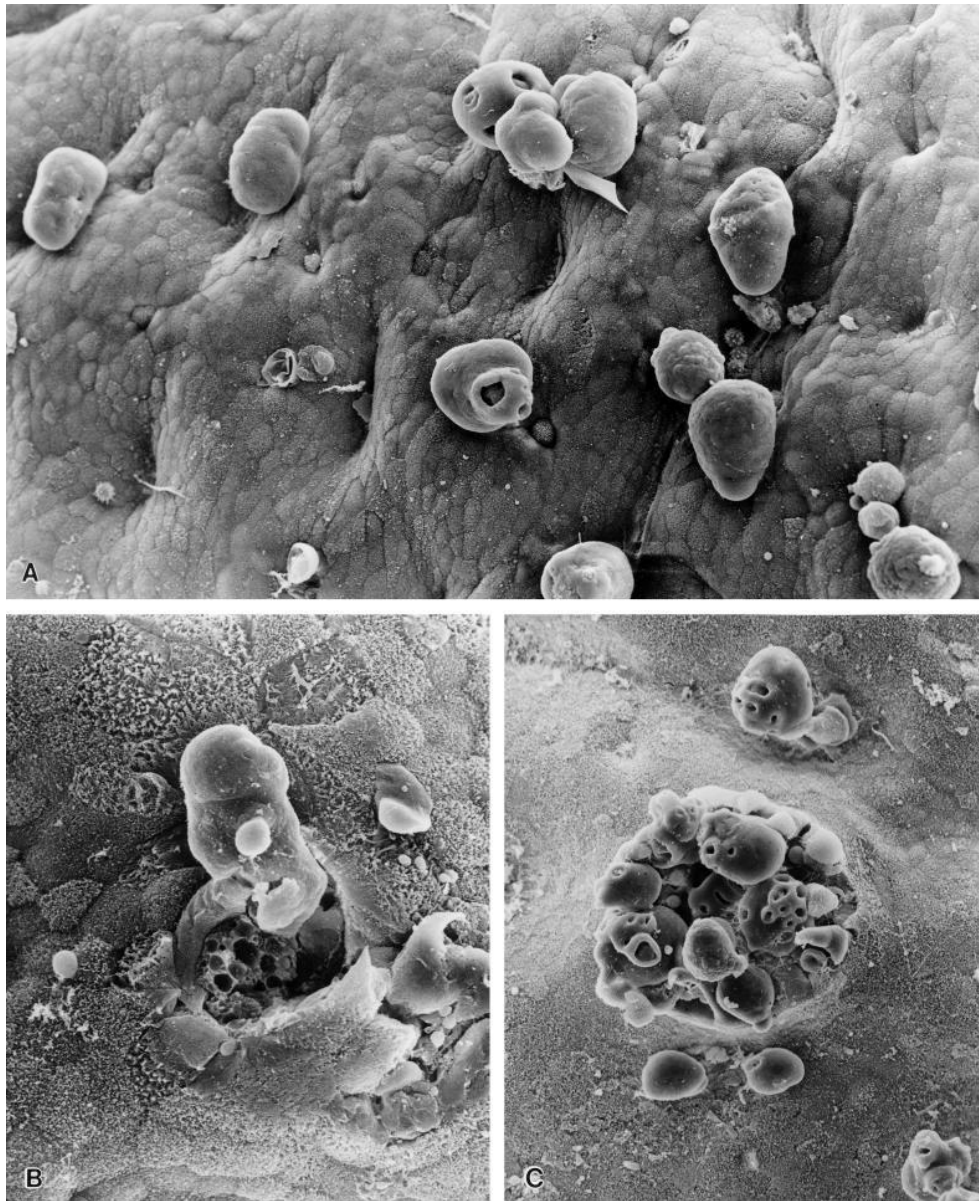


Figura 3. Ciclo de vida de *E. histolytica*. (Tomado de Amibiasis, CDC, Atlanta, 1999).

### 3.5 Mecanismos de patogenicidad

El mecanismo patogénico de *E. histolytica* ha sido generalmente atribuida a su capacidad para destruir tejidos a través de su citotoxicidad y citopatogenicidad (Figura 4), lo que deriva de la proteólisis de células epiteliales, sanguíneas y de la matriz extracelular (Espinosa-Cantellano & Martinez-Palomo, 2000). El mecanismo patogénico es realizado por diferentes proteínas denominadas factores de virulencia (Espinosa-Cantellano & Martinez-Palomo, 2000). La capacidad de la amiba para invadir tejidos y de evadir la respuesta inmune depende de su adaptación al medio y de la expresión de factores de virulencia. Primeramente, los trofozoítos se encuentran en el lumen y la mucosa intestinal; después, invaden el epitelio interglandular, donde los trofozoítos producen microulceraciones de la mucosa (Mortimer & Chadee, 2010). Con el paso del tiempo, las úlceras se extienden hacia la cara basal de las células intestinales y después hacia la mucosa muscular o externa, donde los procesos usualmente se detienen antes de la perforación del intestino (Sehgal et al, 1996). Las úlceras se desarrollan con frecuencia en el ciego y colon ascendente. En el 20% de los casos de colitis aguda, las perforaciones terminan en peritonitis (Mortimer & Chadee, 2010).

Las moléculas de superficie de la amiba controlan la adherencia, señalización, ingestión y modulación del sistema inmune en la relación hospedero-parásito (Marie & Petri, 2014). Los trofozoítos de *E. histolytica* se adhieren a monocapas de células epiteliales en cultivo y a componentes de la matriz extracelular, como colágena y fibronectina y a superficies inertes como plástico y vidrio. La adhesión de los trofozoítos a células epiteliales es esencial para causar daño a las mismas y requiere de un mecanismo específico que involucra moléculas de superficie del parásito (adhesinas) y receptores de la célula blanco (Martinez-Palomo, 1986). Se ha observado que la adhesión es un paso indispensable para la sucesión de los siguientes eventos como la fagocitosis y la destrucción celular (Ravdin et al, 1980).



**Figura 4. Microscopia electrónica de barrido de amebiasis intestinal experimental en conejillos de indias.** A) Trofozoitos de *E. histolytica* se adhieren mayormente al epitelio interglandular elevado del intestino. B) Una pequeña región de microinvasión se observa en la lesión temprana, con ulceración superficial. C) En estados más avanzados, se observan numerosos trofozoítos penetrando una úlcera de colon (Espinosa-Cantellano & Martínez-Palomo, 2000).

La adhesión del parásito ocurre principalmente a través de una lectina de superficie que une residuos expuestos de galactosa (Gal) y N-acetil-D-galactosamina (GalNAc) en las glicoproteínas de las células blanco (Christy & Petri, 2011; Petri et al, 1987; Ravdin & Guerrant, 1981). Otras moléculas que participan en la adhesión incluyen una lectina de 220 kDa que une oligómeros de N-acetil-glucosamina (Meza et al, 1987), una proteína rica en serinas (SREHP) de 52 kDa (Stanley et al, 1990), proteínas de 90, 70, 50 y 24 kDa (Rodriguez et al, 1989) y la adhesina de 112 kDa, también llamada complejo EhCPADH (Arroyo & Orozco, 1987; Garcia-Rivera et al, 1999).

La lectina de unión a Gal/GalNAc parece ser un mediador esencial para la adherencia a diferentes líneas de células epiteliales, incluyendo las mucosas de colon de ratas y humanos (Espinosa-Cantellano & Martinez-Palomo, 2000). Esta lectina es una glicoproteína heterodimérica, cuyas subunidades de 170 y 35 kDa están unidas por enlaces disulfuro (Huston, 2004). El análisis de la secuencia de la subunidad de 170 kDa muestra una región externa que comprende tres dominios: un dominio rico en cisteína, un dominio con nueve pseudo-repeticiones de 30 residuos y un dominio pobre en cisteína (Braga et al, 1992). Esta subunidad de la lectina también muestra un fragmento con homología a los componentes C8 y C9 del complemento, así como a CD59, un inhibidor del complejo de ataque a la membrana (MAC). Se ha propuesto que debido a esta homología la lectina pudiera ejercer un papel protector de los trofozoítos contra el MAC (Braga et al, 1992).

El complejo EhCPADH está formado por dos proteínas, una cisteína proteinasa (EhCP112) y una adhesina (EhADH112), codificados por dos genes adyacentes separados por 188 pb (Garcia-Rivera et al, 1999). La adhesina (EhADH112) tiene 687 aa y presenta un peso molecular de 75 kDa y el dominio de adherencia está localizado en el segmento que incluye los aminoácidos en la posición 444 – 601 (Garcia-Rivera et al, 1999; Martinez-Lopez et al, 2004). También, se ha propuesto que la cisteína proteinasa (EhCP112) participa en la virulencia del parásito (Ocadiz-Ruiz et al, 2013; Ocadiz et al, 2005)

Una vez que se da la adherencia, *E. histolytica* induce múltiples efectos citotóxicos sobre la célula del hospedero, incluyendo un incremento intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$ , 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: dependientes de contacto directo y los causados por proteínas secretadas por los trofozoítos próximos a la célula blanco (Christy & Petri, 2011).

El evento citolítico está mediado por diversos procesos: 1) permeabilización por péptidos formadores de poros (amebaporos), 2) inducción de apoptosis y 3) ruptura de la matriz extracelular a través de cisteína proteasas (Boettner & Petri, 2005; Leippe et al, 1994; Seydel & Stanley, 1998).

Los amebaporos, son un grupo de péptidos pequeños de 4.5 kDa, éstos forman canales iónicos por su asociación irreversible en oligómeros, similar al componente 9 del complemento y a la perforina de los linfocitos T citotóxicos (Leippe et al, 1994). Estos péptidos son mediadores de la lisis de las células blanco por las amibas patógenas (Leippe et al, 1994). Inicialmente en el parásito se encontraron tres isoformas de amebaporo (A, B y C), estando presentes en los trofozoítos en una proporción de 35:10:1 respectivamente (Christy & Petri, 2011; Leippe et al, 1994). Los amebaporos de la clase C son más efectivos mientras que los de clase A no son eficientes en la lisis de eritrocitos (Leippe et al, 1994). Posteriormente, se identificaron tres nuevas clases de amebaporos, por lo que *E. histolytica* tiene al menos, seis diferentes amebaporos (Loftus et al, 2005).

Después del contacto con la célula blanco, el trofozoíto induce la activación de la caspasa 3 humana, una molécula efectora distal, requerida para la muerte celular *in vitro* y para la formación del absceso hepático amibiano *in vivo* (Huston et al, 2000; Yan & Stanley, 2001).

Por otra parte, la alta virulencia de los aislados de *E. histolytica* correlaciona con el alto contenido de proteinasas tipo cisteína o catepsina en productos de secreción o en extractos proteicos de trofozoítos (Stanley et al,

1995). La acción de estas cisteínas proteinasas (CPs) es degradar las proteínas de la matriz extracelular y facilitar la invasión del trofozoíto (Stanley et al, 1995). La CP de 49 kDa que forma parte del complejo EhCPADH (EhCP112) es un polipéptido de 446 aa que presenta un dominio RGD que puede interactuar con las integrinas celulares, sugiriendo que esta proteinasa también participa en la patogenicidad de *E. histolytica* (Betanzos et al, 2013; Garcia-Rivera et al, 1999; Ocadiz et al, 2005).

Después del proceso de citólisis, la fagocitosis juega un papel importante durante el proceso de invasión del intestino humano por la ameba patógena (Christy & Petri, 2011; Marion & Guillen, 2006). Por su complejidad, este proceso puede dividirse en cuatro etapas. En la primera se efectúa la unión de partículas o células a los receptores de superficie de la célula fagocítica; en la segunda la interacción entre ligandos y receptores dispara una serie de eventos incluyendo la reorganización del citoesqueleto que lleva a la extensión de pseudópodos; posteriormente los pseudópodos se estrechan alrededor de la partícula para formar un fagosoma, que se fusiona secuencialmente con los endosomas tempranos y tardíos; finalmente el fagosoma se fusiona con los lisosomas, llevando así a la digestión de las partículas internalizadas (Rabinowitz et al, 1992).

En este proceso intervienen diferentes moléculas: adhesinas, componentes del citoesqueleto como la miosina IB y una proteína semejante a la espectrina (Marion & Guillen, 2006; Voigt et al, 1999); así como reguladores de la estructuración del citoesqueleto, tales como las GTPasas Rho y RacG (Godbold & Mann, 1998; Guillen et al, 1998); proteasas como EhCP5, EhCP1, EhCP112, EhCP2 y EhCP3 (Ankri et al, 1998; Garcia-Rivera et al, 1999; Ocadiz et al, 2005; Pertuz Belloso et al, 2004; Que et al, 2002); cinasas, como EhPAK, que controlan la motilidad y la fagocitosis (Labruyere et al, 2003); y moléculas que regulan el tráfico intracelular como las proteínas EhRab5, EhRab7, EhRab11B y EhRabB (McGugan & Temesvari, 2003; Rodriguez et al, 2000; Saito-Nakano et al, 2001; Temesvari et al, 1999; Welter et al, 2002).

Por otro lado, se ha caracterizado 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 las características como el incremento de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular, y resulta en la muerte celular, pero las células muertas pueden no ser ingeridas totalmente (Ralston et al, 2014).

### **3.6 Homeostasis del calcio**

El ion calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) juega un papel crucial como un segundo mensajero para el control de una variedad de funciones celulares en eucariontes, entre estas se encuentran la contracción, la secreción, la permeabilidad de sodio y potasio, la transcripción de genes, la división celular y la diferenciación, entre otras (Berridge et al, 2003). Así, es necesario mantener las concentraciones citosólicas de calcio para permitir que este ion funcione como molécula de señalización y se han descrito diversas proteínas que participan en la homeostasis del calcio, incluyendo varias proteínas de membrana (Giladi et al, 2016). La concentración citoplásmica de  $\text{Ca}^{2+}$  libre en reposo debe mantenerse en aproximadamente 100 nM, esto es regulado por el transporte del ion a través de las membranas por ATPasas e intercambiadores (Figura 5) que garantizan que las concentraciones de calcio en el citosol y en los almacenes internos se mantengan (Berridge et al, 2003).

#### **3.6.1 Canales de calcio**

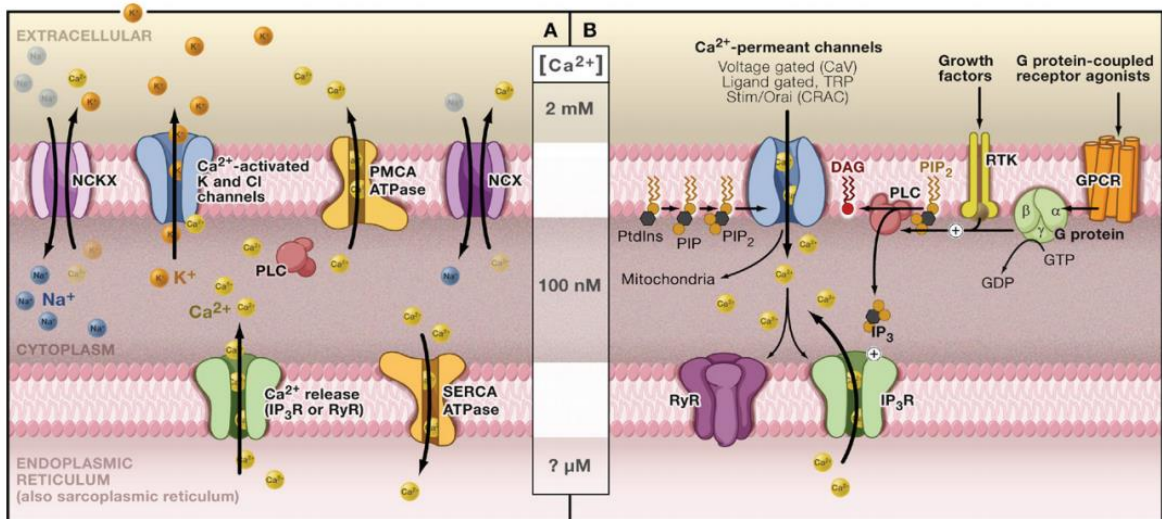
Los canales iónicos son proteínas integrales de membrana que forman un poro para permitir el paso de iones específicos, como  $\text{K}^+$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  o  $\text{Cl}^-$ , mediante difusión pasiva. Se distinguen de las bombas y transportadores porque permiten el paso de miles de iones (Jentsch et al, 2004). El abrir y cerrar de los canales puede ser controlado por voltaje, unión de ligandos y modificaciones post-traduccionales (Jentsch et al, 2004). Muchos canales están formados por complejos de proteínas con varias subunidades. A nivel celular, los canales se encargan de la regulación del volumen celular,



modulación de la proliferación y la transcripción, así como también del tráfico y la señalización intracelular (Catterall, 2000; Feranchak, 2003).

Los canales presentan características funcionales comunes como poseer: un poro acuoso por el cual los iones son capaces de pasar, un filtro de selectividad que permite discriminar entre los tipos de iones y una compuerta con la cual el canal puede cerrarse o abrirse al flujo de iones (Feranchak, 2003; Jentsch et al, 2004).

El  $\text{Ca}^{2+}$  ingresa a las células eucariontes a través de la membrana plasmática mediante diferentes canales, como canales de calcio operados por receptores, canales de calcio dependientes de voltaje y canales de calcio operados por almacenes (Figura 5) (Cao, 2006; Catterall, 2000; Moreno & Docampo, 2003).



**Figura 5. Moléculas que participan en la regulación de la concentración intracelular de calcio.** La concentración intracelular de calcio es regulada usando como fuente principal de calcio el medio extracelular. La célula controla la concentración de calcio por diferentes moléculas como bombas encargadas de sacar calcio del citosol, como PMCA, o de introducir calcio hacia depósitos intracelulares (SERCA) e intercambiadores  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  que sacan calcio del citosol, receptores de  $\text{IP}_3$  y rianodina que movilizan calcio de los depósitos intracelulares (retículo endoplásmico), y canales de calcio, que son activados cuando los niveles de calcio almacenado en los depósitos disminuye,

permitiendo la entrada de calcio extracelular (TRP, CRAC, CaV) (Clapham, 2007).

### **3.6.1.1 Canales de calcio dependientes de voltaje (vgccs)**

Los canales de calcio dependientes de voltaje (VGCCs, por sus siglas en inglés) son grandes complejos multiproteicos, con una subunidad  $\alpha 1$  formando el poro en la parte central, rodeado por subunidades auxiliares  $\gamma$ ,  $\alpha 2\delta$  y  $\beta$  (Catterall, 2000). Todas las células excitables expresan canales de calcio dependientes de voltaje, que traducen la actividad eléctrica a señales bioquímicas intracelulares (Catterall, 2000). La despolarización de la membrana trae como resultado la apertura de los canales, permitiendo una rápida entrada de calcio, la cual regula procesos como la liberación de neurotransmisores y neuropéptidos, la excitabilidad neuronal y la plasticidad, entre otros (Cao, 2006).

Los VGCCs se dividen en dos categorías, los activados por alto voltaje (HVA), que incluye los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo R, L, N y P/Q que necesitan de una fuerte despolarización para su activación y los activados por bajo voltaje que son los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo T que pueden ser activados por una despolarización más suave (Cao, 2006). Los canales tipo L se encuentran en el tejido cardíaco y son dependientes de dihidropiridinas (DHP). Los tipos P, N, T, Q y R se expresan en cerebro, los P y N son dependientes de  $\omega$ -conotoxina, mientras que los T no dependen de ningún agonista (Cao, 2006). Los canales de tipo L son más eficientes en la regulación de la expresión de genes, en cambio los de tipo T son los que contribuyen principalmente al control de la excitabilidad neuronal (Cao, 2006; Catterall, 2000).

### **3.6.1.2 Canales de calcio regulados por depósitos intracelulares (SOCCS)**

Los canales de calcio regulados por depósitos intracelulares (SOCCs, por sus siglas en inglés) existen en los eucariontes desde levaduras hasta humanos. La función principal de estos canales es mantener los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  en el retículo endoplásmico que son necesarios para el plegamiento y la

síntesis proteica (Parekh & Putney, 2005). La entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  regulada por depósitos (SOCE, por sus siglas en inglés) sirve como el único mecanismo de entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  en una variedad de células no excitables y juega un papel indispensable en la señalización del calcio y otros procesos celulares que van desde la proliferación hasta la apoptosis (Parekh & Putney, 2005).

El tipo de SOCC mejor caracterizado corresponde a los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  activados por la liberación de calcio (CRAC, por sus siglas en inglés). La búsqueda de los componentes moleculares de estos canales trajo como resultado el hallazgo de dos moléculas clave, que son STIM1 (molécula de interacción estromal 1) y Orai (subunidad formadora de poro del canal CRAC) (Derler et al, 2009). STIM1 es una fosfoproteína, la cual cuenta con un dominio transmembranal simple, un dominio N-terminal que se compacta en el lumen del retículo endoplásmico, un dominio C-terminal que se extiende hacia al citosol, un dominio de unión EF-Hand que junto con el dominio SAM permiten la unión del calcio a STIM1 y un dominio de N-glicosilación el cual al ser glicosilado permite la relocalización de STIM1 a la membrana plasmática (Parekh & Putney, 2005). STIM1 funciona como sensor de calcio en el retículo endoplásmico y cuando este ion se encuentra en bajas concentraciones en este organelo, STIM1 es capaz de relocalizarse en membrana plasmática donde activa a Orai1, evento que permite una corriente de calcio conocida como  $I_{\text{CRAC}}$  (Frischauf et al, 2008). Orai1 es una proteína de membrana plasmática con cuatro fragmentos transmembranales, los cuales son esenciales como unidades formadoras de poros de los CRAC, estos fragmentos son subunidades de Orai1 que se ensamblan entre sí para formar el canal; cada subunidad es importante para la activación de este mecanismo, ya que mutaciones en cualquiera de ellas tiene como resultado una baja corriente de iones calcio (Frischauf et al, 2008).

### 3.6.1.3 Receptores de potencial transitorio (TRP)

Los receptores de potencial transitorio (*TRP*, por sus siglas en inglés) también son canales de calcio regulados por depósitos intracelulares. Estos canales de tipo TRP tienen diferentes papeles en vertebrados e invertebrados, entre ellos, la transducción visual, el gusto, la detección de feromonas y la recepción térmica, entre otros (Ramsey et al, 2006). Los TRP son canales iónicos selectivos para los cationes de calcio y magnesio, éstos se encuentran en membrana y presentan estructuras similares a los canales dependientes de voltaje de potasio, sodio y cloro, ya que los canales TRP presentan 6 fragmentos transmembranales y los extremos amino y carboxilo terminales son intracelulares (Ramsey et al, 2006). Estos canales se agrupan con base en su secuencia de aminoácidos y su similitud estructural, dividiéndolos así en las familias TRPA, TRPC, TRPM, TRPL, TRPN, TRPP y TRPV (Ramsey et al, 2006).

Los canales TRP pueden ser activados por receptores, ligandos o por activación directa (Ramsey et al, 2006). La activación por receptores se lleva a cabo por receptores acoplados a proteínas G y por receptores de tirosina cinasas que activan a la fosfolipasa C (PLC), que a su vez modula la activación de los TRP, la cual se realiza mediante la hidrólisis de PIP<sub>2</sub>, la producción de diacilglicerol (DAG), o la producción de IP<sub>3</sub> (Ramsey et al, 2006). La activación por ligando se puede dar por pequeñas moléculas de origen exógeno, incluyendo compuestos sintéticos y productos naturales (capsaicina, icilina, 2-aminoethoxydifenilborato); por lípidos endógenos o por productos del metabolismo de los lípidos (DAG, IP<sub>3</sub>, eicosanoides); por nucleótidos púricos y sus metabolitos (adenosina difosforibosa,  $\beta$ NAD); o por iones inorgánicos como el calcio y el magnesio (Ramsey et al, 2006). La activación directa es dada por estímulos mecánicos, acoplamiento conformacional a receptores IP<sub>3</sub> y por fosforilación del canal, sin embargo, aún es poco lo que se sabe de este tipo de activación (Ramsey et al, 2006).

#### **3.6.1.4 Canales liberadores de calcio**

El retículo sarco/endoplásmico contiene canales especializados en la liberación del calcio: el receptor de rianodina (RyR) y el receptor de inositol trifosfato (IP3R). Estos receptores comparten homología significativa, pero cada canal liberador de calcio tiene sus propias cualidades funcionales (Fill & Copello, 2002).

RyR es una familia de canales liberadores de calcio encontrados en el retículo sarco/endoplásmico de muchos tipos celulares y que son requeridos para la liberación de calcio intracelular involucrado en diversas funciones celulares, incluyendo contracción y liberación de neurotransmisores (Zalk et al, 2007). El largo dominio citoplásmico del RyR sirve como un andamiaje de proteínas que une y modula la función del canal y que comprende una compleja señalización macromolecular (Lanner et al, 2010). Las proteínas de unión a este canal incluyen proteínas de unión FK506 (FKBPs), calmodulina (CaM), fosfodiesterasas, cinasas y fosfatasas, entre otras (Zalk et al, 2007). En mamíferos existen tres isoformas de RyR que se han identificado y clonado. El RyR es un complejo homotetramérico de aproximadamente 2200 kDa con cuatro subunidades de 564 kDa, formando un cuadrado alrededor de un poro central (Lanner et al, 2010).

El receptor de inositol trifosfato (IP3R) es un canal que funciona para liberar el calcio de almacenes intracelulares en respuesta a IP3 (Suresh & György, 2007). Comprende cuatro subunidades heterotriméricas, donde cada subunidad puede ser dividida en tres regiones: un dominio de unión a IP3 en el N-terminal; un dominio C-terminal que comprende la secuencia formadora del canal con un tallo C-terminal corto; y un dominio intermedio de acoplamiento que contiene múltiples sitios de interacción con diferentes moduladores (Mikoshiba, 2007; Szlufcik et al, 2006). La secuencia necesaria para la unión específica de IP3, llamada centro de unión IP3, se encuentra entre los residuos 226-578 (Szlufcik et al, 2006). La función del IP3R es regulada mediante fosforilación por cinasas dependientes de cGMP y cinasas dependientes de  $Ca^{2+}$ /calmodulina (Mikoshiba, 2007).

### **3.6.2 ATPasas de calcio**

Las ATPasas de calcio catalizan el flujo de calcio citoplásmico y se han dividido en tres tipos: ATPasas de membrana plasmática (PMCA, por sus siglas en inglés), ATPasas del retículo sarco/endoplásmico (SERCA, por sus siglas en inglés) y ATPasas de la vía secretora (SPCA, por sus siglas en inglés) (Brini & Carafoli, 2009).

#### **3.6.2.1 ATPasas de calcio de membrana plasmática (PMCA)**

Las PMCA se encargan de expulsar  $Ca^{2+}$  del citosol de las células eucariotas (Figura 5). Son de expresión ubicua y con una capacidad de transporte bajo (Strehler et al, 2007). Estas bombas ayudan a mantener la homeostasis del calcio y a mantener un control de la señalización del calcio intracelular (Strehler et al, 2007).

En humanos se han encontrado cuatro isoformas codificadas por genes independientes que incrementan su diversidad por “splicing” alternativo, sus extremos N- y C-terminal son las regiones menos conservadas y se encuentran involucrados en varias interacciones proteína-proteína, como es la unión del regulador calmodulina en el extremo C-terminal (Strehler et al, 2007). Debido a la gran diversidad de isoformas, las PMCAs tienen una gran versatilidad funcional y participan en diferentes procesos celulares, como motilidad espermática, señalización de retroalimentación en el corazón y regulación del calcio pre y post-sináptica en neuronas (Strehler et al, 2007). Esto se debe a su regulación por calmodulina, por cinasas y por otras proteínas de señalización (Strehler et al, 2007).

#### **3.6.2.2 ATPasas de calcio de *retículo sarco/endoplásmico* (SERCA)**

La bomba SERCA es la responsable de la captura del ion calcio en el retículo sarco/endoplásmico, que es el principal centro de almacenamiento del calcio intracelular (Wuytack et al, 2002). SERCA consiste en una sola cadena polipeptídica plegada en cuatro dominios principales: un dominio transmembrana M, compuesto de 10 hélices transmembranales y 3 dominios

citoplásmicos. Dos de estos últimos, el dominio actuator A y el dominio de fosforilación P, están conectados al dominio M, mientras que el dominio de unión a nucleótido N, está conectado al dominio P. Los dos sitios de unión a calcio se localizan en el dominio M (Wuytack et al, 2002).

En vertebrados se han identificado tres diferentes genes de SERCA que por “splicing” alternativo expresan cada uno diversas isoformas de la enzima (SERCA1a/b, SERCA2a/b y SERCA3a/b/c/d/e) (Wuytack et al, 2002). Las ATPasas SERCA se distinguen de las bombas de  $\text{Ca}^{2+}$  de membrana plasmática (PMCA) o incluso de las bombas SPCA por su sensibilidad a inhibidores selectivos como tapsigargina, ácido ciclopiazónico y 2,5-di-(tert-butyl)-1,4-benzohydroquinona (Wuytack et al, 2002).

SERCA1a/b (en humanos SERCA1a de 994 aminoácidos y SERCA1b de 1001 aminoácidos) representan las isoformas más especializadas de las bombas de calcio y son encontradas en altas cantidades en el retículo sarcoplásmico de fibras de musculo esquelético de diferentes animales (Wuytack et al, 2002).

SERCA2 parece ser filogenéticamente la más antigua, también expresa dos isoformas SERCA2a de 997 aminoácidos y SERCA2b de 1042 aminoácidos. SERCA2a es la principal isoforma de la bomba de  $\text{Ca}^{2+}$  en el retículo sarcoplásmico de músculo cardiaco y de fibras musculares, en cambio SERCA2b se ha considerado como una isoforma “house-keeping” (Wuytack et al, 2002). En vertebrados, la isoforma SERCA2b contiene un segmento hidrofóbico con la inclinación de formar un segmento transmembrana adicional (Wuytack et al, 2002). La forma SERCA2b interactúa con calreticulina o calnexina para adquirir su propiedad funcional típica (Wuytack et al, 2002). La interacción de calreticulina con SERCA2b ocurre en la presencia de  $\text{Ca}^{2+}$  luminal mientras que con calnexina la interacción parece ser además dependiente de la fosforilación del residuo de serina en la posición 562 (Ser562) (Wuytack et al, 2002).

Entre los vertebrados la bomba SERCA3 es la de más reciente descubrimiento y a la fecha se han descrito cinco diferentes variantes en humano (Wuytack et al, 2002).

### **3.6.2.3 ATPasas de calcio de las vías secretoras (SPCA)**

Estas ATPasas se localizan en el aparato de Golgi y en levaduras se conocen como PMR. La primera ATPasa de calcio reportada como asociada al aparato de Golgi fue la PMR1 de *Saccharomyces cerevisiae* (Rudolph et al, 1989). Posteriormente se han encontrado homólogos de esta proteína en diferentes organismos. En el humano esta proteína se conoce como ATPasa de calcio de vías secretoras (SPCA) (Benaim, 2004; Mitchell et al, 2004). Se sabe que esta ATPasa transporta calcio y manganeso, los cuales se utilizan para llevar a cabo procesos de transporte intra-Golgi, transporte entre Golgi y retículo endoplásmico y para la fusión de endosomas (Vanoevelen et al, 2005).

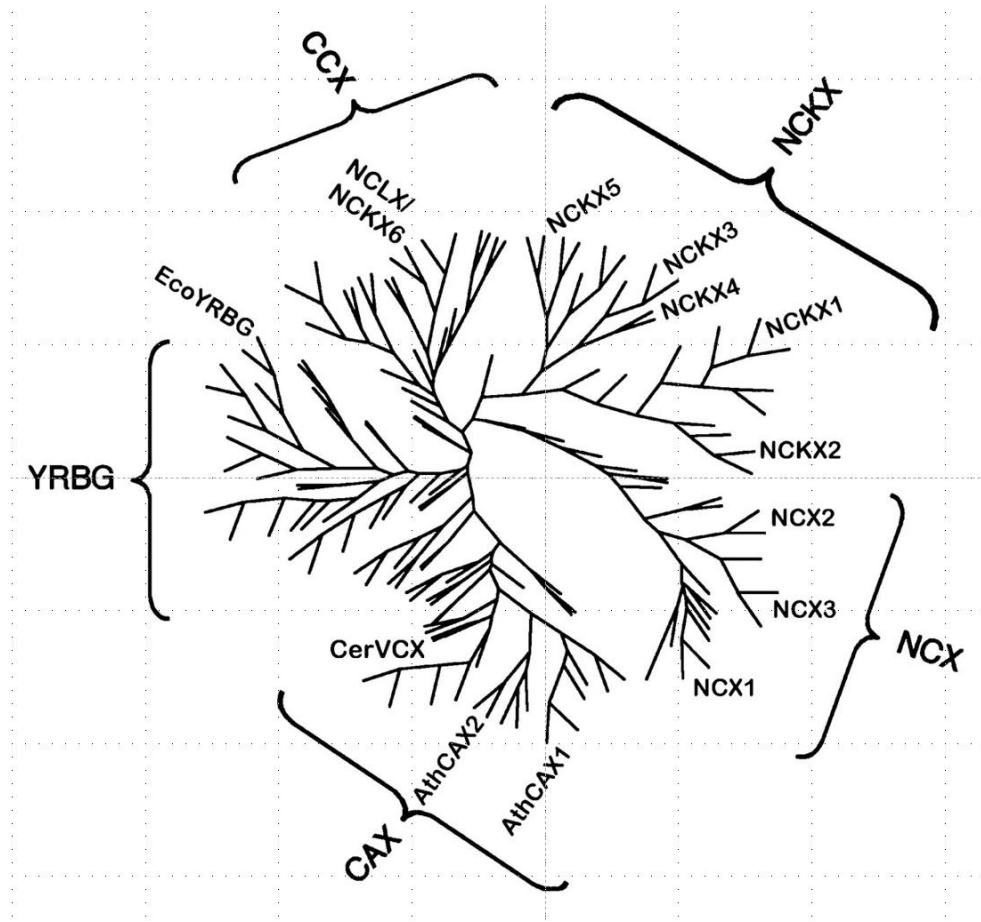
### **3.6.3 Intercambiadores de calcio**

Entre las diferentes vías que median el movimiento de  $\text{Ca}^{2+}$ , el intercambiador  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  se ha convertido en el mecanismo predominante para el flujo de  $\text{Ca}^{2+}$  a través de la membrana plasmática, particularmente cuando los niveles generales de  $\text{Ca}^{2+}$  son altos (Lytton, 2007). Estos intercambiadores transportan iones con alta capacidad, pero baja afinidad y pueden rápidamente expulsar iones calcio de la célula, en comparación con las PMCA que presentan alta afinidad, pero baja capacidad de transporte (Sharma & O'Halloran, 2014). Los intercambiadores de  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  de mamíferos son miembros de tres ramas de una larga familia de proteínas de transporte (Superfamilia CaCA (antiporter catión/ $\text{Ca}^{2+}$ ) (Figura 6), cuya función principal es proporcionar control del flujo de  $\text{Ca}^{2+}$  a través de la membrana plasmática o compartimentos intracelulares (Lytton, 2007). Esta superfamilia es dividida en cinco familias nombradas por miembros representativos caracterizados: 1) YRBG, comprende en gran parte miembros bacterianos; 2) intercambiadores anión/ $\text{Ca}^{2+}$  (CAX) que se encuentran principalmente en plantas y levaduras; 3) intercambiadores



sodio/calcio (NCX); 4) intercambiadores sodio/calcio+potasio (NCKX). NCX Y NCKX están compuestos exclusivamente por miembros presentes en vertebrados; y 5) intercambiadores catión/ $\text{Ca}^{2+}$  (CCX), familia que contiene al intercambiador  $\text{Na}^+$  o  $\text{Li}^+/\text{Ca}^{2+}$  (NCLX) de humano, previamente llamado NCKX6 (Lytton, 2007; Sharma & O'Halloran, 2014).

Las ramas YRBG y CAX probablemente catalizan el intercambio  $\text{H}^+/\text{Ca}^{2+}$ ; NCX y NCKX catalizan el intercambio  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}+\text{K}^+$ , respectivamente; y la familia CCX se ha demostrado catalizar ambos intercambios  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Li}^+/\text{Ca}^{2+}$  (Lytton, 2007). En mamíferos existen tres genes NCX, cinco NCKX y uno NCLX (Sharma & O'Halloran, 2014). Bajo condiciones fisiológicas, los intercambiadores NCX utilizan la energía almacenada en los gradientes transmembranales de sodio para permitir el flujo de iones sodio y la expulsión de un ion calcio (Sharma & O'Halloran, 2014). La bomba realiza el intercambio de los iones en una relación de 1:3 (una molécula de calcio por tres moléculas de sodio) (On et al, 2008). Los intercambiadores NCKX, al igual que las NCX se localizan en membrana plasmática, expulsan una molécula de calcio y una de potasio por cada cuatro moléculas de sodio que entran (Kang et al, 2005).



**Figura 6. Filogenia de la superfamilia antiporter catión/calcio (CaCA).** Árbol filogenético de 147 miembros de la superfamilia de CaCA (Lyttón, 2007).

### 3.6.3.1 Topología y estructura

Los intercambiadores de calcio tienen una topología general de 10 dominios transmembranales; en los dominios transmembranales 2-3 y 7-8 existen dos dominios conocidos como alfa repetidos ( $\alpha 1$  y  $\alpha 2$ ), dentro de los cuales se localizan los residuos esenciales para la unión y el transporte de los iones (Sharma & O'Halloran, 2014). En NCX1, los sitios de unión a calcio extracelular son E113 y D814; los sitios de unión intracelular de sodio son S109, S110, N143, S811, S838 y N842; y los sitios de unión extracelular de sodio son

S139 y T810 (Sharma & O'Halloran, 2014). Entre las regiones transmembranales 5 y 6, NCX1 tiene un asa intracelular larga que contiene dos dominios (CBD1 y CBD2) que unen iones calcio o sodio y son requeridos como sensores de los iones intracelulares, la unión de iones calcio activa al intercambiador, mientras que la unión de iones sodio promueve la inactivación (Brini & Carafoli, 2011). CBD1 es el sensor primario que detecta bajos incrementos de calcio citosólico, sometiéndose a cambios estructurales que activan el intercambiador (Brini & Carafoli, 2011). CBD2 sufre moderados cambios estructurales y se une a calcio solo en concentraciones elevadas (Brini & Carafoli, 2011). El funcionamiento del intercambiador es completamente reversible, y la dirección del movimiento de los iones transportados depende totalmente de los gradientes electroquímicos de sodio y calcio y en el número de iones que se unen y son transportados (Brini & Carafoli, 2011; Sharma & O'Halloran, 2014). Esta asa también contiene un dominio denominado péptido inhibidor de intercambiador (XIP) que tiene la propiedad de inactivar el transporte de sodio (Sharma & O'Halloran, 2014).

No se tiene aún una estructura de cristal para la proteína completa de estos intercambiadores en eucariontes, sin embargo, recientemente se propuso la estructura cristalina para el "antiporter" de calcio en levadura (Vcx1), el cual pertenece a la familia de transportadores calcio/protón (Sharma & O'Halloran, 2014). En hongos y plantas se han encontrado intercambiadores CCX que tienen propiedades estructurales y fisiológicas similares a los intercambiadores NCX (Sharma & O'Halloran, 2014).

### **3.6.3.2 Inhibidores**

Derivados de benzyloxyfenilos (KB-R7943, SEA0400 Y SN-6) son considerados inhibidores selectivos de NCX (Flores-Soto et al, 2012; Iwamoto, 2004; Iwamoto et al, 2004). Cationes divalentes y trivalentes ( $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$  y  $\text{La}^{3+}$ ) y compuestos orgánicos como bepridil y 3',4' diclorobenzamida, pueden actuar como inhibidores de NCX, sin embargo, son poco específicos ya que bloquean otros transportadores de iones y canales (Iwamoto, 2004). En 1996, el

compuesto KB-R7943 fue desarrollado como inhibidor selectivo de NCX, sin embargo, se ha reportado que posee acciones no específicas sobre canales iónicos, receptores de acetilcolina nicotínicos neuronales, el receptor N-metil-D-aspartato y el transportador norepinefrina (Iwamoto, 2004). Por otra parte, el compuesto SN-6 muestra una potencia de inhibición similar a KB-R7943, pero es más específico para NCX1 (Iwamoto, 2004).

En 2001 se describió que el compuesto SEA0400 es un inhibidor más potente y selectivo de NCX (Matsuda et al, 2001). SEA0400 es altamente específico para NCX debido a que no inhibe otros receptores, canales o transportadores (Iwamoto, 2004; Matsuda et al, 2001). El dominio de interacción de cada derivado benzyloxyfenilo difiere entre isoforma. Para KB-R7943 la región  $\alpha$ -2 es la responsable de la respuesta de la droga entre NCX1 y NCX3 (Iwamoto, 2004). La diferencia en la respuesta a SEA0400 y SN-6 está en la región de la primera asa intracelular y quinta transmembranal (y parte de la región XIP) (Iwamoto, 2004; Iwamoto et al, 2004). Por medio de mutagénesis dirigida se conoce que los inhibidores poseen determinantes moleculares para la interacción con NCX (Iwamoto, 2004; Iwamoto et al, 2004). Los residuos F-213 y V-227/Y-228 son determinantes específicos para la inhibición por SEA0400 y SN-6 (Iwamoto, 2004).

### **3.7 Transporte de calcio en protozoarios parásitos**

El  $\text{Ca}^{2+}$  también es fundamental en procesos de señalización en parásitos protozoarios, como *E. histolytica*, *Trypanosoma cruzi*, *Trypanosoma brucei*, *Leishmania sp*, *Plasmodium sp*, *Toxoplasma gondii*, *Cryptosporidium parvum*, *Giardia lamblia* y *Trichomonas vaginalis*. Por ejemplo, se sabe que el calcio controla un número importante de eventos en parásitos apicomplexa incluyendo motilidad, secreción y diferenciación (Moreno & Docampo, 2003). La homeostasis de calcio en parásitos protozoarios es mediada por varios organelos, como el retículo endoplásmico, mitocondrias y acidocalcisomas que secuestran calcio intracelular. Sin embargo, se conoce muy poco sobre los

sistemas que controlan la homeostasis o regulan la señalización del calcio en estos microorganismos.

El análisis de los genomas de los apicomplexa *Plasmodium* spp, *Cryptosporidium* spp y *Toxoplasma gondii* (Nagamune et al, 2008) reveló la presencia de varias ATPasas de calcio, incluyendo una sola ATPasa de tipo SERCA que se ha propuesto como el blanco del fármaco artemisina (Eckstein-Ludwig et al, 2003; Nagamune et al, 2007), varias ATPasas similares a SPCA y un solo intercambiador del tipo CAX. Además, *T. gondii* mostró la presencia de canales de calcio dependientes de voltaje, un homólogo de calmodulina y una ATPasa de membrana plasmática del tipo PMCA (TgA1) (Nagamune et al, 2008). También, en *C. parvum* se caracterizó una ATPasa de calcio similar a una ATPasa de *P. falciparum* (PfATPase4) (Zhu & Keithly, 1997). El intercambiador tipo CAX de *P. falciparum* se localiza en la membrana interna de la mitocondria, donde se sugiere participa en el transporte de calcio de este organelo al citosol (Rotmann et al, 2010). Por otra parte, el intercambiador CAX de *P. berghei* se expresa solamente en las etapas sexuales del desarrollo (preferencialmente en el gameto femenino) y el “knockout” del gen es letal en el desarrollo de oocinetos (Guttery et al, 2013).

Por otra parte, en los trypanosomatidos se han identificado diferentes proteínas involucradas en el transporte de calcio, incluyendo canales de calcio tipo VGCC y TRP, ATPasas de calcio tipo PMCA y SERCA, un receptor a IP3 localizado en acidocalcisomas y un intercambiador tipo CAX (Ramakrishnan & Docampo, 2018). En *Trypanosoma brucei* el intercambiador tipo CAX se sugiere que participa en la liberación de calcio debido a un incremento de sodio mediado por un intercambiador de  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  (Vercesi & Docampo, 1996).

En *Trichomonas vaginalis* se identificaron cuatro ATPasas de calcio, una de las cuales corresponde al tipo de SERCA (Meade et al, 1997; Shah et al, 2002), mientras que en *Giardia lamblia* se detectó un compartimento de almacenaje de calcio sensible a taspigargina, sugiriendo la presencia de una ATPasa de calcio del tipo SERCA (Reiner et al, 2003).

## 4 ANTECEDENTES PARTICULARES

### 4.1 Importancia del calcio en *Entamoeba* sp.

El flujo del ion calcio está involucrado tanto en la patogénesis como en el desarrollo de *Entamoeba* sp. Cuando *E. histolytica* inicia el proceso citopatogénico, los trofozoítos se adhieren a la célula blanco a través de diversas adhesinas, y se ha visto que este evento se inhibe por bloqueadores de canales de calcio, como bepridil y verapamil (Ravdin et al, 1982). Por otra parte, el calcio induce la exocitosis de vesículas ácidas, las cuales pueden contener cisteína proteasas, enzimas involucradas en el proceso citopatogénico de la amiba (Ravdin et al, 1988b). Además, se ha reportado que antagonistas de calcio, bloqueadores de canales de calcio e inhibidores de calmodulina inhiben el crecimiento de *E. histolytica* y el crecimiento y enquistamiento de *E. Invadens*, un parasito de reptiles que se usa como modelo de enquistamiento de *Entamoeba* sp. (Makioka et al, 2001).

La liberación del calcio de depósitos intracelulares presentes en los trofozoítos es promovida por el inositol 3-fosfato (IP3) y el inositol 4-fosfato (IP4), lo que sugiere que en la amiba existen estructuras que funcionan como depósitos del ion calcio y que muy probablemente correspondan al retículo endoplásmico (Raha et al, 1994; Raha et al, 1995). Por otra parte, la liberación de calcio provoca la activación de diversas cinasas y proteínas unidoras de calcio (CaBPs) en este parásito. A la fecha, se han descrito dos isoformas de estas últimas: EhCaBP1 y EhCaBP2 (Jain et al, 2008). EhCaBP1 se une directamente a actina, y la sobreexpresión de una mutante de EhCaBP1 con menor afinidad a calcio tiene como resultado una baja proliferación de la amiba, una eritrofagocitosis deficiente y una baja activación de cinasas endógenas que pueden estar involucradas en procesos de señalización implicados en la formación del fagosoma (Jain et al, 2008; Sahoo et al, 2004). EhCaBP2 es una proteína monomérica de 15 kDa, que al igual que EhCaBP1, presenta cuatro dominios de unión a calcio (EF-hand) y está involucrada en la vía de transducción de señales de calcio (Chakrabarty et al, 2004). Las dos isoformas

son funcionalmente diferentes, y se unen a conjuntos de proteínas diferentes de manera dependiente de calcio (Chakrabarty et al, 2004).

El calcio también se encuentra involucrado en la regulación transcripcional de *E. histolytica*. URE3-BP es un factor de transcripción que modula la expresión genética de al menos un factor de virulencia, la subunidad pesada de la lectina Gal/GalNAc 5 (hgl5) (Gilchrist et al, 2003). Este factor se une al motivo URE3 (upstream regulatory element 3) presente en el promotor del gen y esta unión es regulada por la unión a calcio. En ensayos *in vitro*, la adición de calcio inhibe la unión de URE3-BP a la secuencia URE3, y por tanto modifica la expresión de la lectina Gal/GalNAc y posiblemente de otros factores de virulencia (Gilchrist et al, 2003).

A pesar de la importancia de calcio en diversos procesos celulares de *E. histolytica*, poco se sabe acerca de los eventos y moléculas que participan en la regulación de los niveles intracelulares de este ion.

#### **4.2 Canales iónicos en *E. histolytica***

Hasta el momento no se han identificado canales de calcio en *E. histolytica*, sólo se ha reportado la secuencia de dos canales iónicos, correspondientes a canales de cloro (*EhCIC-A* y *EhCIC-B*) (Salas-Casas et al, 2006). Análisis filogenéticos muestran que estos canales codificados por la ameba pertenecen a la familia de canales de cloro de membrana plasmática, lo cual fue confirmado para *EhCIC-A* mediante el uso de anticuerpos específicos, los cuales localizaron al canal en la membrana plasmática de la ameba (Salas-Casas et al, 2006). Mediante ensayos electrofisiológicos en ovocitos de *Xenopus laevis* que expresaban el canal de cloro *EhCIC-A* se mostró que este tiene especificidad por el ion cloro y que está implicado en la regulación del pH y el volumen celular (Salas-Casas et al, 2006).

#### **4.3 ATPAsas de calcio en *E. histolytica***

Como se mencionó anteriormente, hasta el momento no se ha identificado en este parásito ningún canal de calcio, pero si se ha mostrado la

presencia de ATPasas de calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasas). Una de estas bombas corresponde a una proteína de 1086 aminoácidos relacionada con las ATPasas de calcio del tipo PMCA de *Trypanosoma cruzi* y *Dictyostelium discoideum* (Ghosh et al, 2000). Cuando esta PMCA se expresó fusionada a un repetido de quitinasa en el extremo C-terminal, se encontró que ésta se localizaba en vacuolas cercanas a la periferia de la amiba y no en la membrana plasmática, como era de esperarse (Ghosh et al, 2000).

En nuestro grupo de trabajo, mediante un análisis *in silico* se identificaron ocho secuencias génicas que podrían codificar para ATPasas de calcio en *E. histolytica* (Martinez-Higuera et al, 2013). De estas posibles ATPasas de calcio solo cinco, incluyendo la reportada por Ghosh *et al* (Ghosh et al, 2000), contienen todas las características de una  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa típica: 10 dominios transmembranales, un dominio N-terminal que une al nucleótido ATP, el dominio E1-E2 que une al calcio, el dominio de hidrolasa que se encarga de la hidrólisis del ATP y un dominio C-terminal que podría tener función reguladora (Wuytack et al, 2002). Experimentos de RT-PCR mostraron que las cinco ATPasas de calcio putativas se expresan en los trofozoítos de *E. histolytica* (Martinez-Higuera et al, 2013), sugiriendo que todas ellas podrían participar en la regulación de la concentración intracelular de calcio en este parásito.

Mediante análisis filogenéticos se encontró que tres de estas secuencias se agrupan con ATPasas de calcio de membrana plasmática (PMCA), una con la ATPasa de calcio de retículo endoplásmico (SERCA) y una última con las ATPasas de calcio de Golgi (PMR1/SPCA) (Martinez-Higuera et al, 2013).

La probable ATPasa del tipo SERCA, contiene en su extremo C-terminal una secuencia HDDL similar al motivo de retención al retículo endoplásmico de *Saccharomyces cerevisiae* (HDEL), difiriendo en un residuo de glutamato por aspartato (Martinez-Higuera et al, 2013). La incubación de trofozoítos con un bloqueador específico de SERCA, tapsigargina, causó una disminución en sus propiedades de virulencia *in vitro* (adhesión, efecto citopático y fagocitosis), denotando que la amiba cuenta con un retículo endoplásmico funcional que



contiene una proteína homóloga a la ATPasa del tipo SERCA (EhSERCA) (Martinez-Higuera et al, 2013).

Para iniciar la caracterización de EhSERCA, se inmunizaron ratones con un péptido sintético correspondiente a una secuencia específica de dicha proteína para obtener anticuerpos contra ella (anti-*EhSERCA*). En ensayos de Western blot los anticuerpos reconocieron una sola banda de aproximadamente 115 kDa en extractos totales de trofozoítos de *E. histolytica* (Martinez-Higuera et al, 2013). Ensayos de inmunolocalización mediante fluorescencia indirecta detectaron a la proteína en una red citoplásmica continua, semejante a la estructura reportada como el retículo endoplásmico de *E. histolytica* (Martinez-Higuera et al, 2013). Además, estos ensayos de microscopía confocal y otros de microscopía electrónica mostraron que EhSERCA colocaliza con calreticulina, proteína situada principalmente en el retículo endoplásmico (Martinez-Higuera et al, 2013). Estos resultados sugieren fuertemente que la proteína identificada corresponde a la ATPasa de calcio del tipo SERCA.

Utilizando el anticuerpo contra EhSERCA también se identificó la ATPasa de retículo endoplásmico de *E. invadens* (EiSERCA) y se encontró que su bloqueo por tapsigargina inhibe el enquistamiento, sugiriendo que el flujo de calcio mediado por SERCA juega un papel importante en la diferenciación del género *Entamoeba* (Martinez-Higuera et al, 2015).

#### **4.4 Identificación de un posible intercambiador sodio/calcio en *E. histolytica* (EhCCX)**

Debido a la falta de información acerca de proteínas que ayudan a regular las concentraciones de calcio en *E. histolytica*, durante el trabajo de Tesis de Maestría se realizó un análisis *in silico* en la base de datos del genoma de este parásito con el fin identificar un posible intercambiador de calcio (Valle-Solis, 2013). En ese trabajo encontramos una secuencia, con número de acceso XP\_649624.2, que pudiera corresponder a un intercambiador (Valle-Solis, 2013). El análisis filogenético de esta proteína mostró que este posible intercambiador se agrupa dentro del tipo sodio/calcio (NCX), encontrando una

cercanía filogenética con intercambiadores de calcio de *Arabidopsis thaliana*, *Anopheles gambiae*, *Mus musculus*, *Oryctolagus cuniculus*, *Xenopus laevis* y *Homo sapiens* (Valle-Solis, 2013). Además, mediante el programa SMART se detectaron los dominios funcionales de transporte de calcio y sodio (NCX). Mediante un alineamiento múltiple con los que presenta fuerte relación filogenética se encontró que el posible intercambiador amibiano presenta los dos  $\alpha$ -dominios que se encuentran conservados en toda la familia de intercambiadores con un alto valor de similitud. Mediante ensayos de RT-PCR se demostró la expresión del gen en los trofozoítos (Valle-Solis, 2013). Todos estos resultados sugieren la presencia de un intercambiador de calcio en *E. histolytica*, por lo tanto, caracterizar este posible intercambiador nos podría ayudar a conocer más acerca de cómo se regulan las concentraciones de calcio en este microorganismo parásito, evento que se ha visto tiene un papel importante en el desarrollo, la diferenciación y el proceso patogénico de *Entamoeba* sp.

## 5 JUSTIFICACIÓN

En *E. histolytica* el ion calcio tiene un papel importante en el proceso patogénico, en la regulación transcripcional de este parásito, además de regular el enquistamiento en *E. invadens*.

A pesar de esto, se conoce poco acerca de las proteínas encargadas de regular el flujo de calcio después de un proceso de señalización. En otros organismos los intercambiadores de calcio participan en la restauración de los niveles de calcio después de una señal. Así, la caracterización funcional del posible intercambiador sodio/calcio en amibas ayudaría a dilucidar el mecanismo de regulación de las concentraciones intracelulares de calcio y su posible participación en algunos eventos celulares, como la respuesta a diferentes condiciones de estrés, así como en la virulencia de este patógeno.

## 6 HIPÓTESIS

*E. histolytica* presenta un intercambiador sodio/calcio que está involucrado en la regulación de la concentración intracelular del ion calcio y por lo tanto, en procesos de señalización inducidas por este ion, como la muerte celular programada y la virulencia *in vitro*.

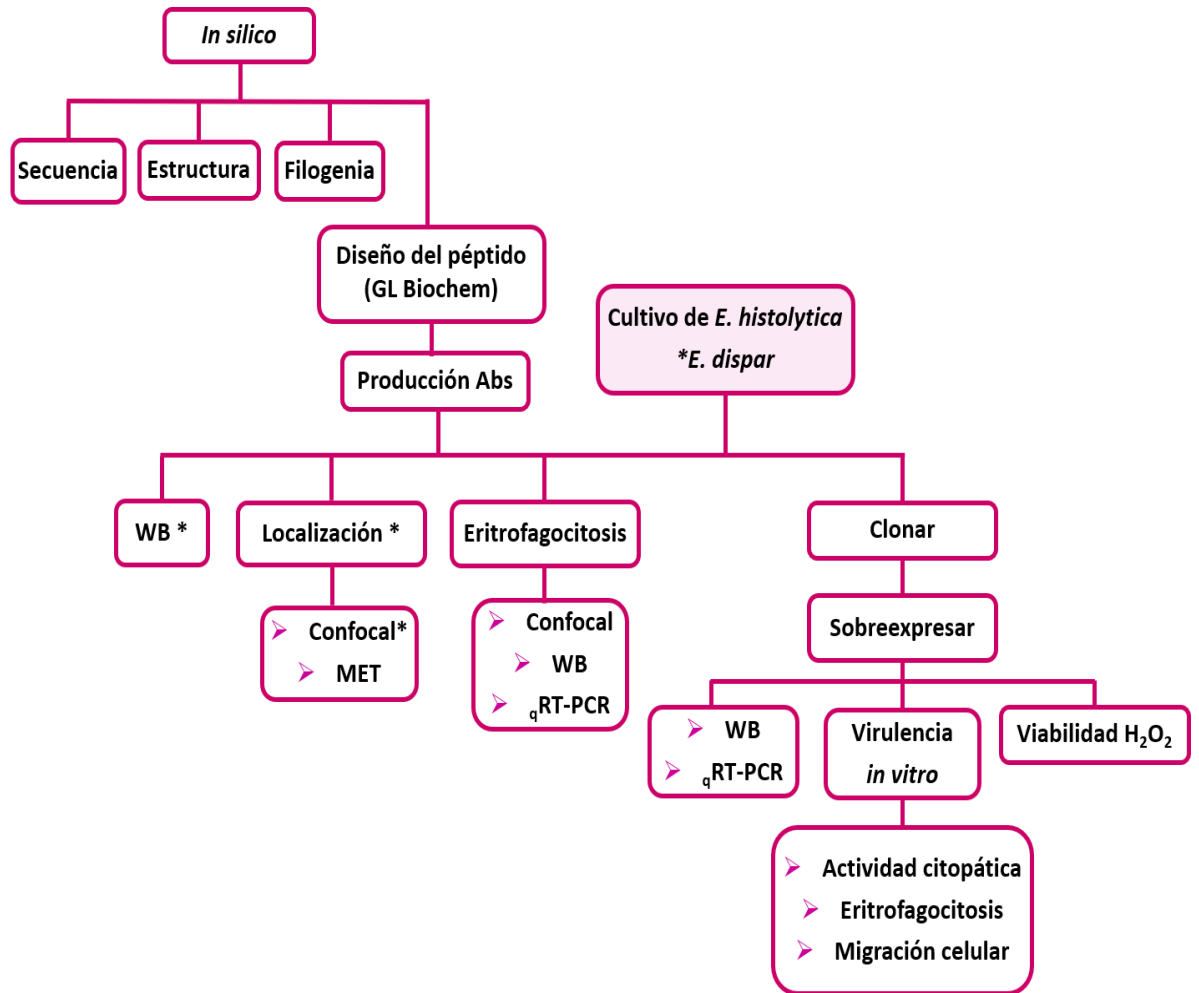
## **7 OBJETIVO GENERAL**

Caracterizar funcionalmente el intercambiador de calcio de *E. histolytica* y analizar su participación en la muerte celular programada y en la virulencia *in vitro*.

## **8 OBJETIVOS PARTICULARES**

1. Analizar *in silico* la proteína del intercambiador de calcio de *E. histolytica*.
2. Localizar subcelularmente el intercambiador en los trofozoítos.
3. Comparar la expresión y localización del intercambiador en trofozoítos de *E. histolytica* y de *E. dispar*.
4. Examinar la expresión y localización del intercambiador durante el estrés oxidativo y térmico.
5. Analizar la localización y expresión del intercambiador durante la eritrofagocitosis.
6. Confirmar el papel del intercambiador en la regulación de las concentraciones intracelulares de calcio.
7. Evaluar el papel de la sobreexpresión del intercambiador en la muerte celular programada y en la virulencia *in vitro* de los trofozoítos de *E. histolytica*.

## 9 ESTRATEGIA EXPERIMENTAL



## 10 MATERIALES Y MÉTODOS

### 10.1 Cultivo de *E. histolytica* y *E. dispar*

Trofozoítos de *E. histolytica* de la clona A (cepa HM1-IMSS) (Orozco et al, 1983) se cultivaron a 37 °C en medio axénico TYI-S-33 (Diamond et al, 1978), mientras que los trofozoítos de *E. dispar* (strain SAW 760) se cultivaron axénicamente en medio YI-S (Diamond et al, 1995). El medio fue suplementado con 15% de suero bovino inactivado por calentamiento a 56 °C durante 30 min, 3 % de mezcla de vitaminas de Diamond (KC Biológica, USA), 40 UI de penicilina (AMSA Laboratorios) y 57 µg/ml de estreptomicina (PISA). Los parásitos se colectaron en la fase logarítmica de crecimiento por incubación en baño de hielo durante 5 a 10 min, se centrifugaron a 800 x g durante 10 min a 4 °C para obtener el paquete celular, y los parásitos se lavaron dos veces con amortiguador salino de fosfatos (PBS).

### 10.2 Identificación y caracterización *in silico* de un intercambiador catión/calcio de *E. histolytica*

El intercambiador putativo se caracterizó *in silico* usando programas disponibles en el portal Expasy Bioinformatics Resource (<http://expasy.org>) y en la página de NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). El intercambiador fue comparado con intercambiadores de otros organismos por ClustalW y el análisis filogenético se realizó usando el algoritmo de Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean (UPGMA) en el software MEGA 5 (Tamura et al, 2011). Para validar el dendograma se realizó un “Bootstrapping” de 1000 réplicas.

### 10.3 Modelaje molecular

La secuencia de aminoácidos del intercambiador amibiano se analizó mediante el servidor I-tasser (<https://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER/>) para predecir su estructura terciaria. La orientación en la membrana se obtuvo a través de la base de datos OPM (Orientations of Proteins in

Membranes) (<http://opm.phar.umich.edu/>). La estructura tridimensional se comparó con el cristal de la proteína NCX de *Methanococcus jannaschii*, obtenido de la base de datos Protein Data Bank (PDB) (<http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>). Los modelos obtenidos se analizaron mediante el programa UCSF Chimera (<https://www.cgl.ucsf.edu/chimera/>).

#### **10.4 Diseño del péptido antigénico**

Para la obtención de péptidos antigénicos para el intercambiador, la proteína codificada para la secuencia EHI\_001770 se analizó mediante los programas ABCpred (<http://www.imtech.res.in/raghava/abcpred/>) y Protein Hydrophobicity plots (<http://www.vivo.colostate.edu/molkit/hydropathy/index.html>), los cuales predicen péptidos con poder inmunogénico en base a las escalas de Kyte-Doolittle y Hopp-Woods. Para producir anticuerpos altamente específicos, los péptidos con alto “score” fueron analizados mediante BLAST en la base de datos de Amoeba Genomics Resource (<http://amoebaDb.org/amoeba/>). El péptido seleccionado para la producción de anticuerpos fue sintetizado por la casa comercial GL-Biochem acoplándole una molécula de KLH (Keyhole limpet Hemocyanin) para incrementar su inmunogenicidad.

#### **10.5 Inmunización**

En la inmunización se utilizaron 100 µg del péptido sintético en combinación con el adyuvante TiterMax Classic adjuvant (1:1) (Sigma). Las mezclas se inocularon tres veces, en intervalos de dos semanas, vía subcutánea e intramuscular, en ratas Wistar. Una semana posterior a la última inmunización, se extrajo la sangre de las ratas, se obtuvo el suero y se determinó el título de anticuerpos contra el péptido (anti EhCCX) mediante ensayos de Western blot.

## **10.6 Manejo ético de los animales**

El comité institucional de ética acerca del uso y cuidado de los animales, revisó y aprobó el protocolo del uso y cuidado de los animales: dentro de los que se incluyen ratones, conejos y ratas para producir anticuerpos, establecidos en el documento CICUAL 001, en el cual se especifica que nuestra institución cumple la NOM-062-ZOO-1999 que se ocupa de las especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio, dadas por la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA), la cual verifica el cumplimiento de los lineamientos/regulación internacional para el uso y cuidado de los animales usados en el laboratorio y ha verificado y aprobado el cuidado de los animales en CINVESTAV (Número de verificación aprobado: BOO.02.03.02.01.908).

## **10.7 Extracción de proteínas totales**

Para la obtención de las proteínas de los trofozoítos,  $3 \times 10^6$  células se cosecharon enfriando en hielo de 5 a 10 min, los trofozoítos se lavaron dos veces con PBS y se centrifugaron a  $201 \times g$  durante 5 min a  $4^\circ\text{C}$ . Posteriormente, se agregaron 120  $\mu\text{l}$  del amortiguador RIPA 1X (20 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 1mM EGTA, 0.1% NP-40 1% desoxicolato de sodio), más una mezcla de inhibidores de proteasas (3 mM TLCK, 3mM IA, 3 mM NEM, 1 mM PMSF). La lisis celular se llevó a cabo realizando pases consecutivos de congelación en nitrógeno líquido y descongelación con agitación en vórtex a temperatura ambiente. Los extractos amibianos se almacenaron en alícuotas a  $-80^\circ\text{C}$  hasta su uso.

## **10.8 Cuantificación de proteínas**

La cuantificación de proteínas se realizó por el método DC Protein Assay (BIO-RAD). Para ello, primero se preparó una curva estándar con albumina de suero bovino (BSA) colocando de 1 a 10  $\mu\text{l}$  de una solución con concentración de 1mg/ml, así como la cantidad suficiente de agua para alcanzar un volumen total de 5  $\mu\text{l}$ . Entonces, se agregaron 25  $\mu\text{l}$  de reactivo A



en cada pozo, posteriormente 200  $\mu$ l de reactivo B y se incubó durante 15 min a temperatura ambiente. Posteriormente, la absorbancia a 750 nm de cada muestra se midió en un lector de ensayos de ELISA (Tecan Sunrise). Como blanco se utilizó una mezcla de 5  $\mu$ l de agua miliQ/desionizada, 25  $\mu$ l de reactivo A y 200  $\mu$ l de reactivo B. Con la lectura obtenida se realizó una curva estándar, graficando la concentración de BSA en el eje de las X y la absorbancia obtenida en el eje de las Y. Para determinar la concentración de proteína problema, en las mezclas de reacción se colocó 1  $\mu$ l de la muestra y la absorbancia obtenida se interpoló en la curva estándar.

### **10.9 Electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE)**

La separación de proteínas por electroforesis se realizó en geles de poliacrilamida al 10% en condiciones desnaturalizantes. Para ello, el gel separador se preparó con los siguientes reactivos: acrilamida 10%, Bis-acrilamida 0.9%, Tris-HCl 1.5 M (pH 8.8), SDS al 0.1%. PSA (persulfato de amonio) 0.1% y 0.15% de TEMED; mientras que el gel concentrador se preparó con acrilamida 29%, Bis-acrilamida 0.9%, Tris-HCl 0.5 M (pH 6.8), SDS al 0.1%, PSA 0.1% y 0.15% de TEMED; como amortiguador de corrida se utilizó una solución de Tris 0.25 M y glicina 1.9 M y 0.1% de SDS. La electroforesis se llevó a cabo manteniendo un voltaje constante de 110 V (25 miliamperios) por 60 min. Después de la separación de las proteínas en los geles de poliacrilamida, éstos se tiñeron durante 20 min con azul de Coomassie al 0.05% en metanol al 50% y ácido acético al 10% a temperatura ambiente y en agitación. Para desteñir los geles, éstos se incubaron en una solución de metanol al 5% y ácido acético al 7% en agitación, hasta que las bandas de proteínas aparecieron en color azul sobre un fondo transparente.

### **10.10 Western Blot**

Después de la separación electroforética, las proteínas se transfirieron a membranas de nitrocelulosa. El gel y la membrana de nitrocelulosa con un poro de 0.45  $\mu$ m (Millipore) se equilibraron por 40 min en la solución amortiguadora

de transferencia (Tris-HCl 48 mM; glicina 39 mM pH 8.3 y metanol al 20 %). Enseguida, se realizó un emparedado de la siguiente manera: primero se colocó la unidad de transferencia (BioRad) en una bandeja con la solución amortiguadora, después se colocó un cojinete de fibra "Scotch Brite" y después dos capas de papel filtro previamente humedecidos en la solución amortiguadora, sobre el papel filtro se colocó el gel hacia al cátodo y sobre éste el papel de nitrocelulosa hacia el ánodo. Posteriormente, se colocó otro pedazo de papel filtro, y encima otro cojinete de fibra. Por último, la unidad se cerró y se colocó en la cámara de transferencia (BioRad), la cual contenía la solución amortiguadora de transferencia. La transferencia se realizó a 100 V durante 2 h, la corriente inicial fue de 0.2 mA y se incrementó lentamente hasta 0.7 mA. Cuando la transferencia terminó, el gel tiñó con azul de Coomassie para verificar la eficiencia de la transferencia, mientras que la membrana de nitrocelulosa se incubó en agitación durante toda la noche a 4 °C con PBS-Tween 20 al 0.5 % (Sigma) con leche descremada al 3 % (BioRad) (PBS-Tween-leche), para bloquear las uniones inespecíficas. Después, las membranas se incubaron a 4 °C en agitación durante toda la noche con el primer anticuerpo (policlonal anti-EhCCX) diluido 1:3000 en PBS-Tween-leche. Posteriormente, el exceso de anticuerpo se eliminó lavando la membrana de 3 a 4 veces con PBS-Tween por 5 min a temperatura ambiente. Después, la membrana de nitrocelulosa se incubó por 4 h a temperatura ambiente con el segundo anticuerpo (anti-IgG de rata acoplado a peroxidasa) (Zymed) en una dilución de 1:12000 en PBS-Tween-leche. Las membranas se lavaron por 5 min a temperatura ambiente, dos veces con solución amortiguadora de fosfatos 20 mM pH 7.4, NaCl 150 mM y por último se lavó con solución amortiguadora de fosfatos 50 mM. Finalmente, las membranas se lavaron y revelaron por quimioluminiscencia (ECL Plus, Amersham), de acuerdo con el protocolo del fabricante.

Para comparar el nivel de expresión del intercambiador en *E. histolytica* (EhCCX) con el de *E. dispar* (EdCCX) o para analizar los niveles de expresión de EhCCX en trofozoítos sometidos a diferentes condiciones (en presencia de

1 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, sometidos a 42 °C, o durante la eritrofagocitosis) se realizaron ensayos de western blot usando el anticuerpo anti EhCCX como se describió anteriormente. Posteriormente, las membranas se incubaron con un anticuerpo contra actina (1:20,000) (amablemente donado por el Dr. José Manuel Hernández-Hernández, CINVESTAV-IPN), el cual se usó como un control interno de carga. La banda detectada por el anticuerpo anti EhCCX se analizó por densitometría y los datos se normalizaron con respecto al contenido de actina, de acuerdo con la reactividad del anticuerpo contra esta proteína. Para el análisis semi-cuantitativo, la expresión relativa de EhCCX en los trofozoítos obtenidos en la condición basal se tomó arbitrariamente como 1.

### **10.11 Microscopía de inmunofluorescencia**

Las amibas se desprendieron de las cajas de cultivo por enfriamiento en hielo y se vertieron a cajas de seis pozos (2 ml/pozo) (Costar) a las cuales previamente se les colocó un cubreobjetos estéril. Las células se incubaron por 1 h a 37°C para permitir la adherencia de las amibas al cubreobjetos. Las muestras se fijaron con paraformaldehído al 4% incubando a 37°C por 40 min y se lavaron con PBS (pH 7.4). Posteriormente, las células se permeabilizaron con PBS-Triton X-100 al 0.5%, incubando a 37°C por 40 min y se lavaron dos veces con PBS (pH 7.4). Los sitios de unión inespecíficos se bloquearon con albúmina al 1% durante 1 h a 37°C. Después, se agregó el anticuerpo primario toda la noche a 4° C. Posteriormente se lavó con PBS hasta eliminar el exceso de anticuerpo primario y se agregó el anticuerpo secundario anti-IgG de rata conjugado con Alexa 555 (ZYMED) (1:400) por 1 h a 37°C. Nuevamente se lavó hasta eliminar el exceso de anticuerpo secundario. Para la tinción de núcleos, las muestras se incubaron durante 10 min a temperatura ambiente con 10 µl de 4,6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) (Sigma). El montaje de las muestras se realizó utilizando 7 µl del medio de montaje para fluorescencia VECTASHIELD (VECTOR Laboratories, Inc. H-1000). Finalmente, las muestras fueron examinadas en un microscopio de epifluorescencia (Olympus Latin America Inc BX41) y en un microscopio confocal (Carl Zeiss LSM700). Las observaciones

se realizaron en aproximadamente 20 cortes ópticos desde la parte superior hasta la parte inferior de las muestras.

Para los ensayos de inmunocolocalización durante la fagocitosis, los trofozoítos se incubaron por 5, 10, 15 y 30 min a 37° C con eritrocitos humanos (1:25) de un donador sano. Posteriormente se realizó la inmunolocalización como se describió anteriormente.

Para los ensayos de co-localización, después de incubar con el anticuerpo anti EhCCX, las muestras se incubaron con anticuerpos de conejo contra EhSERCA (1:50) (Martinez-Higuera et al, 2013), EhRabB (1:25) (Rodriguez et al, 2000), EhNPC-1 (1:100) (Bolanos et al, 2016); o con anticuerpos de ratón contra la lectina Gal/GalNac (1:50) (Petri et al, 1987). Subsecuentemente, las muestras se incubaron con anticuerpos secundarios contra IgGs de rata conjugados con Alexa 555, anti IgGs de conejo marcados con Alexa 488, o anti igGs de ratón conjugados con FITC (Zymed 1:100). Para la detección del aparato de Golgi, los trofozoítos se incubaron con 5  $\mu$ M de NBD C6- Ceramida (Thermo Fisher Scientific) durante 90 min a 37 °C. Entonces, las muestras se analizaron por microscopía confocal como se describió anteriormente. Posteriormente, se obtuvieron los coeficientes de co-localización de Pearson de al menos 15 imágenes independientes (secciones de 0.5  $\mu$ m) usando el software ImageJ 1.45v con el complemento JACoP.

### **10.12 Microscopia electrónica de transmisión (MET)**

Para los experimentos de inmunomarcaje con oro coloidal, los trofozoitos fueron fijados con paraformaldehído al 4% y glutaraldehído al 0.5% en PBS durante 1 h a TA. Entonces, las muestras fueron embebidas en resina LR White (London Resin Co) y polimerizadas bajo la luz UV a 4° C durante 24 h. Posteriormente, cortes de 60 nm se montaron en rejillas de níquel y posteriormente se incubaron toda la noche con anticuerpos específicos  $\alpha$ -EhCCX (1:20), después se incubaron con su respectivo anticuerpo secundario (1:60) acoplado a partículas de oro de 20 nm. Posteriormente, los cortes fueron

contrastados con acetato de uranilo y citrato de plomo y se observaron con el microscopio de transmisión Joel JEM-1011.

### **10.13 Aislamiento de DNA genómico de trofozoítos de *E. histolytica***

Los trofozoítos fueron cosechados y el DNA genómico fue extraído mediante la utilización del kit Wizard SV genomic DNA purification system (Promega). Los trofozoítos se lavaron con PBS, para posteriormente añadir 150 µl del amortiguador de lisis Wizard SV (Promega). El lisado se transfirió a la minicolumna/tubo de colección Wizard SV (Promega) y se centrifugó a 13 000 x g por 3 min en una microcentrífuga. Posteriormente se separó la minicolumna y se descartó el líquido del tubo de colección, la minicolumna se colocó de nuevo en el tubo de colección, se añadieron 650 µl de la solución de lavado Wizard SV (etanol al 95%) y nuevamente se centrifugó a 13 000 x g por 1 min, para después descartar el líquido del tubo de colección. Los lavados con la solución de lavado, la centrifugación a 13 000 x g por 1 min y el desecho del líquido del tubo colector se repitió en un total de tres veces. Después del último lavado, el tubo de colección se vació, se reensambló en la minicolumna y se centrifugó a 13 000 x g por 2 min hasta secar la matriz. La columna se removió y se colocó en un tubo colector nuevo. Posteriormente a la minicolumna se le agregaron 250 µl agua libre de nucleasas previamente calentada a 65 °C. Finalmente, para eluir el DNA, la columna se centrifugó a 13 000 x g por 1 min y el eluido se almacenó a -70°C, hasta su uso.

### **10.14 Diseño de oligonucleótidos iniciadores y PCR**

Para obtener el gen *Ehccx* (XP\_649624.2) se diseñaron dos oligonucleótidos iniciadores: el iniciador en sentido se obtuvo utilizando la secuencia localizada en las posiciones 1-33 con respecto al codón de inicio de la traducción (5'-TGAAACAGATGAATAAAATTTATATTATATTA-3'), a este oligonucleótido se le añadió la secuencia de nucleótidos que es reconocida por la enzima de restricción *BamH I* y cuatro bases más que sirvieron para el posicionamiento de la enzima, obteniendo el oligonucleótido final:

5'-CCCCGGTACCATGAAACAGATGAATAAAATTTATATTATATTA-3'

El oligonucleótido antisentido correspondió a la secuencia complementaria reversa localizada al final del gen codificante (1516-1542) (5'-TTAACCAAACAGTTTAAAAACGTTAA-3'), al cual se le agregó la secuencia de reconocimiento para la enzima de restricción *KpnI* y cuatro bases más para obtener el oligonucleótido antisentido final:

5'-CCCCGGTACCATGAAACAGATGAATAAAATTTATATTATATTA-3'

Para la amplificación del gen por PCR se utilizó un volumen de reacción de 50 µl que contenía 200 ng de DNA genómico de *E. histolytica*, 1µM de cada iniciador, 10 mM dNTPs (dATP, dCTP, dTTP, dGTP), 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 1U de la enzima DNA polimerasa de alta fidelidad KAPA HiFi (KAPABIOSYSTEMS). La amplificación se realizó en un termociclador Select Cyclor (Select BioProducts), utilizando las condiciones descritas en la Tabla 2. Como control negativo se realizó la misma reacción, pero en ausencia de DNA molde. Los productos de PCR se analizaron en geles de agarosa al 1% en TBE 1X (Tris-borato 0.090 M, EDTA 0.002 M, pH 8.0). La amplificación del gen *Ehccx* fue confirmada por secuenciación.

**Tabla 2. Condiciones para la amplificación del gen *Ehccx*.**

Desnaturalización inicial	94° C	3 min	1 ciclo
Desnaturalización	94° C	45 s	35 ciclos
Alineamiento	56° C	1 min	
Extensión	72° C	3 min	
Extensión final	72° C	10 min	1 ciclo
Temperatura final	4° C	∞	

### **10.15 Electroforesis de DNA en geles de agarosa**

La separación del DNA se realizó mediante electroforesis en geles de agarosa a una concentración de 1%, los cuales se prepararon en amortiguador de Tris-Boratos-EDTA (TBE). Para ello, las muestras se mezclaron con amortiguador de carga (azul de bromofenol 0.25%, xilencianol 0.25% y glicerol). La electroforesis se llevó a cabo manteniendo un voltaje de 70 V constante por 60 min. Como marcadores de tamaño molecular se utilizaron los fragmentos del fago lambda digerido con *Hind III* (Invitrogen) y marcadores de 1 Kb (100 a 12 000 pb) (Invitrogen). Para la detección del DNA, los geles se tiñeron con bromuro de etidio al 0.5 µg/ml y el DNA se visualizó en un transluminador de luz UV (Transilluminator UVP).

### **10.16 Preparación de células competentes de *Escherichia coli*.**

Una colonia de la cepa *DH5α* de *Escherichia coli* se cultivó a 37°C en medio LB con agitación continua por 12-14 h. Al día siguiente se adicionaron 1000 µl del cultivo a un matraz conteniendo 250 ml de medio LB fresco y se incubó a 37°C con agitación hasta obtener una densidad óptica (DO) de 0.5 a una longitud de onda de 600 nm. Posteriormente, el cultivo se transfirió a un tubo Falcón de 50 ml estéril y se centrifugó a 1800 x g a 4°C durante 5 min; el sobrenadante se decantó y la pastilla se resuspendió en 20 ml de CaCl<sub>2</sub> 50 mM frío y se incubó a 4°C durante 20 min. Pasado este tiempo, la muestra se centrifugó a 1800 x g a 4°C durante 5 min y la pastilla se resuspendió en 4 ml de CaCl<sub>2</sub> 50 mM frío, finalmente las células se almacenaron a 4°C hasta por una semana.

Para la cepa XL10 Gold (Agilent Genomics), una colonia de bacterias se sembró en medio LB en una cantidad de 2-3 ml en un tubo falcón de 15 ml y se incubó con agitación continua a 37°C toda la noche. Posteriormente se tomó 1 ml del cultivo y se adicionó a 250 ml de medio fresco y se incubó con agitación continua hasta que se alcanzó una absorbancia de 0.5 a una longitud de onda de 600 nm. Enseguida, las células se cosecharon en 4 tubos falcón de 50 ml, se centrifugó por 10 min a 1800 x g a 4°C y se desecharon los sobrenadantes.

Las pastillas de bacterias se resuspendieron muy suavemente en 4 ml (por tubo) de la solución TFB1 (RbCl 100 mM, MnCl<sub>2</sub> 50 mM, KAc 30 mM, CaCl<sub>2</sub> 10 mM, glicerol 15%) y se dejaron reposar durante 55 min en hielo. Entonces, las células se centrifugaron durante 5 min a 1800 x g a 4°C, se desecharon los sobrenadantes y las pastillas celulares se resuspendieron en 1.25 ml (por tubo) de la solución TFB2 (MOPS 10mM, RbCl 10 mM, CaCl<sub>2</sub> 75 mM, glicerol 15%) por tubo. Finalmente, se realizaron alícuotas de 50 o 100 µl en tubos eppendorf y se almacenaron a -20 °C, hasta su uso.

### **10.17 Transformación de células competentes**

Para la transformación se utilizaron 50 µl de células competentes, a las cuales se les agregaron 1 µl de plásmido (20-50 ng) o el volumen total de la reacción de ligación y se incubaron en hielo por 10 min y después a 42°C por 45 s. Enseguida, las muestras se colocaron en hielo durante 10 min, transcurrido este tiempo se adicionaron 200 µl de medio LB y se incubó durante 1 h a 37°C en agitación constante (200 rpm). Posteriormente, las células se espatularon en cajas de Petri con agar-LB-ampicilina (50 µg/ml) y se incubaron a 37 °C por 12 h.

### **10.18 Clonación del gen *Ehccx* en el vector PCR 4 TOPO**

El producto de PCR (gen *Ehccx*) se clonó en el vector de tránsito PCR 4 TOPO (Invitrogen) siguiendo el protocolo sugerido por el fabricante, obteniendo la construcción PCR 4 TOPO/*Ehccx*, con la cual se transformaron bacterias competentes. La clonación se verificó mediante la digestión del DNA plasmídico aislado de las bacterias transformadas con las enzimas *BamHI* y *KpnI*.

### **10.19 Extracción de DNA en pequeña cantidad (MINIPREP)**

La obtención de DNA plasmídico se realizó de la siguiente manera: una colonia bacteriana transformada con la construcción de interés se sembró en 5 ml de medio LB-ampicilina (50 µg/ml) y se incubó a 37°C en agitación constante durante 16 h. Posteriormente, 1.5 ml del cultivo se vertieron en un tubo



ependorf de 1.5 ml y se centrifugó a 11 000 x g durante 2 min a 4°C, el sobrenadante se decantó y la pastilla se resuspendió en 100 µl de solución I (glucosa 50 mM, Tris-HCl 25 mM pH 8.0, EDTA 10 mM pH 8.0). Inmediatamente se adicionarán 200 µl de solución II (NaOH 0.2 N, SDS 1%) y se incubó 5 min en hielo; enseguida se adicionaron 150 µl de solución III (acetato de potasio 5 M, ácido acético glacial), se incubó 5 min en hielo y se centrifugó a 11 000 x g durante 5 min a 4°C. Entonces, el sobrenadante se transfirió a un tubo limpio y se adicionó 1 ml de etanol al 100% frío y se centrifugó a 11 000 x g durante 5 min. Enseguida, se realizaron dos lavados con etanol al 70%; la pastilla se dejó secar a temperatura ambiente y se resuspendió en 30 µl de agua estéril. Para eliminar el RNA contaminante, las muestras se incubaron a 37°C con RNasa libre de DNasa (10 µg/µl) (USB) por 20 min y posteriormente se inactivó la enzima al incubar la muestra a 72°C durante 10 min.

#### **10.20 Extracción de dna en mediana cantidad (MIDIPREP)**

Una colonia bacteriana transformada con el plásmido de interés se sembró en 5 ml de medio Luria Broth (LB)-ampicilina (50 µg/ml) y se incubó a 37°C toda la noche en agitación a 200 rpm. Posteriormente, se realizó una dilución 1:500 en 100 ml de medio LB y se incubó a 37°C por 12-16 h en agitación constante (200 rpm). Las bacterias se cosecharon por centrifugación a 6000 x g por 20 min a 4°C. El paquete celular se resuspendió en 4 ml de amortiguador PI (Tris-HCl 50 mM pH 8.0; EDTA 10 mM; 100 µ/ml RNasa A), se adicionaron 4 ml de amortiguador de lisis P2 (NAOH 200 mM; SDS 1%) agitando suavemente por inversión, se incubó a temperatura ambiente por 5 min y se adicionaron 4 ml del amortiguador de neutralización P3 (acetato de potasio 3 M pH 5.5). Entonces, la mezcla se incubó por 15 min a 4°C, posteriormente se centrifugó a 3800 x g durante 30 min a 4°C y el sobrenadante se filtró a través de gasas estériles. La muestra se cargó en la columna de afinidad (QIAGEN-tip 100) previamente equilibrada con 4 ml de amortiguador QBT (NaCl 750 mM; MOPS 50 mM pH 7.0; isopropanol 15%; Triton X-100 0.15%) e inmediatamente después se realizaron dos lavados con 10 ml de

amortiguador QC (NaCl 1M; MOPS 50 mM pH 7.0; isopropanol 15%) para eliminar carbohidratos, proteínas y DNA no asociados a la columna. El DNA se eluyó con 5 ml de amortiguador QF (NaCl 1.25M; Tris 50 mM pH8.5; isopropanol 15%) y se precipitó con 3.5 ml de isopropanol, posteriormente se centrifugó 30 min a 15 000 x g a 4°C. El sobrenadante se decantó y la pastilla se lavó con 10 ml de etanol al 70% y se centrifugó 20 min a 15 000 x g a 4°C. Finalmente, la pastilla se secó y resuspendió en 300 µl de agua estéril. El plásmido obtenido se distribuyó en alícuotas y se almacenó a -20°C hasta su uso.

### **10.21 Clonación del gen *Ehccx* en el vector pNEO**

Los plásmidos pNEO (Hamann et al, 1995) y PCR 4 TOPO/*Ehccx* se sometieron a una doble digestión con las enzimas *BamHI* y *KpnI*. La digestión se llevó a cabo en un volumen final de 30 µl utilizando 10 U de las enzimas *BamHI* y *KpnI* (Invitrogen) y se incubó a 37°C durante 2 h. Los productos de digestión fueron analizados por electroforesis en geles de agarosa al 1% en TBE. Las bandas correspondientes al plásmido pNeo linearizado y al gen *Ehccx* liberado del plásmido PCR 4 TOPO se cortaron del gel de agarosa y se colocaron en un tubo eppendorf de 1.5 ml para la subsecuente purificación utilizando el kit QIAquick (QIAGEN Plasmid Midi kit). Para ello, a los fragmentos del gel conteniendo el DNA de interés se pesaron y se les agregó tres volúmenes del amortiguador QG por volumen de gel (300 µl de amortiguador por cada 100 mg de gel). Posteriormente, la agarosa se disolvió incubando la muestra a 50°C por 10 min, transcurrido este tiempo, se añadieron 5 µl de acetato de sodio 3M pH 5 y después un volumen de isopropanol. Enseguida, la muestra se transfirió a la columna QIAquick y se centrifugó por 1 min a 10 600 x g. El sobrenadante se descartó, a la columna se le adicionó 0.5 ml de amortiguador QG y se centrifugó por 1 min. Posteriormente, a la columna se agregó 0.75 ml de amortiguador de lavado PE y se centrifugó por 1 min. Finalmente, el DNA se eluyó agregando 20 µl de agua a la columna y centrifugando a 11 000 x g. El DNA obtenido se cuantificó en geles de agarosa

al 1% en TBE 1X, utilizando como referencia las concentraciones conocidas de los fragmentos de DNA del fago lambda digerido con la endonucleasa *HindIII*.

Para la clonación, el vector pNeo digerido y purificado (50 ng) se mezcló con la cantidad necesaria del gen *Ehccx* digerido y purificado para tener una relación molar de 1:3 o 1:6 (vector:inserto), 1 µl (100 unidades) de la enzima T4 DNA ligasa (Invitrogen), 2 µl de amortiguador T4 DNA ligasa 5X (Invitrogen) y agua cbp 10 µl y las mezclas se incubaron 16-18 h a 16°C. Como control negativo se utilizó la mezcla de reacción en ausencia del inserto. Finalmente, células de *E. coli* XL10 Gold químicamente competentes se transformaron con la mezcla de ligación, como se mencionó anteriormente. La clonación se verificó mediante la digestión del DNA plasmídico aislado de las bacterias transformadas con las enzimas *BamHI* y *KpnI*.

### **10.22 Transfección de trofozoitos**

Para la transfección,  $3 \times 10^5$  trofozoítos se cultivaron toda la noche a 37° C en una atmosfera de CO<sub>2</sub> al 5%. Entonces, las células se lavaron con medio M199 (Sigma), se resuspendieron en 1.8 ml de medio M199 suplementado con 15% de suero fetal bovino y se transfirieron a una placa de Petri de 35 mm. Posteriormente, se agregaron 100 µl de medio M199 conteniendo una mezcla de 10 µg de plásmido (*pNeo* o *pNeo/Ehccx*) y 10 µg de lipofectamina Superfect (Qiagen) y se incubó durante 4 h a 37° C en una atmosfera de CO<sub>2</sub> al 5%. Transcurrido este tiempo, las células se transfirieron a un tubo conteniendo 10 ml de medio TYI-S-33, se incubaron durante 48 h a 37° C y finalmente, los parásitos transfectados fueron seleccionados en la presencia de 10 µg/ml de G-418 (Sigma-Aldrich).

### **10.23 Aislamiento de RNA de trofozoítos de *E. histolytica***

Los trofozoítos se empastillaron a 201 x g durante 5 min a 4 °C y se lavaron una vez con PBS (2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2.7 mM KCl, 137 mM NaCl pH 7.4). Entonces, para cada  $1 \times 10^7$  trofozoítos se agregó 1 ml de trizol (Sigma) y se incubó 10 min a temperatura ambiente. Al término de este

tiempo, se agregaron 200 µl de cloroformo/trizol a los tubos y se agitaron por 30 s para después ser incubados por 10 min a temperatura ambiente. Terminado el tiempo de incubación, la suspensión se centrifugó a 1500 x g por 15 min a 4 °C. La fase acuosa se transfirió a otro tubo y se le adicionaron 500 µl de isopropanol frío/trizol y se agitaron por inversión. Después, se incubó a temperatura ambiente y se centrifugó a 13000 x g por 10 min a 4 °C, la pastilla de RNA se lavó una vez con 1 ml de etanol al 75% en agua tratada con dietil pirocarbonato (DEPC, Sigma) y se centrifugó a 6000 x g durante 5 min a 4 °C. La pastilla se secó y finalmente, el RNA se disolvió en 30 µl de agua tratada con DEPC.

#### **10.24 Obtención de cDNA**

Para la síntesis del cDNA se utilizaron 5 µg de RNA a los que se les agregó 1 µl de oligo dT (Sigma) y 10 µl de agua estéril y se incubó 10 min a 70 °C. Pasado el tiempo de incubación, las muestras se pasaron a hielo por 5 min. Posteriormente, se adicionaron 4 µl del amortiguador “First Buffer” (Sigma), 2 µl de DTT (Sigma), 1 µl de dNTPs (10 mM) (Sigma), se mezcló suavemente, se incubó a 42 °C durante 4 min, se adicionó 1 µl de la enzima Superscrip II reverse transcriptase (Invitrogen) y se incubó nuevamente a 42 °C durante 50 min. Después, las muestras se incubaron a 70 °C durante 15 min y entonces, se adicionaron 2 µl de RNAsa libre de DNAsa (10 mg/ml) (Sigma). Por último, las mezclas de reacción se incubaron por 20 min a 37 °C y se guardaron a -70 °C, hasta su uso.

#### **10.25 Diseño de oligonucleótidos y RT-PCR en tiempo real**

Para analizar el nivel de expresión del transcrito de *Ehccx*, primero se diseñaron oligonucleótidos específicos. El oligonucleótido en sentido se diseñó utilizando la secuencia localizada en las posiciones 1024-1046 con respecto al codón de inicio de la traducción (5'- TCACTGAAACACAAATCCCTTC -3'). El oligonucleótido antisentido correspondió a la secuencia complementaria reversa de las posiciones 1182-1202 (5'-CCAAGTGAATTTCCCAACA-3').

Los ensayos de PCR en tiempo real se realizaron en el equipo “StepOne Real-Time PCR System” (Applied Biosystem), utilizando 100 ng de cDNA, 0.15  $\mu$ M de cada iniciador y el “Master Mix KAPA SYBR FAST PCR” (KAPA Biosystems). Las condiciones de amplificación se muestran en la tabla 3. Los Datos de tres preparaciones independientes de cDNA fueron analizadas mediante el método  $2^{-\Delta\Delta C_t}$ , usando como control negativo la misma reacción en ausencia de cDNA molde y como normalizador se utilizó la expresión del gen que codifica para la proteína S2 de la subunidad ribosomal 40S.

**Tabla 3. Condiciones para los ensayos de RT-PCR en tiempo real.**

Retrotranscripción	42° C	5 min	1 ciclo
Desnaturalización inicial	95° C	3 min	1 ciclo
Desnaturalización	95° C	3 s	40 ciclos
Alineamiento	60° C	30 s	
Curva de disociación			

### 10.26 Niveles intracelulares de $\text{Ca}^{2+}$

Los trofozoítos ( $1 \times 10^6$ ) se resuspendieron en 1 ml de PBS y se incubaron por 30 min a 37 °C en la oscuridad con 4  $\mu$ M del colorante sensible a calcio Fluo-4 AM (Invitrogen). Al término de este tiempo, los parásitos se lavaron tres veces con PBS para eliminar el colorante extracelular. Entonces, las células se resuspendieron en 1 ml de PBS suplementado con  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Mg}^{2+}$  ( $\text{CaCl}_2$  0.1 mM,  $\text{MgCl}_2$  1 mM). La señal fluorescente se detectó por citometría de flujo usando los filtros de 520/40 en el citómetro BD FACSCalibur analyzer (BD Biosciences). Para analizar los niveles de calcio citosólico durante la muerte celular programada, a las muestras se les añadió 1 mM de  $\text{H}_2\text{O}_2$  y la intensidad de fluorescencia se analizó cada 40 s.

### **10.27 Muerte celular inducida por peróxido de hidrógeno**

Los trofozoítos ( $5 \times 10^5$ ) se incubaron a 37 °C con 1 mM de  $H_2O_2$  en medio TYI sin suero. Entonces, la viabilidad celular se midió durante diferentes tiempos utilizando la técnica de exclusión de azul de tripano.

### **10.28 Obtención de eritrocitos humanos**

Las muestras de sangre humana se obtuvieron por punción venosa usando como anticoagulante la solución Alsever (ácido cítrico 2.86 mM, citrato de sodio 27.2 mM, cloruro de sodio 71.8 mM, dextrosa 113.7 mM, pH 6.1). La sangre se centrifugó a 500 g durante 10 min. El sobrenadante, que contenía el suero y las células blancas, se eliminó y la pastilla (eritrocitos) se lavó cuatro veces con la misma solución. Posteriormente, los eritrocitos se cuantificaron en una cámara de Neubauer, se resuspendieron en medio TYI sin suero y se almacenaron a 4 °C hasta por no más de una semana.

### **10.29 Eritrofagocitosis**

Los trofozoítos se incubaron a 37°C y con agitación suave con eritrocitos, en una proporción 1:50, en medio TYI sin suero a diferentes tiempos (0, 5, 10 y 15 min). Los eritrocitos no ingeridos por las amibas se lisaron con ácido acético al 3%. Las muestras se centrifugaron a 441 x g durante 5 min. El sobrenadante se eliminó y la pastilla, que contenía a las amibas que fagocitaron eritrocitos, se lisó con ácido fórmico absoluto (J. T. Baker). Finalmente, la hemoglobina liberada de los eritrocitos ingeridos se cuantificó por espectrofotometría a una longitud de onda de 400 nm. Estos ensayos se llevaron a cabo tres veces por triplicado.

### **10.30 Actividad citopática**

Los trofozoítos ( $5 \times 10^5$ ) se incubaron sobre monocapas de células MDCK ( $3 \times 10^5$ ) a 37°C hasta que la primera muestra destruyó alrededor de un 80% de la monocapa (aproximadamente 2 h). Para detener la acción citopática de las

amibas, las preparaciones se incubaron a 4°C durante 15 min. El medio con las amibas despegadas se retiró y las células epiteliales remanentes se lavaron seis veces con PBS frío y una vez con PBS a -20°C por 2 min. Para comprobar la completa remoción de las amibas sobre las células MDCK, se realizaron observaciones al microscopio óptico. Posteriormente, las células epiteliales remanentes se fijaron con glutaraldehído al 2.5% en PBS, durante 15 min a TA y se lavaron tres veces con PBS. A continuación, las células se tiñeron con azul de metileno al 1%, en amortiguador de boratos 0.1 M (pH 8.7) por 10 min. Se realizaron tres lavados con amortiguador de boratos 0.01 M y el colorante capturado por las células fue extraído con 1 ml de HCl 1N, durante 30 min a 37°C. Finalmente, el colorante extraído se cuantificó por espectrofotometría a una longitud de onda de 660 nm. Estos ensayos se realizaron al menos tres veces por triplicado.

### **10.31 Migración celular**

Trofozoítos ( $2.5 \times 10^4$ ) fueron puestos en ayuno por 3 h en medio TYI sin suero y posteriormente se colocaron en la parte superior de un transwell (poro de 5  $\mu\text{m}$  de diámetro, Costar). En la parte inferior del transwell se colocaron 500  $\mu\text{l}$  de medio TYI con suero. Entonces, las muestras se incubaron durante 3 h a 37°C. Al final de la incubación, los insertos superiores se removieron y se cuantificaron los trofozoítos que migraron a la parte inferior del transwell. Estos ensayos se realizaron tres veces por triplicado.

### **10.32 Análisis estadístico**

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

## 11 RESULTADOS

### 11.1 Análisis *in silico* del intercambiador sodio/calcio de *E. histolytica*.

Previamente se realizó un análisis en la base de datos de Amoeba Genomics Resource (<http://www.amoebaDb.org>) para detectar un posible intercambiador de calcio en *E. histolytica*, encontrando la presencia de una secuencia de 513 aminoácidos con el número de acceso EHI\_001770 (Valle-Solis, 2013). En el presente trabajo, al realizar un nuevo análisis de BLAST en la base de datos AmoebaDb encontramos que sólo existe un gen codificante para intercambiadores de calcio en *E. histolytica*, *E. dispar*, *E. invadens* y *E. nuttali*, mientras que en *E. moshkovskii* se detectaron dos genes. La identidad en secuencia del intercambiador de *E. histolytica* con sus ortólogos de las otras especies de *Entamoeba* varió de 69 a 99%, mientras que la similitud fue de 83 a 99% (Tabla 4). Por otra parte, el intercambiador de *E. histolytica* mostró de 16 a 30% de identidad y de 42 a 51% de similitud con intercambiadores de sodio/calcio de plantas, mamíferos, anfibios insectos y bacterias (Tabla 4).

De acuerdo con el programa TMHMM 2.0, la secuencia EHI\_001770 tiene 10 segmentos transmembranales putativos (Figura 7), localizados en las posiciones 65-75, 108-126, 127-147, 165-181, 187-200, 363-382, 387-403, 422-444, 461-479 y 484-501. Por otra parte, el programa SMART detectó dos dominios de intercambio sodio/calcio (NCX) (Figura 7) en las posiciones 62-206 y 352-503 de la proteína amibiana. Interesantemente, la organización estructural de esta proteína mostró ser similar a la del intercambiador de calcio/litio/sodio de *Homo sapiens* (HsNCLX) (NP\_079235.2) (Figura 7).

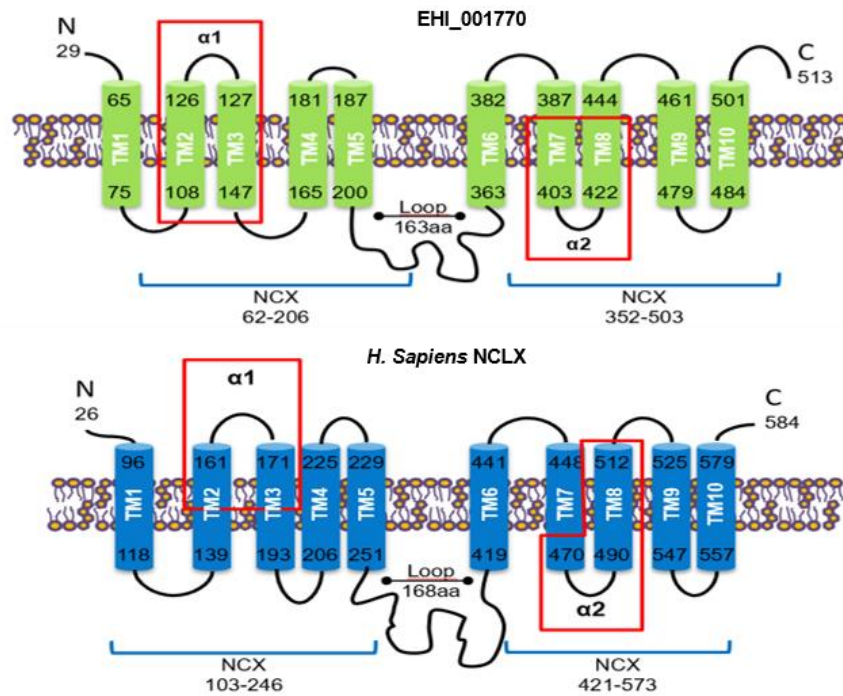


**Tabla 4. Comparación de los intercambiadores Sodio/Calcio de *E. histolytica* con proteínas ortólogos de diferentes organismos.**

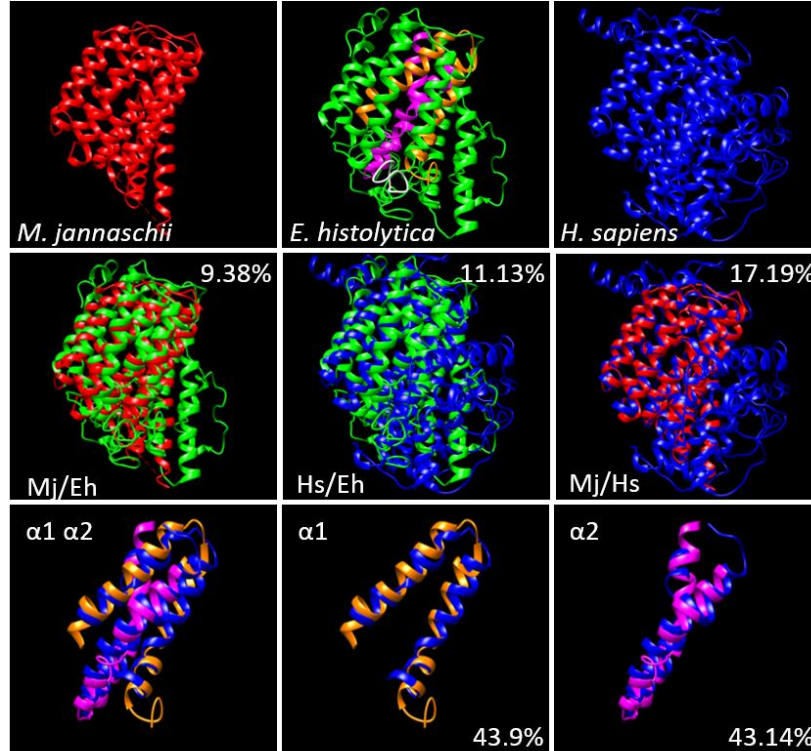
Organismos	Numero de acceso	Longitud (aa)	Identidad (%)	Similitud (%)	Valor e
<i>Entamoeba nutalli</i>	ENVI_134420	513	99	99	0.0
<i>Entamoeba dispar</i>	EDI_138590	510	95	97	0.0
<i>Entamoeba invadens</i>	EIN_083040	515	67	82	0.0
<i>Entamoeba moshkovskii</i>	EMO_063580	381	74	86	0.0
<i>Entamoeba moshkovskii</i>	EMO_049830	373	69	83	0.0
<i>Arabidopsis thaliana</i>	NP_197288.1	570	27	51	6e-51
<i>Aplysia californica</i>	XP_012946734.1	559	28	49	4e-49
<i>Eucalyptus grandis</i>	XP_010054949.1	604	30	53	2e-48
<i>Xenopus laevis</i>	NP_001128697.1	548	26	50	1e-46
<i>Homo sapiens</i>	NP_079235.2	584	24	46	9e-42
<i>Anopheles gambiae</i>	XP_308488.4	535	27	47	2e-41
<i>Homo sapiens</i>	NP_995322.1	500	20	43	1e-18
<i>Homo sapiens</i>	NP_066920.1	973	16	42	6e-06
<i>Methanococcus jannaschii</i>	3V5S_A	320	17	46	5e-05

La estructura 3D de la proteína se realizó mediante el programa I-TASSER usando como base la estructura cristalizada del intercambiador de *Methanococcus jannaschii* (MjNCX) (3V5S A) y la posible estructura del intercambiador ya caracterizado HsNCLX. La comparación de las estructuras mostró que el intercambiador de *E. histolytica* tiene una identidad estructural modesta con MjNCX y HsNCLX (9.38 y 11.13% respectivamente) (Figura 8). Sin embargo, la identidad estructural de MjNCX y HsNCLX también es relativamente baja (17.19%) (Figura 8). Sin embargo, las estructuras de los repetidos  $\alpha 1$  y  $\alpha 2$  (que son los dominios involucrados en el transporte de los iones) de *E. histolytica* mostraron una alta identidad con los de HsNCLX (43.9% y 43.14% respectivamente) (Figura 8). Además, la proteína amibiana mostró diez alfa hélices, similar a lo que se ha descrito para otras proteínas de la superfamilia de intercambiadores (Giladi et al, 2016) (Figura 8).

Para conocer la familia de intercambiadores a la cual pertenece la proteína amibiana se realizó un alineamiento múltiple con miembros de las diferentes familias de intercambiadores: YRBG (intercambiadores de bacterias), NCX (intercambiadores  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ ), NCKX (intercambiadores  $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{Ca}^{2+}$ ), CAX (intercambiadores  $\text{H}^+/\text{Ca}^{2+}$ ) y CCX (intercambiadores catión/ $\text{Ca}^{2+}$ ) y posteriormente se realizó un árbol filogenético por el método UPGMA con un "Bootstrap" de 1000 réplicas. Este análisis agrupó a los intercambiadores del género *Entamoeba* en la familia CCX, que incluye a los intercambiadores de calcio/sodio/litio (Figura 9A). Interesantemente, los intercambiadores de otros parásitos protozoarios diferentes a *Entamoeba* fueron agrupados en el clado de la familia CAX (intercambiadores  $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$ ) (Figura 9A). Por lo que esta es la primera descripción de intercambiadores sodio/calcio en protozoarios parásitos.



**Figura 7. Dominios estructurales del intercambiador de *E. histolytica*.** La figura muestra las estructuras secundarias del posible intercambiador de *E. histolytica* (EHI\_001770) y del intercambiador HsNCLX. En estas representaciones se eliminó el péptido señal de cada proteína. Ambas proteínas contienen diez regiones transmembranales (TM1-TM10). Entre los dominios TM5 y TM6 se encuentra un asa citoplásmica larga. Las líneas azules indican los dominios de intercambio sodio/calcio (NCX). En los cuadros en rojo se encuentran los dominios  $\alpha 1$  y  $\alpha 2$  característicos de los intercambiadores de calcio.



**Figura 8. Estructura 3D del intercambiador de *E. histolytica*.** La Estructura 3D del intercambiador de *E. histolytica* (verde) se realizó en el servidor I-TASSER utilizando como molde el intercambiador sodio/calcio ya cristalizado de *M. jannaschii* (rojo). La estructura del intercambiador amibiano también se comparó con la estructura predicha del intercambiador de *H. sapiens* HsNCLX (azul). En la estructura de la proteína amibiana, en blanco se representa la ubicación del péptido que se mandó a sintetizar para la producción de anticuerpos, en anaranjado y magenta se ubican los repetidos  $\alpha 1$  y  $\alpha 2$ . En los paneles intermedios se muestra el traslape de las proteínas completas y en los paneles inferiores el traslape de los  $\alpha$ -repetidos. Los números indican el porcentaje de identidad estructural.

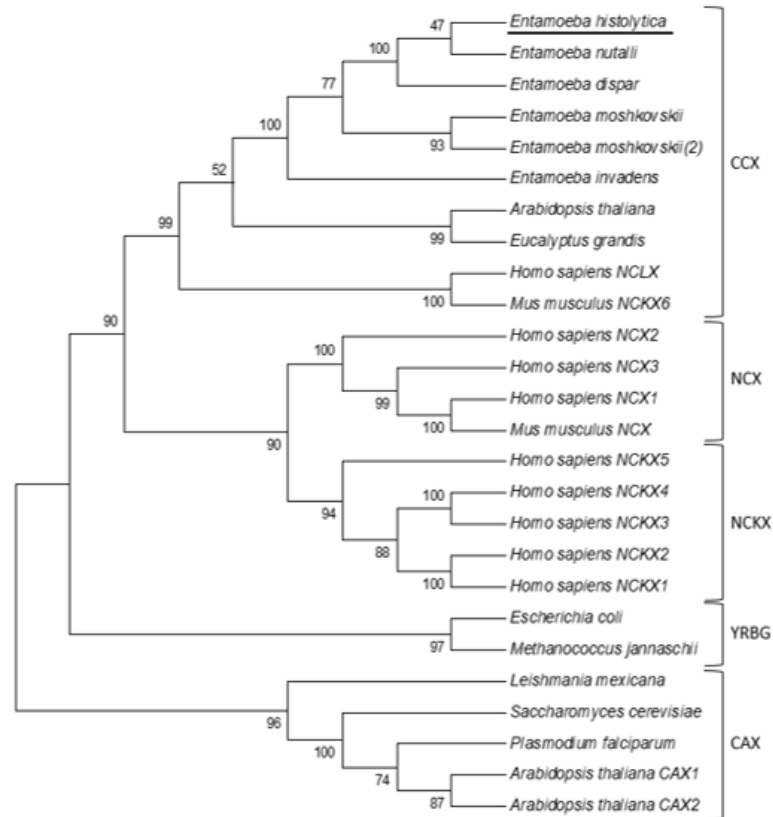
Para confirmar que el intercambiador de *E. histolytica* pertenece a la familia CCX se realizó un alineamiento de la secuencia de aminoácidos de sus  $\alpha$  repetidos con los correspondientes de miembros representativos de las diferentes familias de intercambiadores de calcio. Estos dominios son característicos de la superfamilia, pero cada familia presenta aminoácidos distintivos que están involucrados en el transporte de los diferentes iones (Lytton, 2007). EhCCX contiene las secuencias NGAPD en el dominio  $\alpha$ 1 y GNSIGD en el dominio  $\alpha$ 2 (Figura 9B), las cuales corresponden a las secuencias consenso de los intercambiadores del tipo CCX (GNG(A/T)PD y GNSIGD, respectivamente) (Lytton, 2007). Un estudio del intercambiador HsNCLX, el cual es parte de la familia CCX, determinó que los aminoácidos N149, P152, D153 del dominio  $\alpha$ 1, así como los residuos N467, S468, D471 y G494 del dominio  $\alpha$ 2, participan en el transporte de los iones sodio, calcio y/o litio (Roy et al, 2017). Interesantemente, el alineamiento de los dominios  $\alpha$ 1 y  $\alpha$ 2 demostró que el intercambiador de *E. histolytica* presenta esos mismos aminoácidos (Figura 9B). Estos resultados confirman que el intercambiador pertenece a la familia CCX, por lo que lo llamamos EhCCX

### **11.2 Expresión del gen *Ehccx* en trofozoítos de *E. histolytica***

Para determinar si el gen *Ehccx* se expresa en los trofozoítos se realizaron ensayos de RT-PCR. En estos experimentos se obtuvo un amplificado de 1542 pb que corresponde al tamaño esperado del gen completo (Figura 10A). Para comprobar que el fragmento amplificado corresponde al transcrito de *Ehccx* se analizó el mapa de restricción de la secuencia de nucleótidos del gen reportado en la base de datos del genoma de *E. histolytica* (EHI\_001770), el cual mostró que este gen tiene tres sitios de reconocimiento para la enzima *DraI* (Figura 10B). Así, el fragmento amplificado se purificó, se incubó con la enzima *DraI* y los productos de la digestión se analizaron en geles de agarosa. Los fragmentos generados por la enzima mostraron los tamaños esperados de 746, 559 y 222 pb (Figura 10C), lo que confirma que el producto amplificado

corresponde al gen *Ehccx*, el cual es transcripcionalmente activo en condiciones basales.

**A**



**B**

**Dominio- $\alpha$ 1**

<u>CCX_Eh</u>	96	ADLAGITILAIGNGAPDVFSTFVAIYN--TGDVELATAEVIGSGCFVSSIIVAS	147
<u>NCKL_Hs</u>	142	----VTFLAFGNAPDIFSAIVAFSD--PHTAGLALGALFG-----AGVLT	182
<u>NCX_Mi</u>	43	----ATVMAIGTSLPEILTSAYASYM---HAPGISIGNAIG-----SCICNI	82
<u>NCX1_Hs</u>	102	----LTLMALGSSAPEILLSVIEVCGHNFTAGDLGPSTIVG-----SAAFNM	179
<u>NCKX1_Hs</u>	497	----ATFMAAGGSAPELFTSLIGVF---ISHSNVIGTIVG-----SAVFNI	536
		* * * * *	

**Dominio- $\alpha$ 2**

<u>CCX_Eh</u>	386	SSILGLTVLCWGNSSVGDVFSNVIVSSQG-YSEMGIIASYGGPCFNLLIGLGG-----	436
<u>NCKL_Hs</u>	460	----LTLWAGNSIGDAFSDFTLARQG-YPRMAFSACFGGIIIFNVLVGVGLGCLLQ-IS	512
<u>NCX_Mi</u>	202	----FTLVAFGTSLPELMVSLAAAKRN-LGGMVLGNVIGSNIADIGGALAVGSLF---M	252
<u>NCX1_Hs</u>	838	----VVFVALGTSVDPDTFASKVAATQDQYADASIGNVTGSNAVNVFLGIGVAWSIAAIY	892
<u>NCKX1_Hs</u>	975	----LTILAAGTSIPDLITSVIVARKG-LGDMAVSSSVGSNIFDITVGLPVPWLLFSLI	1028
		* * * *	

■ Transporte de Ca<sup>2+</sup> or Li<sup>+</sup>      ■ Transporte de Na<sup>+</sup>

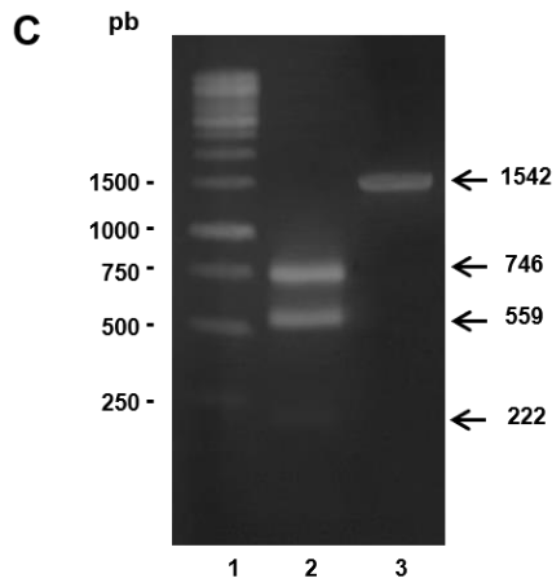
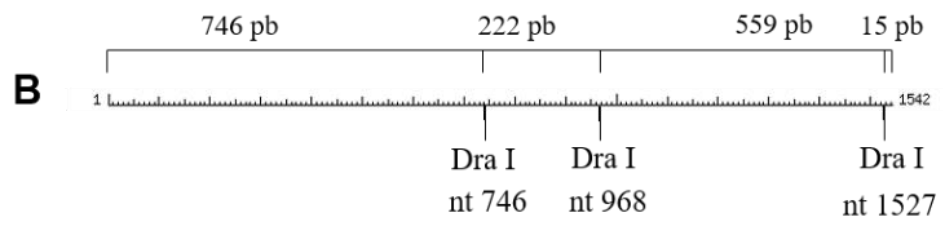
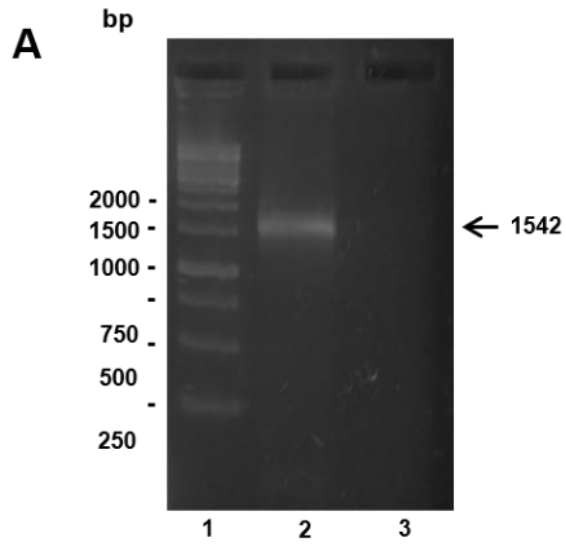
**Figura 9. Análisis filogenético del posible intercambiador de *E. histolytica*.** **(A)** La secuencia de aminoácidos del posible intercambiador fue alineada por el servidor ClustalW con varias secuencias de intercambiadores de diferentes organismos, los datos fueron sometidos a un análisis filogenético usando el software MEGA 5.0. las secuencias usadas para el análisis fueron las siguientes: *E. histolytica* (EHI\_001770); *E. nutalli* (ENVI\_134420); *E. dispar* (EDI\_138590); *E. invadens* (EIN\_083040); *E. moshcovskii* (EMO\_063580 y EMO\_049830); *Homo sapiens* NCXL (NP\_079235.2), NCKX 1-5 (NP\_004718.1, NP\_065077.1, NP\_065740.2, NP\_705932.2, y NP\_995322.1), y NCX1-3 (NP\_066920.1, NP\_055878.1, y NP\_150287.1); *Mus musculus* NCKX6 (NP\_573484.2) y NCX (AAB69167.1); *Arabidopsis thaliana* NCKX (NP\_197288.1), y CAX1-2 (NP\_181352.1 y NP\_566452.1); *Eucalyptus grandis* CCX (XP\_010054949.1); *Trichomonas vaginalis* CAX (XP\_001582908.1); *Plasmodium falciparum* CAX (SCP05226.1); *Leishmania Mexicana* CAX (XP\_003873397.1); *Saccharomyces cerevisiae* CVX1 (NP\_010155.1); *Escherichia coli* NCX (WP\_000922901.1); y *Methanococcus jannaschii* NCX (3V5S\_A). Los números en los nodos de las ramas indican el porcentaje de veces en que cada nodo del árbol se presentó en las matrices remuestreadas (Bootstrap:1000). Las proteínas son agrupadas como intercambiadores catión/ $\text{Ca}^{2+}$  (CCX), intercambiadores  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  (NCX), intercambiadores  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}+\text{K}^+$  (NCKX), intercambiadores bacterianos (YRBG) e intercambiadores  $\text{H}^+/\text{Ca}^{2+}$  (CAX). **(B)** La secuencia de aminoácidos de los repetidos  $\alpha 1$  y  $\alpha 2$  del intercambiador de *E. histolytica* se alineó con las secuencias correspondientes de algunos miembros representativos de las diferentes familias de intercambiadores. Los asteriscos indican los residuos idénticos en todas las secuencias. El cuadro muestra las secuencias consenso de la familia CCX. Los residuos sombreados indican los residuos que participan en el transporte de sodio, calcio o litio.

### 11.3 Localización subcelular de la proteína EhCCX

Con la finalidad de estudiar a la proteína EhCCX, se realizó la producción de anticuerpos contra un péptido específico. Para ello, primero se analizó la secuencia de la proteína mediante los programas ABCpred e hydrophobicity plot para obtener péptidos antigénicos. Entonces, con el fin de obtener péptidos específicos, las secuencias propuestas se usaron como sondas en un análisis de BLAST sobre la base de datos del genoma de *E. histolytica*. Así, se detectó al péptido localizado en la posición 216-229 (ISEQLDSENKTKLI), y que de acuerdo con el modelo 3D se encuentra expuesto en su superficie (Figura 11A), el cual fue propuesto como un antígeno para obtener anticuerpos contra EhCCX. Dicho péptido se sintetizó acoplado a la secuencia KLH (Keyhole Limpet Hemocyanin) para volverlo más inmunogénico. Para confirmar la especificidad de los anticuerpos se realizaron ensayos de Western blot, donde se detectó una sola banda de 56 kDa, el peso molecular esperado para el EhCCX (Figura 11B).

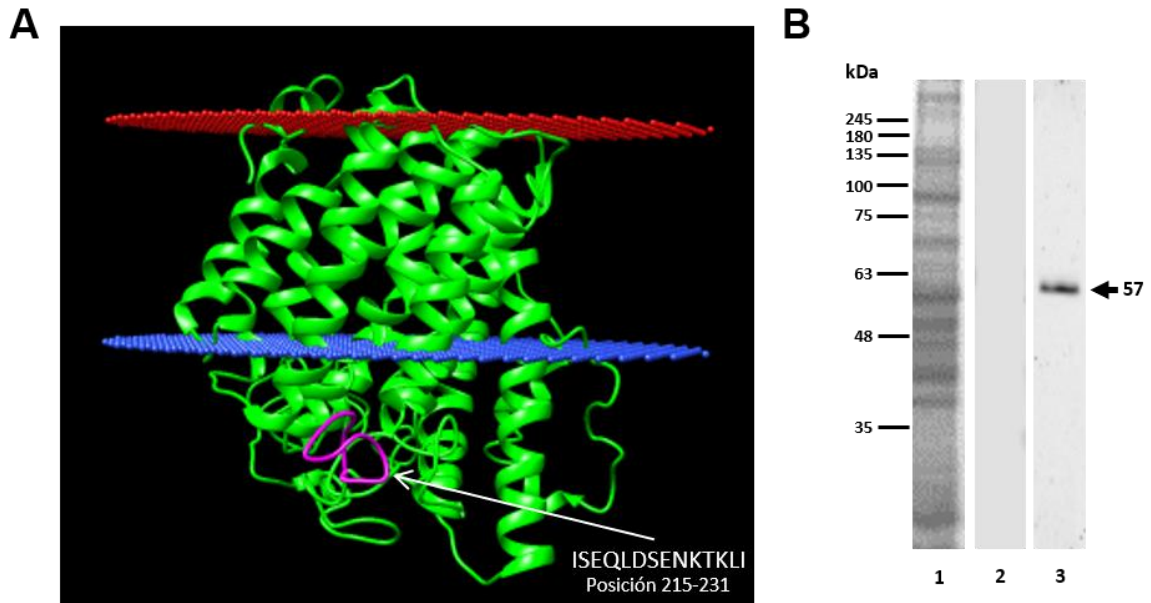
Para determinar la localización subcelular de la proteína se realizaron ensayos de inmunofluorescencia y microscopia confocal, donde se usaron los anticuerpos generados anteriormente. En estos experimentos se observó a la proteína EhCCX en la membrana plasmática y en la membrana de varias vesículas citoplásmicas (Figura 12A). Experimentos de inmunomicroscopía electrónica usando el anticuerpo anti EhCCX y el respectivo anticuerpo secundario acoplado a partículas de oro coloidal confirmó la presencia del intercambiador en la membrana plasmática y en la membrana de algunas vesículas citoplásmicas (Figura 12B).



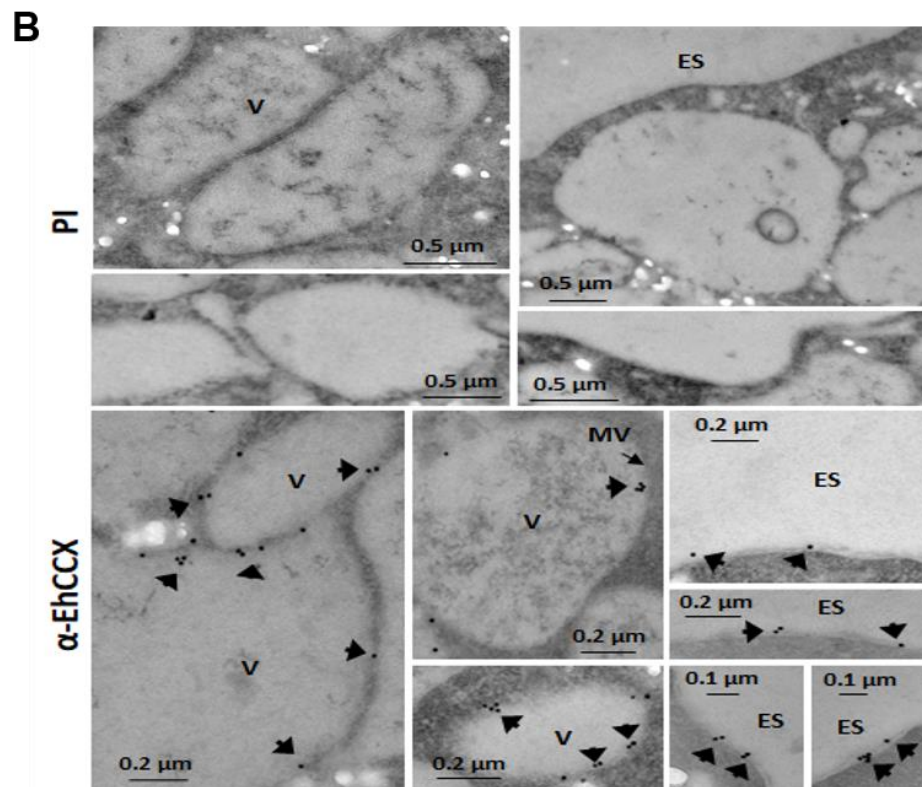
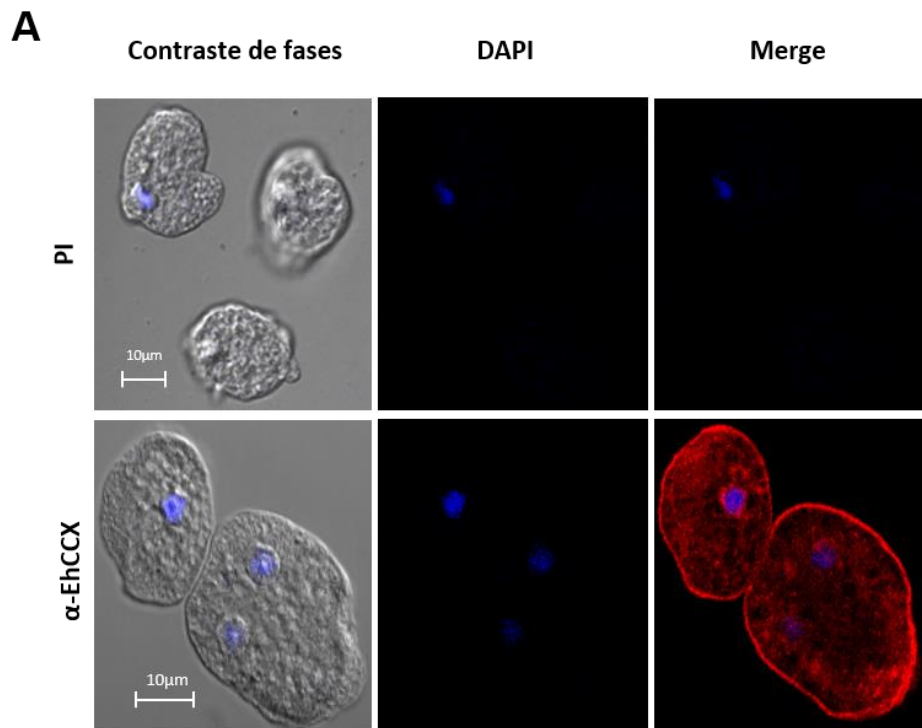


**Figura 10. Expresión del gen *EhCCX* en trofozoítos de *E. histolytica*. (A)**

A partir del cDNA de los trofozoítos se realizaron ensayos de PCR usando oligonucleótidos específicos para el gen *Ehccx* completo y los productos de amplificación se analizaron en geles de agarosa al 1% teñidos con bromuro de etidio. Carril 1, Marcador de DNA 1kb (250-10000 pb); Carril 2, PCR utilizando cDNA como molde; Carril 3, PCR usando RNA como molde. **(B)** Representación esquemática de la secuencia EHI\_001770 del genoma de *E. histolytica* mostrando la presencia de los sitios de corte para la enzima *DraI* y la longitud de los fragmentos generados por esa enzima. **(C)** Para confirmar la identidad del fragmento amplificado, este se incubó con la enzima de restricción *DraI* y los productos de digestión se analizaron en geles de agarosa al 1% teñidos con bromuro de etidio. Carril 1, Marcador de DNA 1kb (250-10000 pb); Carril 2, digestión del fragmento amplificado con *DraI*; Carril 3, fragmento amplificado sin digerir.



**Figura 11 Reconocimiento de la proteína EhCCX por anticuerpos específicos. (A)** Estructura 3D de la proteína EhCCX (verde) ubicada en una membrana bi-lipídica (rojo y azul). En magenta se muestra la secuencia del péptido en la posición 215-231 que se mandó sintetizar para obtener anticuerpos específicos. **(B)** Western blot sobre extractos totales de trofozoítos. Carril 1 Extractos totales de *E. histolytica* separados por electroforesis en geles de poliacrilamida al 10% y teñidos con azul de Coomassie, donde se observa el perfil proteico. Carril 2 Western blot con suero preimmune, donde no se observa inmunodetección. Carril 3 Western blot con  $\alpha$ -EhCCX, donde se inmuodetectó una banda con un peso aproximado de 57 kDa.



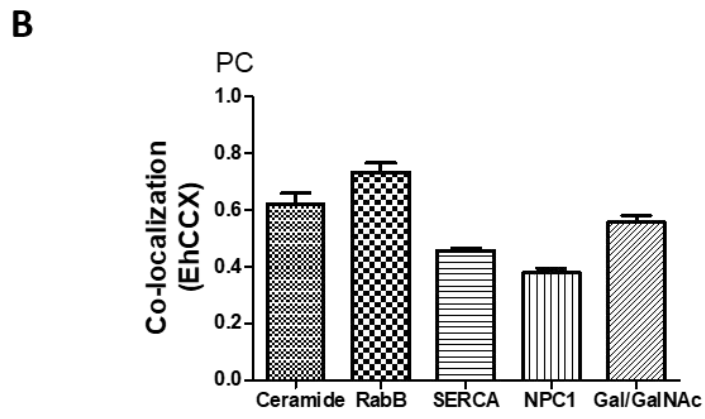
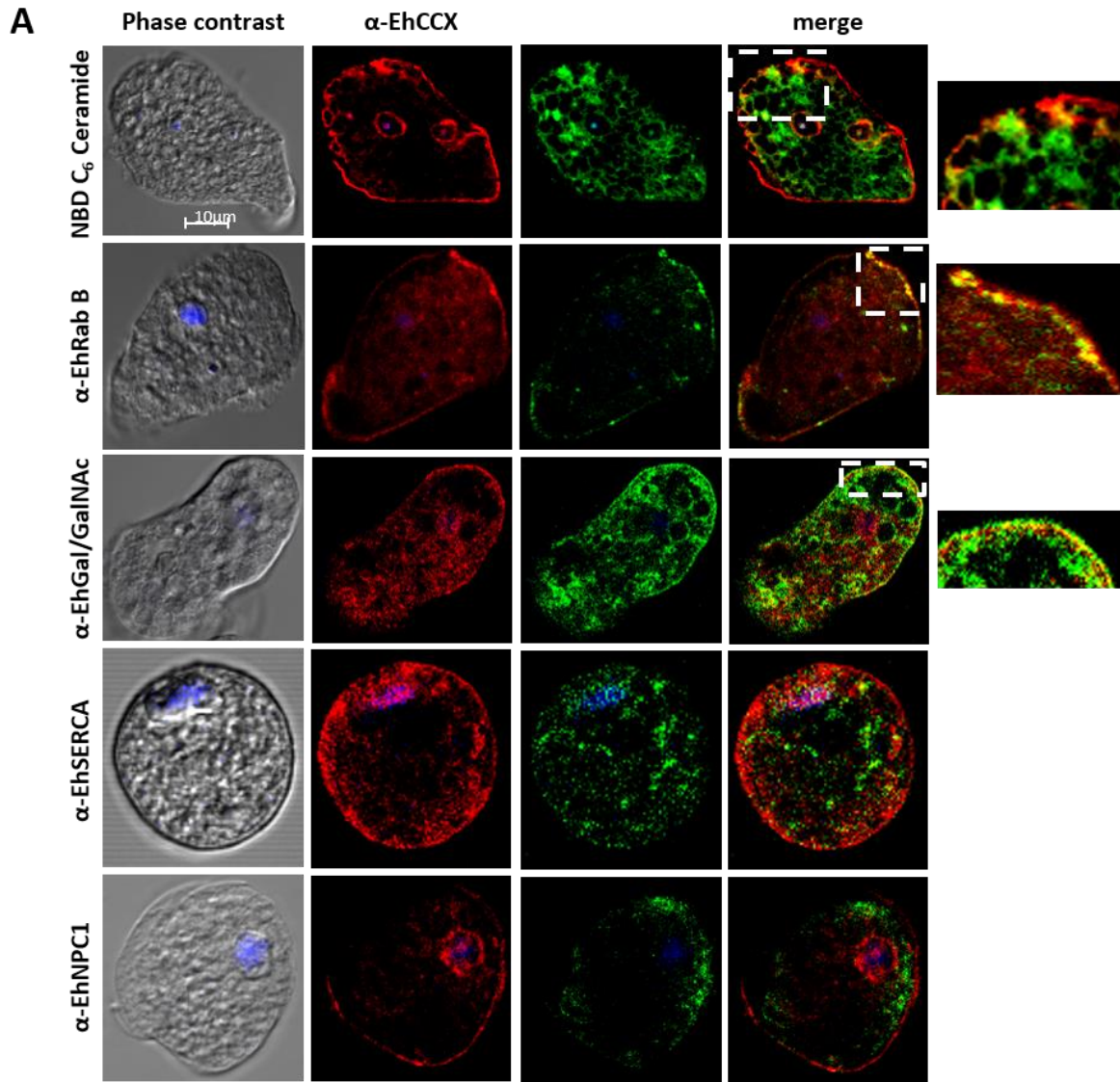
**Figura 12 Localización subcelular de la proteína EhCCX en trofozoítos de *E. histolytica*.** **(A)** Inmunofluorescencia indirecta. Trofozoítos en condiciones basales fueron fijados, permeabilizados e incubados con suero pre-inmune (PI) o con el anticuerpo contra EhCCX ( $\alpha$ -EhCCX) y subsecuentemente con un anticuerpo secundario acoplado a Alexa 555 (rojo). Los núcleos se contratiñeron con DAPI (azul) y finalmente, las muestras se analizaron por microscopía confocal. **(B)** Inmunomicroscopía electrónica. Trofozoítos en condiciones basales fueron fijados con paraformaldehído y glutaraldehído. Después, las muestras fueron embebidas en resina LR White y polimerizadas bajo la luz UV. Posteriormente, cortes de 60 nm se incubaron con suero pre-inmune (PI) o con anticuerpos  $\alpha$ -EhCCX y subsecuentemente con anticuerpos secundarios acoplados a oro coloidal. Finalmente, las muestras se observaron por microscopía electrónica de transmisión. Las flechas indican la presencia de EhCCX en la membrana de las vesículas y en la membrana plasmática. V vesículas, ES espacio extracelular, MV membrana vesicular.

Posteriormente, con el fin de tratar de identificar los posibles compartimentos citoplásmicos en los cuales podría estar situado EhCCX, se analizó su co-localización con marcadores de retículo endoplásmico (EhSERCA) (Martínez-Higuera et al, 2013), aparato de Golgi (NBD C<sub>6</sub>-Ceramida), endosomas tardíos (EhNPC1) (Bolanos et al, 2016) y vesículas endocíticas (EhRabB) (Rodríguez et al, 2000). Así mismo, se comprobó la localización del intercambiador en la membrana plasmática por su co-localización con la lectina Gal/GalNac (Petri et al, 1989). En estos ensayos, EhCCX co-localizó con la lectina Gal/GalNac y EhRabB en la membrana plasmática, o cerca de ella (Figura 13A). Así mismo, se observó co-localización con el marcador de Golgi en la membrana de algunas vesículas cercanas a la membrana plasmática, sugiriendo su presencia en las redes trans-Golgi (Figura 13). Sin embargo, EhCCX no mostró co-localización significativa con EhSERCA, NPC1 o con vesículas citoplásmicas conteniendo a EhRabB (Figura 13A). Para corroborar la co-localización se realizó una gráfica de correlación mediante el coeficiente de Pearson, donde Gal/GalNac y EhRabB mostraron coeficientes de 0.559 y 0.73425 respectivamente, correspondientes a la co-localización encontrada en la membrana o cercana a ella, mientras que con NBD C<sub>6</sub>-Ceramida presentó 0.62125 de coeficiente de correlación (Figura 13B). Estos resultados sugieren que EhCCX en la membrana podría estar involucrado en la expulsión de Ca<sup>2+</sup> del citosol, y su presencia en el trans-Golgi se puede deber a su transporte citoplásmico. Por otro lado, las modificaciones postraduccionales necesarias para el proceso de maduración de EhCCX podrían explicar la presencia en el aparato de Golgi. Sin embargo, hasta el momento no se conoce la identidad de la mayoría de las vesículas citoplásmicas que contienen EhCCX, ni su función en estas estructuras.

#### **11.4 Expresión y localización del intercambiador en la amiba no patógena *Entamoeba dispar***

Se ha descrito que el flujo de iones calcio participa en el mecanismo patogénico de *E. histolytica* (Ravdin & Guerrant, 1980). Por otra parte, la amiba *Entamoeba dispar* es una amiba no patógena morfológicamente indistinguible de *E. histolytica*.

Así, para analizar la posibilidad de que EhCCX participe en la patogénesis de *E. histolytica* se comparó la expresión y localización del ortólogo en trofozoítos de *E. dispar*. Para ello, primero se analizó la presencia del péptido antigénico en el intercambiador de *E. dispar* (EdCCX), encontrando la secuencia en la misma posición con una identidad del 93% y una similitud del 100% con EhCCX (datos no mostrados). Mediante ensayos de Western blot semi-cuantitativos encontramos que *E. dispar* expresa aproximadamente 20% menos intercambiador comparado con *E. histolytica* (Figura 14A). En los ensayos de inmunofluorescencia usando el anticuerpo  $\alpha$ -EhCCX se observó una localización de EdCCX similar a la encontrada para EhCCX, sin embargo, la señal de fluorescencia se ve disminuida en *E. dispar* (Figura 14B), confirmando la menor expresión de la proteína en la amiba no patógena, lo que sugiere un posible papel de este intercambiador en la patogenicidad de *E. histolytica*.

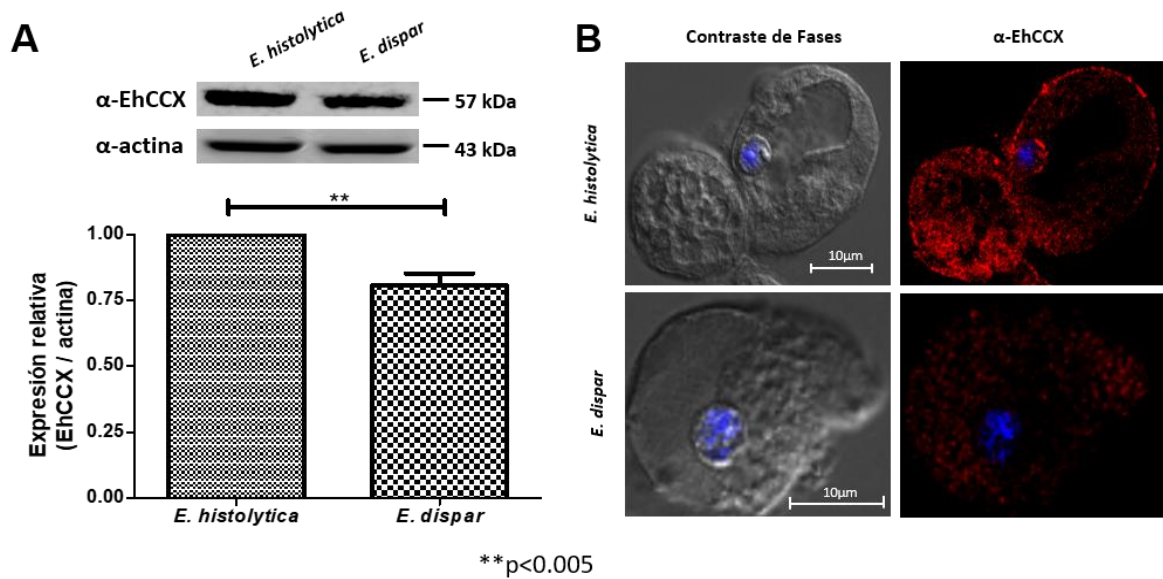




**Figura 13 Ensayos de Co-localización.** **(A)** Trofozoítos de *E. histolytica* fueron fijados, permeabilizados e incubados con anticuerpos de rata  $\alpha$ -EhCCX y posteriormente con anticuerpos de conejo contra EhSERCA, EhRabB y EhNPC1; o con anticuerpos de ratón contra la lectina Gal/GalNac. Después, las muestras se incubaron con anticuerpos contra IgGs de rata marcados con Alexa 555 (rojo), anti IgGs de conejo marcados con Alexa 488 (verde) o anti IgGs de ratón marcados con FITC (verde). Por otro lado, después de la incubación con los anticuerpos  $\alpha$ -EhCCX y anti IgGs de rata Alexa 555, una muestra se incubó con NBD C<sub>6</sub>-ceramida (verde) para la tinción del aparato de Golgi. Finalmente, los núcleos se tiñeron con DAPI (azul) y las muestras se analizaron por microscopia confocal. De lado derecho se observan las ampliaciones de los cuadros blancos marcados en las imágenes de co-localización con NBD C<sub>6</sub>-Ceramida, EhRabB y la lectina Gal/GalNac. **(B)** Grafica del Coeficiente de Pearson de la co-localización entre EhCCX y los diferentes marcadores.

### **11.5 Análisis de la expresión y localización de EhCCX bajo condiciones de estrés**

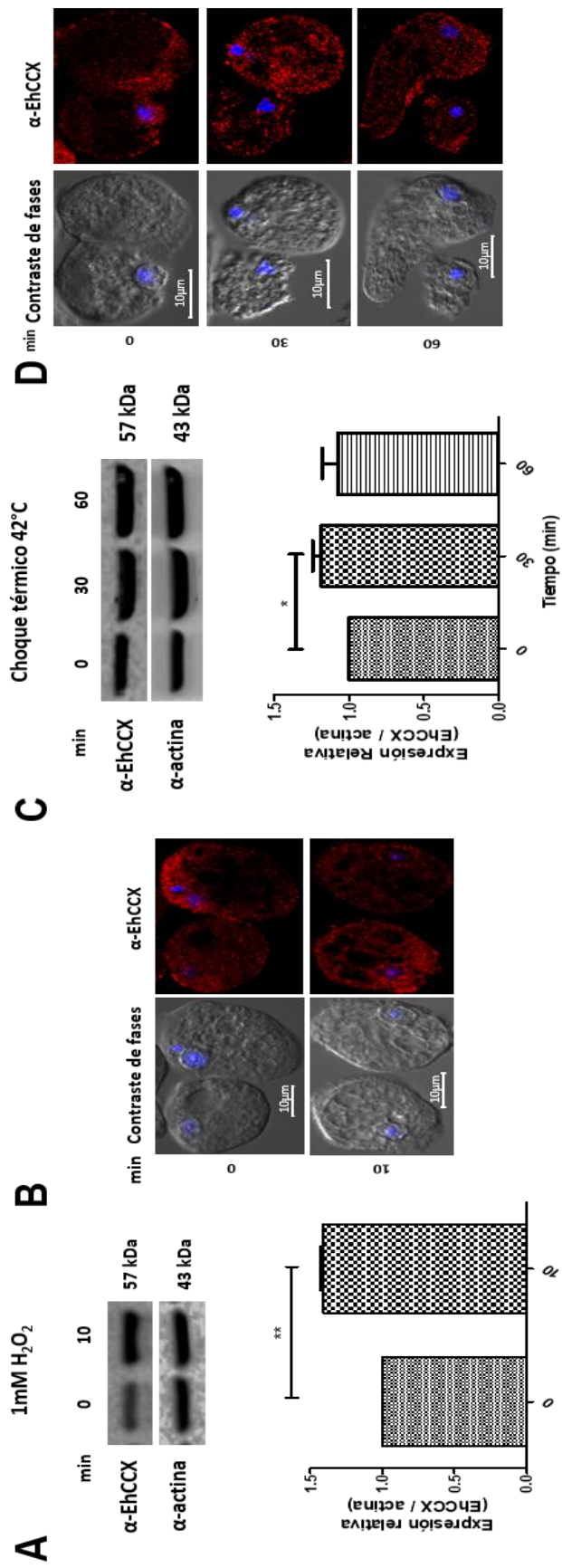
Para investigar si EhCCX pudiera participar en la respuesta a diferentes condiciones de estrés, se analizaron los niveles de la proteína y su localización subcelular en trofozoítos sometidos a estrés oxidativo o a estrés térmico. En trofozoítos de *E. histolytica* incubados con 1mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> durante 10 min, el nivel de la proteína EhCCX aumentó ligeramente (aproximadamente 0.4 veces) comparado con los parásitos control (Figura 15A). Este resultado sugiere que esta proteína podría ser necesaria para la expulsión del calcio intracelular que aumenta durante el estrés oxidativo, tratando así de evitar el daño celular. En los ensayos de inmunofluorescencia se observó una pequeña acumulación de EhCCX en la membrana plasmática, lo que soporta la idea de su papel en la extrusión de calcio. En estos ensayos también se notó cierta acumulación de intercambiador en algunas vacuolas citoplásmicas de gran tamaño (Figura 15B), aunque su función en estas estructuras se desconoce. Por otra parte, en trofozoítos de *E. histolytica* incubados durante 30 min a 42 °C, los niveles de expresión de EhCCX mostraron un modesto aumento (aproximadamente 0.2 veces), mientras que los niveles de proteína disminuyen a casi los valores basales a los 60 min de choque térmico (Figura 15C). En los ensayos de inmunofluorescencia no se observó cambio en la localización de la proteína en los tiempos analizados (Figura 15D). Los resultados sugieren que EhCCX podría tener una menor participación o no participar en la respuesta a choque térmico.



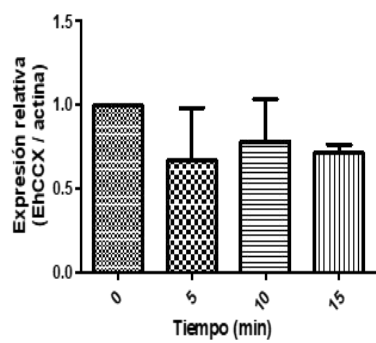
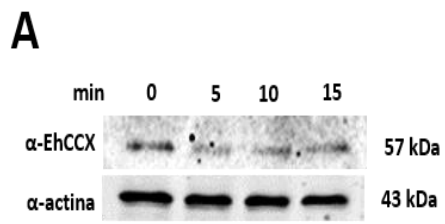
**Figura 14 Expresión y localización subcelular de CCX en *E. dispar*.** (A) Comparación de los niveles de expresión de la proteína CCX en *E. histolytica* (EhCCX) y *E. dispar* (EdCCX) por ensayos de Western blot usando el anticuerpo α-EhCCX. Como control de carga se utilizó un anticuerpo α-actina probado en las mismas membranas. Las bandas obtenidas se analizaron por densitometría y los datos fueron normalizados al contenido de actina. La expresión relativa de *E. histolytica* fue considerada arbitrariamente como 1. (B) trofozoítos de *E. histolytica* y *E. dispar* fueron fijados, permeabilizados e incubados con el anticuerpo α-EhCCX, y posteriormente con el anticuerpo secundario conjugado con Alexa-555 (rojo), los núcleos se tiñeron con DAPI (azul) y las muestras se analizaron por microscopia confocal.

### **11.6 Análisis de la expresión y localización de EhCCX durante la eritrofagocitosis.**

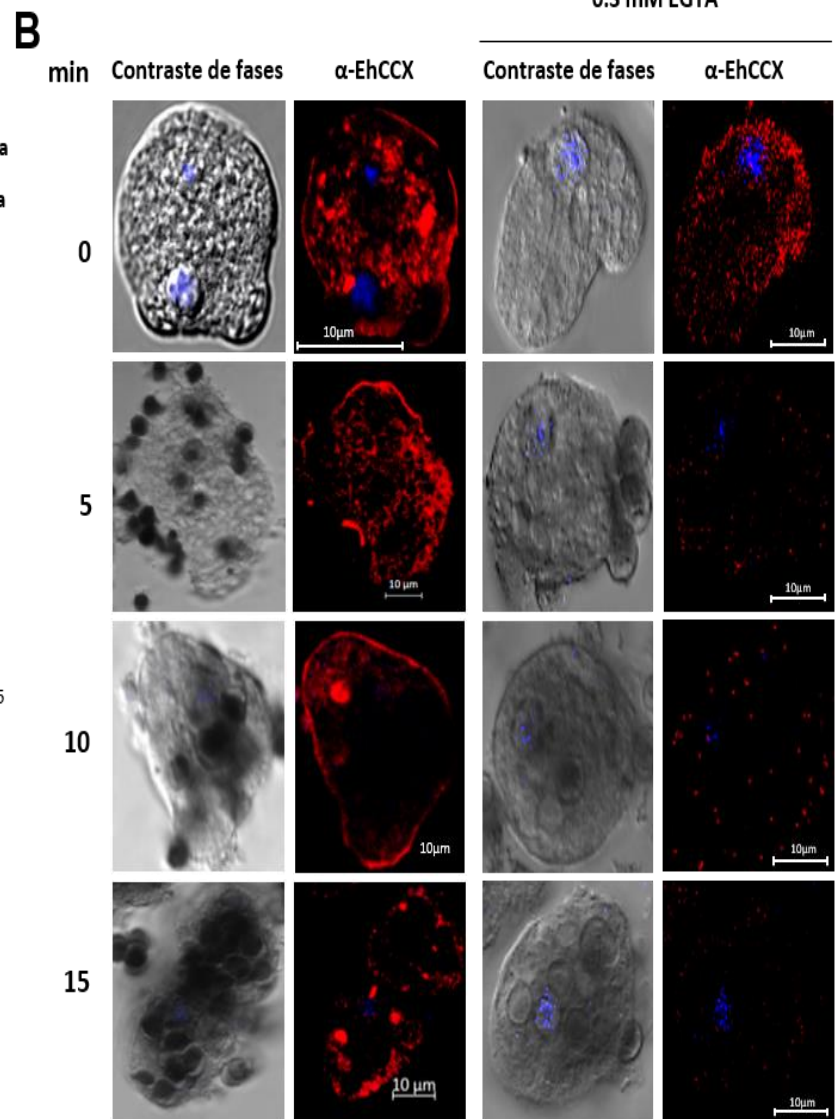
Se ha descrito que la acumulación de calcio citosólico juega un papel importante en varios procesos celulares de los trofozoítos de *E. histolytica*, incluyendo la fagocitosis (Jain et al, 2008). Para conocer el papel de EhCCX en la fagocitosis se realizaron ensayos de Western blot sobre extractos totales de trofozoítos obtenidos a diferentes tiempos de eritrofagocitosis. En estos ensayos no se observó diferencia significativa en los niveles de proteína a los tiempos analizados (Figura 16A). Sin embargo, si observamos cambios en su localización subcelular durante este evento. A los 5 min de fagocitosis, la localización de EhCCX se observó muy similar al de la condición basal, pero a los 10 min el intercambiador se localizó principalmente en la membrana plasmática, mientras que a los 15 min la proteína se concentró en algunos puntos citoplásmicos (Figura 16B). La acumulación de EhCCX en la membrana plasmática a los 10 min de fagocitosis sugiere que este intercambiador podría participar en la señalización provocada por la interacción con la célula blanco, la cual podría ser interrumpida a los 15 min por la internalización de EhCCX. En la presencia del quelante de calcio EGTA, pocos eritrocitos fueron fagocitados por los trofozoítos, incluso después de 30 min (Figura 16B), confirmando que el flujo de calcio está involucrado en este proceso. En estas condiciones, el movimiento de EhCCX a la membrana plasmática no fue observado, sino que se concentró en algunos puntos pequeños en el citoplasma (Figura 16B). Estos resultados sugieren que la vía de señalización desencadenada por la presencia de las células blanco promueve el reclutamiento de EhCCX en la superficie de la amiba.



**Figura 15 Expresión y localización de EhCCX expuestos a 1 mM de peróxido de hidrogeno y a choque térmico. (A, B)** Trofozoítos de *E. histolytica* se incubaron en ausencia (0 min) o presencia de 1mM de peróxido durante 10 min. **(C, D)** Trofozoítos de *E. histolytica* se incubaron a 37 °C (0 min) o a 42 °C durante 30 y 60 min. **(A, C)** Los niveles de expresión de EhCCX fueron analizados por Western blot. Posteriormente, las membranas fueron probadas con el anticuerpo  $\alpha$ -actina, utilizado como control de carga. Las bandas reconocidas por  $\alpha$ -EhCCX se analizaron por densitometría y los datos se normalizaron con respecto al contenido de actina. La expresión relativa de los trofozoítos a 0 min se tomó arbitrariamente como 1. Los datos son expresados como la media  $\pm$  error estándar de tres experimentos independientes. **(B, D)** Los trofozoítos se fijaron, permeabilizaron e incubaron con  $\alpha$ -EhCCX y posteriormente con el anticuerpo secundario conjugado Alexa-555, los núcleos se tiñeron con DAPI. Finalmente, las muestras se observaron por microscopia confocal.



\*  $p < 0.05$



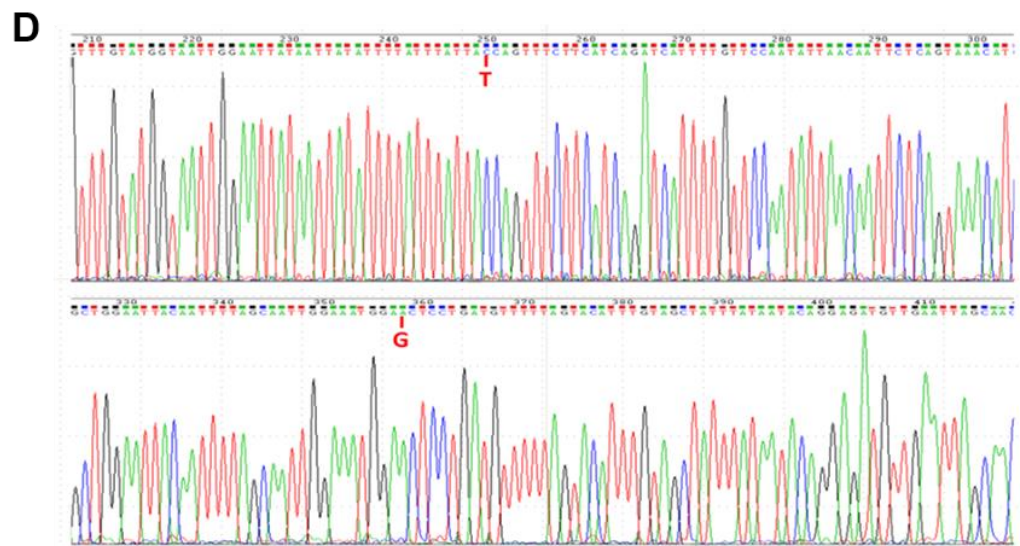
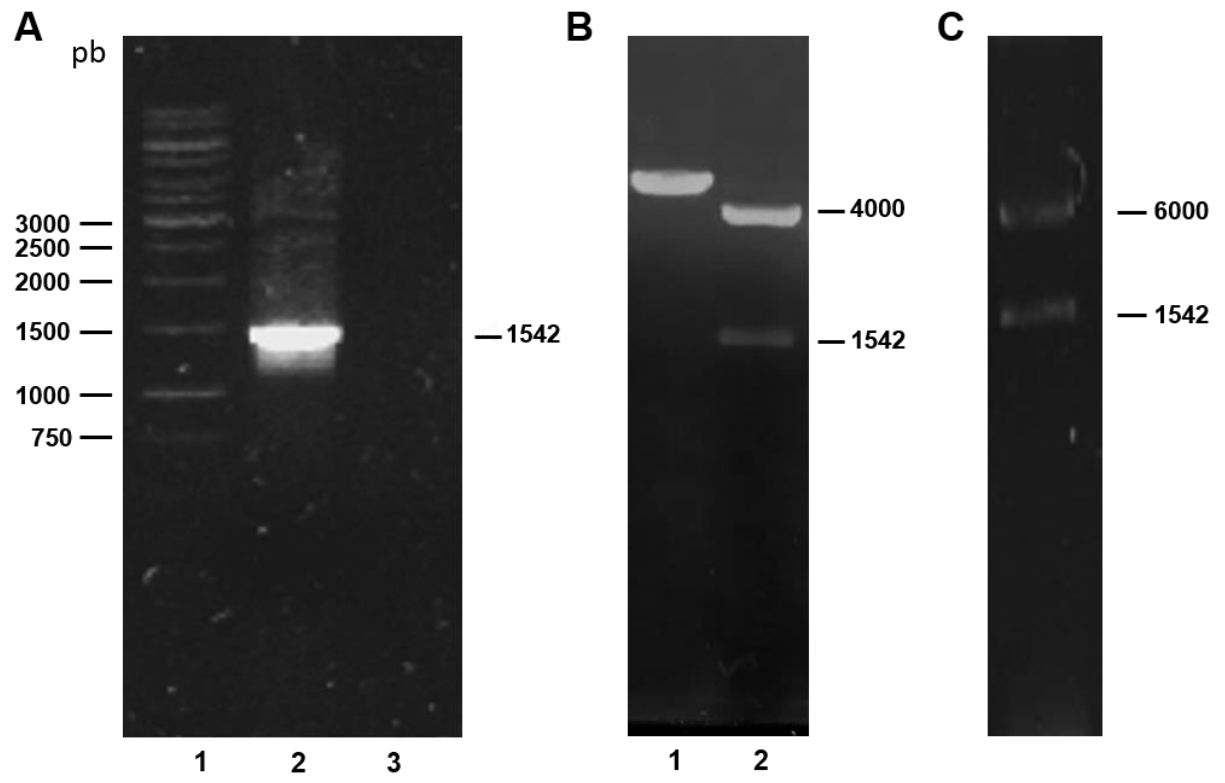
**Figura 16. Expresión y localización de EhCCX durante la fagocitosis.**

Trofozoítos de *E. histolytica* se incubaron a 37 °C sin eritrocitos (0 min) o en presencia de eritrocitos (relación 1:50) durante 5, 10 y 15 min. **(A)** La expresión de EhCCX fue analizada por ensayos de Western blot, como control de carga se utilizó el anticuerpo  $\alpha$ -actina. Las bandas reconocidas se analizaron por densitometría y los datos se normalizaron con respecto al contenido de actina. La expresión relativa de EhCCX a los 0 min se tomó arbitrariamente como 1. Los datos son expresados como la media  $\pm$  el error estándar de tres ensayos independientes. **(B)** Los trofozoítos se fijaron, permeabilizaron e incubaron con  $\alpha$ -EhCCX y posteriormente con el anticuerpo secundario acoplado a Alexa-555. Los núcleos se tiñeron con DAPI y las muestras se analizaron por microscopia confocal. Las imágenes de la derecha representan los ensayos realizados con la presencia de 0.3 mM de EGTA.



### 11.7 La sobreexpresión de EhCCX modifica los niveles de calcio en los trofozoitos

Para confirmar el papel de EhCCX en el transporte de calcio, el intercambiador se sobreexpresó en los trofozoitos de *E. histolytica*. Para ello, se realizó la amplificación del gen *Ehccx* por PCR usando como molde el DNA genómico aislado de los trofozoitos y una DNA polimerasa de alta fidelidad. En esos ensayos se obtuvo un amplicón del tamaño esperado (1542 pb) (Figura 17A), el cual se clonó en el vector de transición PCR 4 TOPO. Para confirmar su clonación, se extrajo el DNA plasmídico de bacterias transformadas y se realizó la digestión de los plásmidos con las enzimas *KpnI* y *BamHI*. El análisis por electroforesis en geles de agarosa mostró la liberación del fragmento correspondiente al gen *Ehccx* (Figura 17B). Entonces, el fragmento liberado fue purificado para su posterior subclonación en el plásmido de expresión en *E. histolytica* *pExEhNeo* (*pNeo*) (Hamann et al, 1995). Nuevamente, para confirmar la clonación, bacterias DH5 $\alpha$  se transformaron con la construcción correspondiente (*pNeo/Ehccx*) y el plásmido obtenido de estas bacterias se digirió con las enzimas *KpnI* y *BamHI*. El análisis de los productos de digestión por electroforesis en geles de agarosa confirmó la liberación del gen *Ehccx* del plásmido *pNeo* (Figura 17C). Posteriormente, se realizó la secuenciación del fragmento clonado, donde se observó el cambio de dos nucleótidos con respecto a la secuencia EHI\_001770 que se encuentra en la base de datos del genoma de *E. histolytica*. En el gen clonado se encontró el cambio de C por T en la posición 220 y de A por G en la posición 328. Al analizar la secuencia de aminoácidos se detectó que esos cambios a nivel de nucleótidos producen modificaciones de los aminoácidos en las posiciones 74 (serina por prolina) y 110 (alanina por treonina) (Figura 18A). Estos cambios se localizan en el repetido  $\alpha$ 1, sin embargo, no se detectó alteraciones en la predicción de la estructura de este dominio al compararla con la estructura del mismo dominio de la secuencia EHI\_001770 (Figura 18B).



**Figura 17. Clonación y secuenciación del gen *Ehccx*.** El gen *Ehccx* se amplificó por PCR, se clonó en el vector PCR 4 TOPO y se subclonó en el vector pNeo. **(A)** Producto de PCR usando DNA genómico como molde y una DNA polimerasa de alta fidelidad. Carril 1, Marcador 1kb; Carril 2, amplificado del gen completo *Ehccx* (1542 pb); Carril 3, PCR sin molde. **(B)** Clonación en PCR 4 TOPO. El DNA plasmídico aislado de bacterias transformadas con la ligación de PCR 4 TOPO/*Ehccx* se digirió con las enzimas *BamHI* y *KpnI* y los productos se analizaron por electroforesis en geles de agarosa teñidos con bromuro de etidio. Carril 1, plásmido TOPO/*Ehccx* digerido con la enzima *BamHI*; Carril 2, plásmido TOPO/*Ehccx* digerido con las enzimas *BamHI* y *KpnI*. **(C)** El DNA plasmídico aislado de bacterias transformadas con la ligación pNeo/*Ehccx* se digirió con las enzimas

*BamHI* y *KpnI* y los productos se analizaron por electroforesis en geles de agarosa teñidos con bromuro de etidio. **(D)** Electroferograma correspondiente a la secuenciación del gen clonado. Los cambios con respecto a la secuencia EHI\_00170 (nucleótidos 220 y 328) están indicados con letras rojas (T, G).

Así, la construcción *pNeo/Ehccx* se usó para transfectar trofozoítos de *E. histolytica* (trofozoítos pNeo/EhCCX). Para comprobar la sobreexpresión del gen *Ehccx* se realizaron ensayos de qRT-PCR, los cuales mostraron que los trofozoítos transfectados expresaron 3.5 veces más el transcrito *Ehccx*, con respecto a los trofozoítos control transfectados con el vector vacío (trofozoítos pNeo) (Figura 19A). Por otro lado, ensayos de Western blot mostraron que la proteína EhCCX se expresó 2.8 veces más en los trofozoítos pNeo/EhCCX que en los trofozoítos pNeo (Figura 19B).

Posteriormente, para confirmar que EhCCX participa en el flujo de  $Ca^{2+}$ , se analizaron los niveles de calcio citosólico en los trofozoítos transfectados (pNeo y pNeo/EhCCX) usando Fluo-4 AM, una molécula que exhibe un incremento en la fluorescencia al unirse al calcio, y citometría de flujo. En las células que sobreexpresaron el intercambiador la intensidad de fluorescencia fue aproximadamente dos veces mayor con respecto a la que mostró el control (pNeo) (Figura 20A). Estos resultados confirman que EhCCX participa en el flujo del ion calcio en los trofozoítos de *E. histolytica*, ya que la mayor expresión del intercambiador produjo una mayor entrada de este ion al citosol.

### **11.8 La sobreexpresión de EhCCX retarda la muerte celular programada inducida por peróxido de hidrógeno**

Para analizar el papel de EhCCX en el flujo de calcio durante la muerte celular programada, a trofozoítos conteniendo el indicador Fluo-4 AM se les adicionó 1mM de  $H_2O_2$  y se midió la intensidad de fluorescencia cada 40 s. En las células pNeo la intensidad de fluorescencia aumentó gradualmente hasta los 280 s. Sin embargo, en las células pNeo/EhCCX la intensidad de fluorescencia aumentó después de 40 s de incubación con  $H_2O_2$ , pero

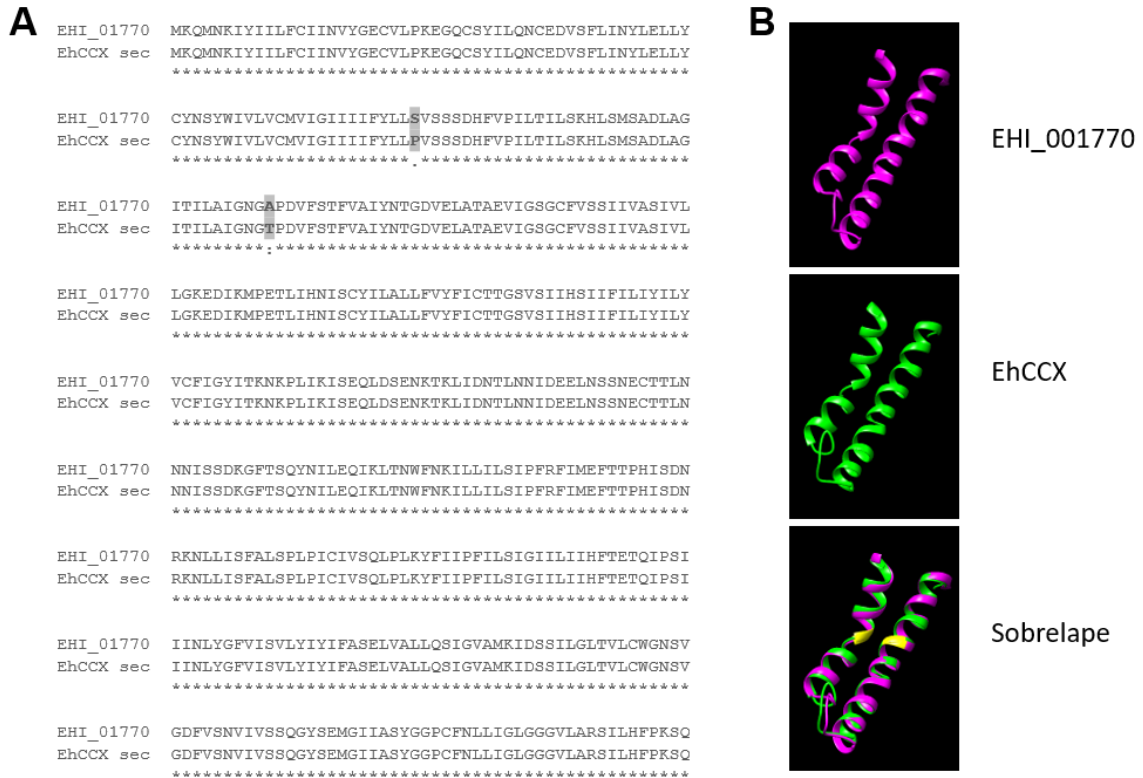
posteriormente la señal disminuyó progresivamente, hasta que después de 400 s la intensidad de fluorescencia fue similar a la de las células pNeo en la condición basal (Figura 20B). Estos resultados confirman el papel de EhCCX en el transporte de calcio, debido a que la mayor expresión del intercambiador produce una mayor entrada de calcio en condiciones basales y mejora la expulsión del calcio citosólico durante la muerte celular programada inducida por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

En concordancia con el incremento en la extrusión de calcio de los trofozoítos pNeo/EhCCX durante la incubación con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, la muerte celular de estos parásitos después de 30 y 60 min de exposición a este compuesto fue significativamente menor a la de las células pNeo (Figura 20C). Sin embargo, no se observó diferencia en la muerte celular después de los 90 min de tratamiento (Figura 20C). Estos resultados sugieren que la mayor expulsión del calcio citosólico mediada por el intercambiador sobreexpresado retardó la muerte celular programada de los trofozoítos.

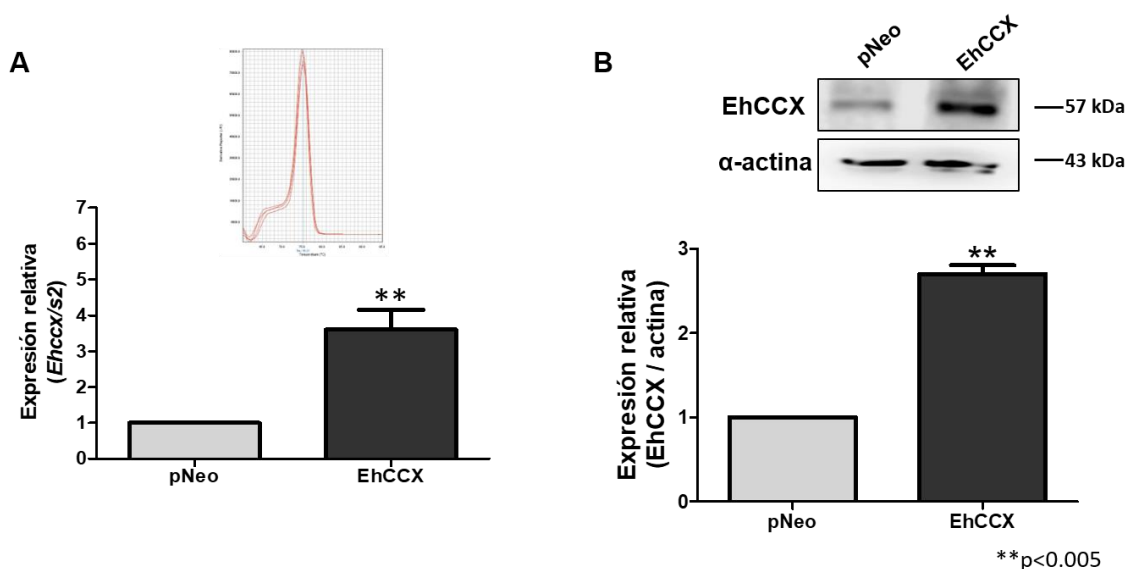
### **11.9 La sobreexpresión de EhCCX incrementa la virulencia *in vitro***

Por otra parte, con el fin de analizar el papel del flujo de calcio a través de EhCCX en la virulencia *in vitro* de *E. histolytica* se evaluó la eritrofagocitosis, la actividad citopática y la migración de los trofozoítos pNeo/EhCCX. Los resultados mostraron un incremento significativo en la tasa de eritrofagocitosis de las células pNeo/EhCCX comparadas con pNeo (Figura 21A). En estos trofozoítos también aumentó la actividad citopática, ya que la capacidad de destrucción de monocapas de células MDCK fue más del doble que la de las células control (pNeo) (Figura 21B). Finalmente, para evaluar el impacto de la sobreexpresión de la proteína EhCCX en la movilidad de los trofozoítos, estos se colocaron en la parte superior de un transwell y después de 3 h se contó el número de trofozoítos que fueron capaces de migrar hacia la parte inferior de la cámara siguiendo un estímulo de suero. Notablemente, la migración de los trofozoítos pNeo/EhCCX se incrementó casi cuatro veces en comparación con pNeo (Figura 21C). Todos estos resultados respaldan la hipótesis de que el

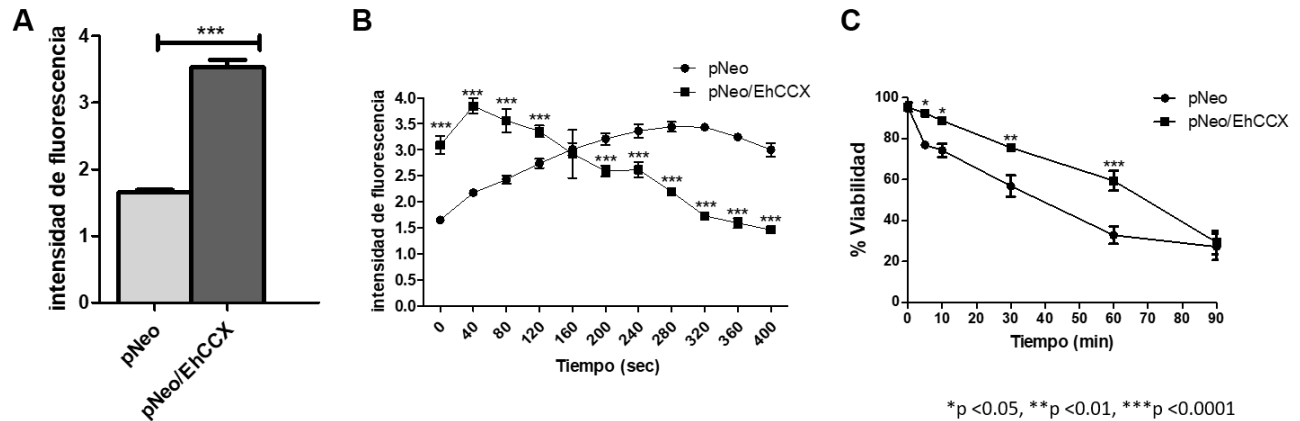
flujo de Ca<sup>2+</sup> mediado por EhCCX participa en la virulencia *in vitro* de *E. histolytica*.



**Figura 18. Comparación de las secuencias de aminoácidos de EHI\_001770 y EhCCX. (A)** Comparación de la secuencia de aminoácidos deducidas de EHI\_001770 de AmoebaDB y del gen obtenido en este trabajo (EhCCX). Los Cambios en los residuos 74 y 110 se muestran sombreados. **(B)** Comparación estructural del repetido  $\alpha 1$  de ambas proteínas. En el traslape, los segmentos en amarillo indican los sitios donde se encuentran los aminoácidos diferentes entre ambas proteínas.



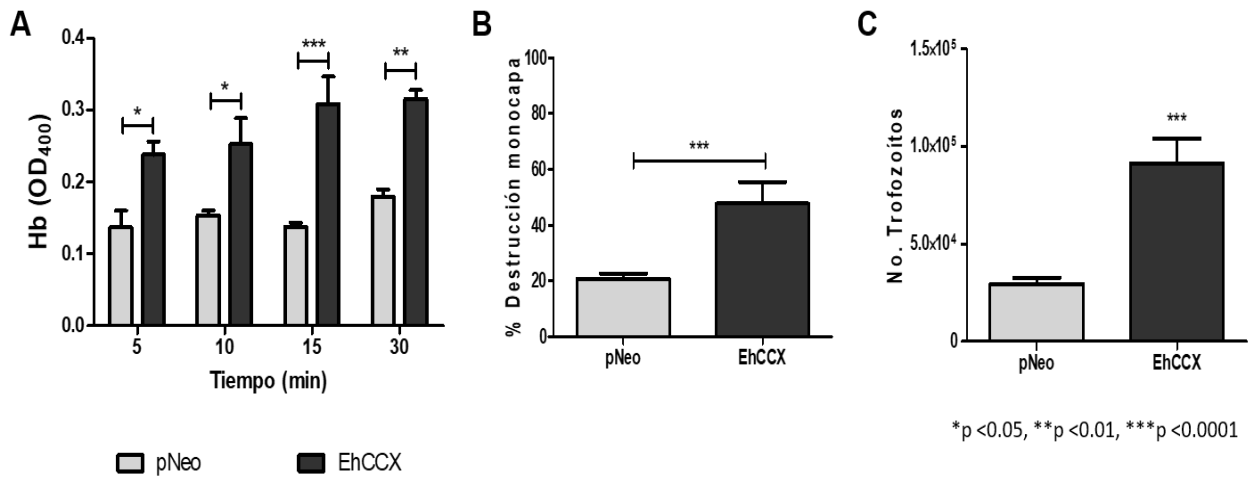
**Figura 19. Sobreexpresión de EhCCX en trofozoítos de *E. histolytica*.** El gen *Ehccx* completo se clonó en el vector pNeo y con la construcción obtenida se transfectaron trofozoítos de *E. histolytica* (células pNeo/EhCCX). Trofozoítos transfectados con el vector vacío fueron usados como control (pNeo). **(A)** Se extrajo RNA de trofozoítos de *E. histolytica* para realizar ensayos de qRT-PCR. El gen codificante de la proteína S2 de la subunidad ribosomal 40S se utilizó como gen normalizador. La expresión relativa fue determinada usando el método  $2^{-\Delta\Delta ct}$ . En la parte superior se muestra la curva Melt que demuestra la especificidad del amplificado del transcrito *Ehccx*. **(B)** Ensayos de Western blot de trofozoítos transfectados usando el anticuerpo  $\alpha$ -EhCCX. Como control interno se utilizó el anticuerpo  $\alpha$ -actina. Las bandas detectadas por el anticuerpo  $\alpha$ -EhCCX se analizaron por densitometría y los datos fueron normalizados con respecto al contenido de actina. La expresión relativa de los trofozoítos con el vector vacío fue tomada arbitrariamente como 1. Los datos fueron expresados con la media  $\pm$  el error estándar de tres experimentos independientes.



\*p < 0.05, \*\*p < 0.01, \*\*\*p < 0.0001

**Figura 20. Calcio citosólico y muerte celular programada en trofozoítos que sobreexpresan EhCCX. (A)** Los niveles de calcio citosólico de trofozoítos transfectados con pNeo y pNeo/EhCCX en condiciones basales se determinó utilizando el sensor de calcio Fluo 4-AM. **(B)** Trofozoítos transfectados con pNeo y pNeo/EhCCX se cargaron con Fluo 4-AM y posteriormente se incubaron con 1 mM de peróxido de hidrogeno. Entonces, la intensidad de fluorescencia se midió cada 40 s. **(C)** Los trofozoítos pNeo/EhCCX y pNeo se incubaron con 1 mM de peróxido de hidrogeno y la viabilidad de los trofozoítos se determinó a diferentes tiempos mediante la técnica de exclusión de azul tripano. Los datos son expresados como la media  $\pm$  el error estándar de tres ensayos independientes realizados por duplicado.





**Figura 21. Efecto de la sobreexpresión de EhCCX en la virulencia *in vitro*.**

**(A)** Eritrofagocitosis. Trofozoítos pNeo y pNeo/EhCCX se incubaron con eritrocitos a 37 °C durante 5, 10, 15 y 30 minutos. Entonces, los eritrocitos no ingeridos se lisaron mediante la incubación por 10 min con ácido acético al 3%, después de varios lavados con PBS, los trofozoítos se lisaron con ácido fórmico y la liberación de hemoglobina de los eritrocitos ingeridos se determinó por la absorbancia a 405 nm. **(B)** Efecto citopático. Monocapas de células MDCK se incubaron con trofozoítos pNeo y pNeo/EhCCX durante 2 h a 37 °C y la destrucción de las monocapas se evaluó como se describe en Materiales y Métodos. **(C)** Migración. Trofozoítos pNeo y pNeo/EhCCX en medio libre de suero se colocaron en la parte superior de la cámara de migración y en la parte inferior de la cámara se colocaron 500 µl de medio completo. Los trofozoítos se incubaron por 3 h a 37 °C y la migración se determinó contando los trofozoítos presentes en la parte inferior de la cámara. Los datos son expresados como la media ± el error estándar de tres experimentos independientes realizados por duplicado.

## 12 DISCUSIÓN

El ion calcio es un segundo mensajero que participa en diferentes vías de señalización que desencadenan diversas funciones celulares (Berridge et al, 2003). Para que la señalización por calcio se realice de manera adecuada, su concentración en el citosol debe ser finamente regulada y para ello las células tienen varias proteínas que funcionan en el transporte del ion al citosol, al espacio extracelular o a otros compartimentos, como el retículo endoplásmico, aparato de Golgi, núcleo, mitocondrias y acidocalcisomas (Berridge et al, 2003; Moreno & Docampo, 2003). Estas proteínas incluyen canales de calcio, ATPasas e intercambiadores, entre otras (Giladi et al, 2016). La concentración citoplásmica de  $\text{Ca}^{2+}$  libre en reposo debe mantenerse en aproximadamente 100 nM y después de la señalización inducida por la entrada masiva de calcio, los niveles del ion deben reestablecerse a esos niveles. La expulsión de  $\text{Ca}^{2+}$  hacia el exterior se realiza principalmente por ATPasas de calcio de la familia PMCA y por los intercambiadores catión/calcio (Berridge et al, 2003). Las PMCA tienen una alta afinidad por calcio, pero bajo transporte; por el contrario, los intercambiadores tienen baja afinidad a calcio, pero alto transporte (Blaustein & Lederer, 1999). En consecuencia, las PMCA participan en el mantenimiento de las concentraciones citosólicas de  $\text{Ca}^{2+}$  en reposo, mientras que los intercambiadores están involucrados en la restauración de la concentración citoplásmica de  $\text{Ca}^{2+}$  después de su incremento durante la señalización (Harper & Sage, 2016).

La superfamilia de intercambiadores catión/calcio transportan  $\text{Ca}^{2+}$  a través de un gradiente electroquímico acoplado al intercambio de diferentes cationes, como  $\text{H}^+$  (familias YRBG y CAX),  $\text{Na}^+$  (familia NCX),  $\text{Na}^+ + \text{K}^+$  (familia NCKX) y  $\text{Na}^+$  o  $\text{Li}^+$  (familia CCX) (Emery et al, 2012; Lytton, 2007). Todos estos intercambiadores comparten estructuras similares, incluyendo dos dominios llamados  $\alpha$ -repetidos, los cuales están involucrados en los eventos de unión y transporte de los iones (Giladi et al, 2016). Las diferencias en los residuos involucrados en la coordinación de los iones son responsables de la divergencia en la selectividad de las diversas familias (Refaeli et al, 2016).

La señalización por calcio también está involucrada en la invasión del huésped por diferentes parásitos protozoarios (Lu et al, 1997; Moreno & Docampo, 2003; Ravdin et al, 1985b). Para los apicomplexa se ha descrito la presencia de varios genes que codifican ATPasas de calcio, uno para el tipo SERCA y varios para el tipo SPCA/PRM1 (Nagamune & Sibley, 2006). Para *T. gondii* se ha descrito una ATPasa del tipo PMCA, la cual se localiza tanto en la membrana plasmática, como en la membrana de acidocalcisomas (Luo et al, 2005; Luo et al, 2001). Por su parte, los trypanosomatidos contienen canales de calcio tipo VGCC y TRP, cuatro genes para ATPasas del tipo PMCA localizados en la membrana plasmática y/o en acidocalcisomas, dos ATPasas del tipo SERCA y un receptor a IP3 localizado en acidocalcisomas (Ramakrishnan & Docampo, 2018). En *T. vaginalis* se ha encontrado que este parásito posee cuatro ATPasas de calcio, una de las cuales corresponde al tipo de SERCA (Meade et al, 1997; Shah et al, 2002), mientras que poco se sabe de las proteínas que participan en el flujo de calcio en *Giardia lamblia*, donde solo se ha reportado que los trofozoítos contienen un compartimento de almacenaje de calcio sensible a taspigargina, sugiriendo la presencia de una ATPasa de calcio del tipo SERCA (Reiner et al, 2003).

Con respecto a la presencia de intercambiadores de calcio en parásitos protozoarios, *T. gondii*, *Cryptosporidium spp.* y *Plasmodium spp.* contienen ortólogos de intercambiadores  $H^+/Ca^{2+}$  (CAX) encontrados en plantas y levaduras, pero no en animales. De manera contraria, los intercambiadores  $Na^+/Ca^{2+}$ , los cuales son más comunes en animales, no se encontraron en estos parásitos (Nagamune & Sibley, 2006). Interesantemente, se ha determinado que la proteína CAX de *P. berghei* participa en el desarrollo y diferenciación del oocineto (Guttery et al, 2013). Por otro lado, evidencias bioquímicas sugieren que los trypanosomatidos tienen un intercambiador  $H^+/Ca^{2+}$  (Vercesi et al, 1994), el cual se propone está involucrado en la liberación de calcio inducido a su vez por el incremento de sodio mediado por un intercambiador  $H^+/Na^+$  (Vercesi & Docampo, 1996). En concordancia, en nuestro análisis *in silico* encontramos un gen que codifica para un posible

intercambiador de  $H^+/Ca^{2+}$  en *Leishmania mexicana*. Nuestro análisis también permitió la identificación de un posible intercambiador de  $H^+/Ca^{2+}$  en *T. vaginalis*; sin embargo, no se ha reportado hasta la fecha la presencia de intercambiadores del tipo  $Na^+/Ca^{2+}$  en parásitos protozoarios.

El ion calcio también tiene un papel importante en la biología de *E. histolytica*. Se ha reportado que bloqueadores de canales de calcio como el bepridil y verapamil inhiben la adhesión la fagocitosis y el efecto citopático (Carbajal et al, 1996; Ravdin et al, 1985a), aunque hasta el momento no se han identificado canales de calcio en el parásito. También se conoce que la señalización por calcio participa en el crecimiento y diferenciación de *E. histolytica* y *E. invadens* (Makioka et al, 2002; Makioka et al, 2001), así como en la transcripción mediada por el factor URE3BP (Gilchrist et al, 2003). A pesar de la importancia del calcio en la biología de *E. histolytica*, poco se conoce acerca de las proteínas que participan en la homeostasis de este ion. En un análisis del genoma de este parásito se buscaron proteínas con dominios de unión a calcio EF-hand (Bhattacharya et al, 2006). Mediante esta estrategia se identificaron 27 proteínas de unión a calcio (CaBPs, por sus siglas en inglés), muchas de ellas con tres o cuatro dominios EF-hand, pero sin ningún otro motivo, sugiriendo que ellas participan como sensores de calcio y algunas al unir el ion pueden sufrir cambios conformacionales para la activación de otras proteínas río abajo de diferentes vías de señalización (Bhattacharya et al, 2006). Interesantemente, una de estas proteínas (CaBP1) se asocia de manera transitoria a bocas fagocíticas, independientemente de su unión a calcio, sugiriendo su participación en este evento relacionado a la patogenicidad del microorganismo (Jain et al, 2008). Por otra parte, nuestro grupo de trabajo identificó al menos cinco ATPasas de calcio, de las cuales tres pertenecen a la familia de las bombas de calcio de membrana plasmática (PMCA) y dos a ATPasas organelares (Martinez-Higuera et al, 2013). Dos de las PMCAs fueron identificadas previamente entre las proteínas de superficie localizadas en la región del uropodo durante la incubación con suero de pacientes con amibiasis (Marquay Markiewicz et al, 2011), sugiriendo su

localización en la membrana plasmática y por lo tanto su participación en el transporte de calcio del citoplasma al medio extracelular. Sin embargo, la otra PMCA no se detectó en la membrana plasmática, sino en vacuolas cercanas a la periferia de los trofozoítos (Ghosh et al, 2000), por lo que su función se desconoce. En un análisis filogenético una ATPasa de calcio de *E. histolytica* se agrupó con bombas del tipo SERCA y ensayos de inmunofluorescencia determinaron su co-localización con el marcador de retículo endoplásmico calreticulina, confirmando que se trata de SERCA (EhSERCA) (Martinez-Higuera et al, 2013). La proteína ortóloga de *E. invadens* (EiSERCA) también se localizó en el retículo endoplásmico e inhibidores específicos de SERCA (tapsigargina y ácido ciclopizónico) afectaron negativamente el proceso de enquistamiento, sugiriendo que el flujo de calcio a través de SERCA participa en este evento de diferenciación en *Entamoeba* spp. (Martinez-Higuera et al, 2015). La otra ATPasa de calcio organelar se agrupó con bombas de la familia SPCA/PRM1 y estudios recientes confirmaron su localización en el aparato de Golgi, soportando la hipótesis de que se trata de una ATPasa del tipo SPCA (EhSPCA) (Rodriguez et al, 2018).

En nuestros estudios de maestría se identificó a un posible intercambiador de calcio en *E. histolytica* (Valle-Solis, 2013). En el presente trabajo encontramos que este intercambiador tiene una alta similitud con miembros de la familia CCX y además contiene los mismos residuos de aminoácidos involucrados en el transporte de calcio, sodio y litio en un miembro de la familia CCX (NCLX de humano), por lo que al intercambiador amibiano lo llamamos EhCCX.

Se sabe que la concentración intracelular de litio es muy baja (0.6- 0.8 mM), por lo que el hallazgo del transporte de este ión por los miembros de NCLX puede no ser fisiológicamente relevante, más bien puede estar relacionado con algunas propiedades funcionales de este tipo de transportadores. Por ejemplo, se conoce que el transporte de  $\text{Ca}^{2+}$  mediado por miembros de la familia NCX es inducido por un gradiente de  $\text{Na}^+$  y un potencial de membrana bajo (aproximadamente -70 mV), mientras que el flujo

de calcio realizado por NCLX está promovido principalmente por un potencial de membrana mucho más pronunciado (aproximadamente -200 mV) (Roy et al, 2017).

Basados en los datos de estudios de entrecruzamiento, se propuso un modelo estructural para los intercambiadores  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ , conformado por 10 dominios transmembranales (Nicoll et al, 1999). En este modelo existe un asa larga de alrededor de 500 aminoácidos entre los segmentos transmembrana 5 y 6 que se localiza en la región citoplásmica, Dicha asa es responsable de la regulación de la actividad del transporte de iones por la unión de varios mensajeros citoplásmicos, como protones, NO, PIP2, fosfoarginina, fosfocreatinina, ATP e inhibidores endógenos (Khananshvili, 2013). En NCLX el tamaño de esta asa es de mucho menor tamaño (163 aa) y no contiene los dominios de unión a esos reguladores. Interesantemente, en EhCCX esa asa también es corta (163 aa), sugiriendo que esta proteína, como los miembros de la familia CCX, no tiene dominios de control para la regulación secundaria en el transporte de iones.

El intercambiador NCXL de humano se localiza en la membrana interior de la mitocondria (Palty et al, 2010), donde realiza la extrusión de calcio de este organelo (Pathak & Trebak, 2018). Se ha sugerido que NCLX se encuentra enriquecido en las mitocondrias de los astrocitos y que es un regulador de la homeostasis del calcio en células excitables maduras, regulando la liberación de glutamato, la proliferación celular y la cicatrización de heridas (Parnis et al, 2013), mientras que la proteína ortóloga en *Caenorhabditis elegans* (NCX-9), también de localización mitocondrial, participa en el desarrollo del circuito neuronal (Sharma et al, 2017). *E. histolytica* es un organismo amitocondriado y nuestros ensayos de inmunolocalización indicaron que EhCCX se encuentra en la membrana plasmática y en vacuolas cercanas a ella. De manera relevante, también se ha detectado a NCLX humana en la membrana plasmática de los miocitos ventriculares y en las células pancreáticas  $\beta$  (Cai & Lytton, 2004; Han et al, 2015). De hecho, se ha reportado que en células pancreáticas  $\beta$ , NCLX de

membrana plasmática está involucrado en el flujo de calcio que contribuye al reclutamiento de vesículas para la exocitosis en respuesta a la despolarización repetitiva (Han et al, 2015). De igual manera, el EhCCX localizado en la superficie de los trofozoítos puede participar en el flujo de calcio a través de la membrana plasmática. Esta hipótesis es respaldada por el incremento de su expresión en los trofozoítos expuestos a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y por la mayor extrusión de calcio citosólico en trofozoítos que sobreexpresan EhCCX durante la incubación con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y que retarda la muerte celular de lo trofozoítos.

Por otro lado, nuestros resultados indican que EhCCX puede participar en la virulencia de la amiba. esta hipótesis es respaldada por: 1) los niveles de expresión de esta proteína son mayores en la amiba patógena *E. histolytica* que en la amiba no patógena *E. dispar*; 2) EhCCX se relocaliza durante la fagocitosis; y 3) la sobreexpresión de EhCCX aumenta las propiedades de virulencia *in vitro* en los trofozoítos, tales como la fagocitosis, la destrucción de monocapas de células de mamífero y la migración.

En estudios realizados en ratones transgénicos se ha reportado que la sobreexpresión de NCX incrementa la frecuencia cardiaca mediada por beta-adrenérgicos (Kaese et al, 2017) y aumenta la relajación de fondo gástrico (Fujimoto et al, 2016). Similarmente, la sobreexpresión de EhCCX aumentó la virulencia *in vitro* de los trofozoítos de *E. histolytica*. Nosotros hipotetizamos que, dado que los intercambiadores catión/Ca<sup>2+</sup> pueden revertir el transporte de iones bajo ciertas condiciones (Harper & Sage, 2016), los diferentes estímulos involucrados en la virulencia de *E. histolytica* podrían incrementar la entrada al citosol de Ca<sup>2+</sup> vía EhCCX, extendiendo el periodo de niveles altos del ion en el citoplasma, manteniendo la respuesta a la señal. Esta sugerencia se basa en el hecho de que se ha demostrado que el mecanismo de entrada de Ca<sup>2+</sup> vía NCX es responsable del aumento en la actividad contráctil del musculo liso de la vejiga urinaria de ratones transgénicos que sobreexpresan NCX 1.3 (Yamamura et al, 2013).

### **13 CONCLUSIÓN**

En este trabajo identificamos un intercambiador catión/calcio en *E. histolytica* que pertenece a la familia CCX (EhCCX), que se localiza principalmente en la membrana plasmática de los trofozoítos y que participa en la virulencia *in vitro*.

### **14 PERSPECTIVAS**

- 1) Analizar la participación de EhCCX en la virulencia *in vivo*.
- 2) Identificar las proteínas que interaccionan con EhCCX.
- 3) Analizar los mecanismos de la relocalización de EhCCX durante la fagocitosis.
- 4) Investigar las propiedades electrofisiológicas de EhCCX.



## 15 BIBLIOGRAFÍA

Ankri S, Stolarsky T, Mirelman D (1998) Antisense inhibition of expression of cysteine proteinases does not affect *Entamoeba histolytica* cytopathic or haemolytic activity but inhibits phagocytosis. *Molecular microbiology* **28**: 777-785

Arroyo R, Orozco E (1987) Localization and identification of an *Entamoeba histolytica* adhesin. *Molecular and biochemical parasitology* **23**: 151-158

Bailey G (1992) Preliminary studies of chemotaxis by *Entamoeba*. **13**: 265-271

Barron M, Serrano G, Treviño L, Verduzco J, Morales M, Mata B (2008) Inhibición del crecimiento axénico in vitro de *Entamoeba histolytica* por acción de probióticos. *Ciencia UANL* **11**

Benaim G (2004) La Ca<sup>2+</sup>-ATPasa de la membrana plasmática como enzima clave en la homeostasis intracelular del calcio. . *Acta Científica Venezolana* **55**

Berridge MJ, Bootman MD, Roderick HL (2003) Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling. *Nature reviews Molecular cell biology* **4**: 517-529

Betanzos A, Javier-Reyna R, Garcia-Rivera G, Banuelos C, Gonzalez-Mariscal L, Schnoor M, Orozco E (2013) The EhCPADH112 complex of *Entamoeba histolytica* interacts with tight junction proteins occludin and claudin-1 to produce epithelial damage. *PloS one* **8**: e65100

Bhattacharya A, Padhan N, Jain R, Bhattacharya S (2006) Calcium-binding proteins of *Entamoeba histolytica*. *Archives of medical research* **37**: 221-225

Blaustein MP, Lederer WJ (1999) Sodium/calcium exchange: its physiological implications. *Physiological reviews* **79**: 763-854

Blessmann J, Van Linh P, Nu PA, Thi HD, Muller-Myhsok B, Buss H, Tannich E (2002) Epidemiology of amebiasis in a region of high incidence of amebic liver abscess in central Vietnam. *The American journal of tropical medicine and hygiene* **66**: 578-583

Boettner DR, Petri WA (2005) Entamoeba histolytica activates host cell caspases during contact-dependent cell killing. *Curr Top Microbiol Immunol* **289**: 175-184

Bolanos J, Betanzos A, Javier-Reyna R, Garcia-Rivera G, Huerta M, Pais-Morales J, Gonzalez-Robles A, Rodriguez MA, Schnoor M, Orozco E (2016) EhNPC1 and EhNPC2 Proteins Participate in Trafficking of Exogenous Cholesterol in Entamoeba histolytica Trophozoites: Relevance for Phagocytosis. *PLoS pathogens* **12**: e1006089

Botero D, Restrepo M (1998) Parasitosis humanas. **40**: 27-28

Braga LL, Ninomiya H, McCoy JJ, Eacker S, Wiedmer T, Pham C, Wood S, Sims PJ, Petri WA, Jr. (1992) Inhibition of the complement membrane attack complex by the galactose-specific adhesion of Entamoeba histolytica. *The Journal of clinical investigation* **90**: 1131-1137

Brini M, Carafoli E (2009) Calcium Pumps in Health and Disease. *Physiol Rev* **89**: 1341-1378

Brini M, Carafoli E (2011) The plasma membrane Ca<sup>2+</sup> ATPase and the plasma membrane sodium calcium exchanger cooperate in the regulation of cell calcium. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **3**

Cai XJ, Lytton J (2004) Molecular cloning of a sixth member of the K<sup>+</sup>-dependent Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchanger gene family, NCKX6. *Journal of Biological Chemistry* **279**: 5867-5876

Cao YQ (2006) Voltage-gated calcium channels and pain. *Pain* **126**: 5-9

Carbajal ME, Manning-Cela R, Pina A, Franco E, Meza I (1996) Fibronectin-induced intracellular calcium rise in *Entamoeba histolytica* trophozoites: effect on adhesion and the actin cytoskeleton. *Experimental parasitology* **82**: 11-20

Catterall WA (2000) Structure and regulation of voltage-gated Ca<sup>2+</sup> channels. *Annu Rev Cell Dev Biol* **16**: 521-555

Clapham DE (2007) Calcium signaling. *Cell* **131**: 1047-1058

Chakrabarty P, Sethi DK, Padhan N, Kaur KJ, Salunke DM, Bhattacharya S, Bhattacharya A (2004) Identification and characterization of EhCaBP2. A second member of the calcium-binding protein family of the protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. *The Journal of biological chemistry* **279**: 12898-12908

Choudhuri G, Rangan M (2012) Amebic infection in humans. *Indian journal of gastroenterology : official journal of the Indian Society of Gastroenterology* **31**: 153-162

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

Derler I, Fahrner M, Muik M, Lackner B, Schindl R, Groschner K, Romanin C (2009) A Ca<sup>2+</sup> release-activated Ca<sup>2+</sup> (CRAC) modulatory domain (CMD) within STIM1 mediates fast Ca<sup>2+</sup>-dependent inactivation of ORAI1 channels. *The Journal of biological chemistry* **284**: 24933-24938

Diamond LS, Clark CG, Cunnick CC (1995) YI-S, a casein-free medium for axenic cultivation of *Entamoeba histolytica*, related *Entamoeba*, *Giardia intestinalis* and *Trichomonas vaginalis*. *The Journal of eukaryotic microbiology* **42**: 277-278

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

Eckstein-Ludwig U, Webb RJ, Van Goethem ID, East JM, Lee AG, Kimura M, O'Neill PM, Bray PG, Ward SA, Krishna S (2003) Artemisinins target the SERCA of *Plasmodium falciparum*. *Nature* **424**: 957-961

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

Emery L, Whelan S, Hirschi KD, Pittman JK (2012) Protein phylogenetic analysis of Ca<sup>2+</sup>/cation antiporters and insights into their evolution in plants. *Frontiers in plant science* **3**

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

Feranchak AP (2003) Ion channels in digestive health and disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* **37**: 230-241

Fill M, Copello JA (2002) Ryanodine receptor calcium release channels. *Physiological reviews* **82**: 893-922

Flores-Soto E, Reyes-Garcia J, Sommer B, Chavez J, Barajas-Lopez C, Montano LM (2012) PPADS, a P2X receptor antagonist, as a novel inhibitor of the reverse mode of the Na(+)/Ca(2)(+) exchanger in guinea pig airway smooth muscle. *Eur J Pharmacol* **674**: 439-444

Frischauf I, Schindl R, Derler I, Bergsmann J, Fahrner M, Romanin C (2008) The STIM/Orai coupling machinery. *Channels (Austin)* **2**: 261-268

Fujimoto Y, Hayashi S, Azuma YT, Mukai K, Nishiyama K, Kita S, Morioka A, Nakajima H, Iwamoto T, Takeuchi T (2016) Overexpression of Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchanger 1 display enhanced relaxation in the gastric fundus. *J Pharmacol Sci* **132**: 181-186

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 SK, Field J, Frisardi M, Rosenthal B, Mai Z, Rogers R, Samuelson J (1999) Chitinase secretion by encysting Entamoeba invadens and transfected Entamoeba histolytica trophozoites: localization of secretory vesicles, endoplasmic reticulum, and Golgi apparatus. *Infection and immunity* **67**: 3073-3081

Ghosh SK, Rosenthal B, Rogers R, Samuelson J (2000) Vacuolar localization of an *Entamoeba histolytica* homologue of the plasma membrane ATPase (PMCA). *Molecular and biochemical parasitology* **108**: 125-130

Giladi M, Shor R, Lisnyansky M, Khananshvili D (2016) Structure-Functional Basis of Ion Transport in Sodium-Calcium Exchanger (NCX) Proteins. *International journal of molecular sciences* **17**

Gilchrist CA, Leo M, Line CG, Mann BJ, Petri WA, Jr. (2003) Calcium modulates promoter occupancy by the *Entamoeba histolytica* Ca<sup>2+</sup>-binding transcription factor URE3-BP. *The Journal of biological chemistry* **278**: 4646-4653

Gillespie S, Pearson R (2001) Principles and practice of clinical parasitology. 197-199

Godbold GD, Mann BJ (1998) Involvement of the actin cytoskeleton and p21rho-family GTPases in the pathogenesis of the human protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. *Braz J Med Biol Res* **31**: 1049-1058

Gómez J, Cortés J, Cuervo S, López M (2007) Amibiasis intestinal. **11**: 36-45

Guillen N, Boquet P, Sansonetti P (1998) The small GTP-binding protein RacG regulates uroid formation in the protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. *Journal of cell science* **111 ( Pt 12)**: 1729-1739

Guttery DS, Pittman JK, Frenal K, Poulin B, McFarlane LR, Slavic K, Wheatley SP, Soldati-Favre D, Krishna S, Tewari R, Staines HM (2013) The *Plasmodium berghei* Ca<sup>(2+)</sup>/H<sup>(+)</sup> exchanger, PbCAX, is essential for tolerance to environmental Ca<sup>(2+)</sup> during sexual development. *PLoS pathogens* **9**: e1003191

Hamann L, Nickel R, Tannich E (1995) Transfection and continuous expression of heterologous genes in the protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **92**: 8975-8979

Han YE, Ryu SY, Park SH, Lee KH, Lee SH, Ho WK (2015) Ca<sup>2+</sup> clearance by plasmalemmal NCLX, Li<sup>+</sup>-permeable Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchanger, is required for the sustained exocytosis in rat insulinoma INS-1 cells. *Pflug Arch Eur J Phy* **467**: 2461-2472

Harper AG, Sage SO (2016) TRP-Na<sup>(+)</sup>/Ca<sup>(2+)</sup> Exchanger Coupling. *Adv Exp Med Biol* **898**: 67-85

Huston C (2004) Parasite and host contribution to the pathogenesis of amebic colitis. *Trends in parasitology* **20**

Huston CD, Houpt ER, Mann BJ, Hahn CS, Petri WA, Jr. (2000) Caspase 3-dependent killing of host cells by the parasite *Entamoeba histolytica*. *Cellular microbiology* **2**: 617-625

Iwamoto T (2004) Forefront of Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchanger studies: molecular pharmacology of Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchange inhibitors. *J Pharmacol Sci* **96**: 27-32

Iwamoto T, Inoue Y, Ito K, Sakaue T, Kita S, Katsuragi T (2004) The exchanger inhibitory peptide region-dependent inhibition of Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchange by SN-6 [2-[4-(4-nitrobenzyloxy)benzyl]thiazolidine-4-carboxylic acid ethyl ester], a novel benzyloxyphenyl derivative. *Mol Pharmacol* **66**: 45-55

Jain R, Santi-Rocca J, Padhan N, Bhattacharya S, Guillen N, Bhattacharya A (2008) Calcium-binding protein 1 of *Entamoeba histolytica* transiently

associates with phagocytic cups in a calcium-independent manner. *Cellular microbiology* **10**: 1373-1389

Jentsch TJ, Hubner CA, Fuhrmann JC (2004) Ion channels: function unravelled by dysfunction. *Nature cell biology* **6**: 1039-1047

Kaese S, Bogeholz N, Pauls P, Dechering D, Olligs J, Kolker K, Badawi S, Frommeyer G, Pott C, Eckardt L (2017) Increased sodium/calcium exchanger activity enhances beta-adrenergic-mediated increase in heart rate: Whole-heart study in a homozygous sodium/calcium exchanger overexpressor mouse model. *Heart Rhythm* **14**: 1247-1253

Kang KJ, Kinjo TG, Szerencsei RT, Schnetkamp PP (2005) Residues contributing to the Ca<sup>2+</sup> and K<sup>+</sup> binding pocket of the NCKX2 Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup>-K<sup>+</sup> exchanger. *The Journal of biological chemistry* **280**: 6823-6833

Khananshvilii D (2013) The SLC8 gene family of sodium-calcium exchangers (NCX) - Structure, function, and regulation in health and disease. *Mol Aspects Med* **34**: 220-235

Kretschmer R (1994) Amibiasis infección y enfermedad por Entamoeba histolytica. **48**: 66-74

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

Lanner JT, Georgiou DK, Joshi AD, Hamilton SL (2010) Ryanodine receptors: structure, expression, molecular details, and function in calcium release. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **2**: a003996



Leippe M, Andra J, Nickel R, Tannich E, Muller-Eberhard HJ (1994) Amoebapores, a family of membranolytic peptides from cytoplasmic granules of *Entamoeba histolytica*: isolation, primary structure, and pore formation in bacterial cytoplasmic membranes. *Molecular microbiology* **14**: 895-904

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

Lu HG, Zhong L, Chang KP, Docampo R (1997) Intracellular Ca<sup>2+</sup> pool content and signaling and expression of a calcium pump are linked to virulence in *Leishmania mexicana amazonensis* amastigotes. *The Journal of biological chemistry* **272**: 9464-9473

Luo S, Ruiz FA, Moreno SN (2005) The acidocalcisome Ca<sup>2+</sup>-ATPase (TgA1) of *Toxoplasma gondii* is required for polyphosphate storage, intracellular calcium homeostasis and virulence. *Molecular microbiology* **55**: 1034-1045

Luo S, Vieira M, Graves J, Zhong L, Moreno SN (2001) A plasma membrane-type Ca(2+)-ATPase co-localizes with a vacuolar H(+)-pyrophosphatase to acidocalcisomes of *Toxoplasma gondii*. *The EMBO journal* **20**: 55-64

Lytton J (2007) Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchangers: three mammalian gene families control Ca<sup>2+</sup> transport. *The Biochemical journal* **406**: 365-382

Makioka A, Kumagai M, Kobayashi S, Takeuchi T (2002) Possible role of calcium ions, calcium channels and calmodulin in excystation and metacystic development of *Entamoeba invadens*. *Parasitology research* **88**: 837-843

Makioka A, Kumagai M, Ohtomo H, Kobayashi S, Takeuchi T (2001) Effect of calcium antagonists, calcium channel blockers and calmodulin inhibitors on the growth and encystation of *Entamoeba histolytica* and *E. invadens*. *Parasitology research* **87**: 833-837

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

Marion S, Guillen N (2006) Genomic and proteomic approaches highlight phagocytosis of living and apoptotic human cells by the parasite *Entamoeba histolytica*. *International journal for parasitology* **36**: 131-139

Marquay Markiewicz J, Syan S, Hon CC, Weber C, Faust D, Guillen N (2011) A proteomic and cellular analysis of uropods in the pathogen *Entamoeba histolytica*. *PLoS neglected tropical diseases* **5**: e1002

Martinez-Higuera A, Herrera-Martinez M, Chavez-Munguia B, Valle-Solis M, Muniz-Lino MA, Cazares-Apatiga J, Rodriguez MA (2015) *Entamoeba invadens*: Identification of a SERCA protein and effect of SERCA inhibitors on encystation. *Microbial pathogenesis* **89**: 18-26

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

Martinez-Lopez C, Orozco E, Sanchez T, Garcia-Perez RM, Hernandez-Hernandez F, Rodriguez MA (2004) The EhADH112 recombinant polypeptide inhibits cell destruction and liver abscess formation by *Entamoeba histolytica* trophozoites. *Cellular microbiology* **6**: 367-376

Martinez-Palomo A (1986) Biology of *Entamoeba histolytica* Amebiasis 12-43

Martinez Palomo A (1987) Las amibas, enemigos invisibles.

Matsuda T, Arakawa N, Takuma K, Kishida Y, Kawasaki Y, Sakaue M, Takahashi K, Takahashi T, Suzuki T, Ota T, Hamano-Takahashi A, Onishi M, Tanaka Y, Kameo K, Baba A (2001) SEA0400, a novel and selective inhibitor of the Na<sup>+</sup>-Ca<sup>2+</sup> exchanger, attenuates reperfusion injury in the in vitro and in vivo cerebral ischemic models. *J Pharmacol Exp Ther* **298**: 249-256

McGugan GC, Jr., Temesvari LA (2003) Characterization of a Rab11-like GTPase, EhRab11, of *Entamoeba histolytica*. *Molecular and biochemical parasitology* **129**: 137-146

Meade JC, Li C, Moate ME, Davis-Hayman SR, Lushbaugh WB, Finley RW (1997) Molecular characterization of a sarcoplasmic-endoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> ATPase gene from *Trichomonas vaginalis*. *The Journal of eukaryotic microbiology* **44**: 480-486

Meza I, Cazares F, Rosales-Encina JL, Talamas-Rohana P, Rojkind M (1987) Use of antibodies to characterize a 220-kilodalton surface protein from *Entamoeba histolytica*. *The Journal of infectious diseases* **156**: 798-805

Meza I, Torre-Guerrero H, Meraz M (1990) Molecular organization of *Entamoeba histolytica*.

Mikoshiha K (2007) IP3 receptor/Ca<sup>2+</sup> channel: from discovery to new signaling concepts. *J Neurochem* **102**: 1426-1446

Mitchell KJ, Tsuboi T, Rutter GA (2004) Role for plasma membrane-related Ca<sup>2+</sup>-ATPase-1 (ATP2C1) in pancreatic beta-cell Ca<sup>2+</sup> homeostasis revealed by RNA silencing. *Diabetes* **53**: 393-400

Moreno SN, Docampo R (2003) Calcium regulation in protozoan parasites. *Curr Opin Microbiol* **6**: 359-364

Mortimer L, Chadee K (2010) The immunopathogenesis of *Entamoeba histolytica*. *Experimental parasitology* **126**: 366-380

Nagamune K, Beatty WL, Sibley LD (2007) Artemisinin induces calcium-dependent protein secretion in the protozoan parasite *Toxoplasma gondii*. *Eukaryotic cell* **6**: 2147-2156

Nagamune K, Moreno SN, Chini EN, Sibley LD (2008) Calcium regulation and signaling in apicomplexan parasites. *Subcell Biochem* **47**: 70-81

Nagamune K, Sibley LD (2006) Comparative genomic and phylogenetic analyses of calcium ATPases and calcium-regulated proteins in the apicomplexa. *Molecular biology and evolution* **23**: 1613-1627

Nicoll DA, Ottolia M, Lu LY, Lu YJ, Philipson KD (1999) A new topological model of the cardiac sarcolemmal Na<sup>+</sup>-Ca<sup>2+</sup> exchanger. *Journal of Biological Chemistry* **274**: 910-917

Ocadiz-Ruiz R, Fonseca W, Martinez MB, Ocadiz-Quintanar R, Orozco E, Rodriguez MA (2013) Effect of the silencing of the Ehcp112 gene on the in vitro virulence of *Entamoeba histolytica*. *Parasites & vectors* **6**: 248

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

On C, Marshall CR, Chen N, Moyes CD, Tibbits GF (2008) Gene structure evolution of the Na<sup>+</sup>-Ca<sup>2+</sup> exchanger (NCX) family. *BMC Evol Biol* **8**: 127

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

Palty R, Silverman WF, Hershfinkel M, Caporale T, Sensi SL, Parnis J, Nolte C, Fishman D, Shoshan-Barmatz V, Herrmann S, Khananshvili D, Sekler I (2010) NCLX is an essential component of mitochondrial Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchange. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **107**: 436-441

Parekh AB, Putney JW (2005) Store-operated calcium channels. *Physiol Rev* **85**: 757-810

Parnis J, Montana V, Delgado-Martinez I, Matyash V, Parpura V, Kettenmann H, Sekler I, Nolte C (2013) Mitochondrial exchanger NCLX plays a major role

in the intracellular Ca<sup>2+</sup> signaling, gliotransmission, and proliferation of astrocytes. *J Neurosci* **33**: 7206-7219

Pathak T, Trebak M (2018) Mitochondrial Ca(2+) signaling. *Pharmacol Ther*

Pertuz Belloso S, Ostoa Saloma P, Benitez I, Soldevila G, Olivos A, Garcia-Zepeda E (2004) Entamoeba histolytica cysteine protease 2 (EhCP2) modulates leucocyte migration by proteolytic cleavage of chemokines. *Parasite Immunol* **26**: 237-241

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

Petri WA, Snodgrass TL, Chadee K, Chapman MD (1989) Monoclonal Antibodies Directed against the Galactose-Inhibitable Adherence Lectin of Entamoeba-Histolytica Inhibit and Enhance Amebic Adherence. *Clin Res* **37**: A437-A437

Pritt BS, Clark CG (2008) Amebiasis. *Mayo Clin Proc* **83**: 1154-1160

Que X, Brinen LS, Perkins P, Herdman S, Hirata K, Torian BE, Rubin H, McKerrow JH, Reed SL (2002) Cysteine proteinases from distinct cellular compartments are recruited to phagocytic vesicles by Entamoeba histolytica. *Molecular and biochemical parasitology* **119**: 23-32

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

Raha S, Dalal B, Biswas S, Biswas BB (1994) Myo-inositol trisphosphate-mediated calcium release from internal stores of *Entamoeba histolytica*. *Molecular and biochemical parasitology* **65**: 63-71

Raha S, Giri B, Bhattacharyya B, Biswas BB (1995) Inositol(1,3,4,5) tetrakisphosphate plays an important role in calcium mobilization from *Entamoeba histolytica*. *FEBS letters* **362**: 316-318

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

Ramakrishnan S, Docampo R (2018) Membrane Proteins in Trypanosomatids Involved in Ca<sup>2+</sup> Homeostasis and Signaling. *Genes (Basel)* **9**

Ramsey IS, Delling M, Clapham DE (2006) An introduction to TRP channels. *Annu Rev Physiol* **68**: 619-647

Ravdin J, Murphy C, Schlesinger P (1988a) The cellular regulation of vesicle exocytosis by *Entamoeba histolytica*. *Journal of Protozoology* **35**: 159-163

Ravdin JI, Croft BY, Guerrant RL (1980) Cytopathogenic mechanisms of *Entamoeba histolytica*. *The Journal of experimental medicine* **152**: 377-390

Ravdin JI, Guerrant RL (1980) Mechanisms of *E-Histolytica* Cytopathogenicity. *Clin Res* **28**: A514-A514

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

Ravdin JI, Guerrant RL, Sperelakis N (1985a) *Entamoeba histolytica*: impedance measurements and cytotoxicity in the presence of bepridil, verapamil, and cytochalasin D. *Experimental parasitology* **60**: 63-72

Ravdin JI, Moreau F, Sullivan JA, Petri WA, Jr., Mandell GL (1988b) Relationship of free intracellular calcium to the cytolytic activity of *Entamoeba histolytica*. *Infection and immunity* **56**: 1505-1512

Ravdin JI, Murphy CF, Guerrant RL, Long-Krug SA (1985b) Effect of antagonists of calcium and phospholipase A on the cytopathogenicity of *Entamoeba histolytica*. *The Journal of infectious diseases* **152**: 542-549

Ravdin JI, Sperelakis N, Guerrant RL (1982) Effect of ion channel inhibitors on the cytopathogenicity of *Entamoeba histolytica*. *The Journal of infectious diseases* **146**: 335-340

Refaeli B, Giladi M, Hiller R, Khananshvil D (2016) Structure-Based Engineering of Lithium-Transport Capacity in an Archaeal Sodium-Calcium Exchanger. *Biochemistry* **55**: 1673-1676

Reiner DS, Hetsko ML, Meszaros JG, Sun CH, Morrison HG, Brunton LL, Gillin FD (2003) Calcium signaling in excystation of the early diverging eukaryote, *Giardia lamblia*. *The Journal of biological chemistry* **278**: 2533-2540

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, Hernandez F, Santos L, Valdez A, Orozco E (1989) Entamoeba histolytica: molecules involved in the target cell-parasite relationship. *Molecular and biochemical parasitology* **37**: 87-99

Rodriguez MA, Martinez-Higuera A, Valle-Solis MI, Hernandez-Alejandro M, Chavez-Munguia B, Figueroa-Gutierrez AH, Salas-Casas A (2018) A putative calcium-ATPase of the secretory pathway family may regulate calcium/manganese levels in the Golgi apparatus of Entamoeba histolytica. *Parasitology research* **117**: 3381-3389

Rotmann A, Sanchez C, Guiguemde A, Rohrbach P, Dave A, Bakouh N, Planelles G, Lanzer M (2010) PfCHA is a mitochondrial divalent cation/H<sup>+</sup> antiporter in Plasmodium falciparum. *Molecular microbiology* **76**: 1591-1606

Roy S, Dey K, Hershinkel M, Ohana E, Sekler I (2017) Identification of residues that control Li<sup>+</sup> versus Na<sup>+</sup> dependent Ca<sup>2+</sup> exchange at the transport site of the mitochondrial NCLX. *Bba-Mol Cell Res* **1864**: 997-1008

Rudolph HK, Antebi A, Fink GR, Buckley CM, Dorman TE, LeVitre J, Davidow LS, Mao JI, Moir DT (1989) The yeast secretory pathway is perturbed by mutations in PMR1, a member of a Ca<sup>2+</sup> ATPase family. *Cell* **58**: 133-145

Sahoo N, Labruyere E, Bhattacharya S, Sen P, Guillen N, Bhattacharya A (2004) Calcium binding protein 1 of the protozoan parasite Entamoeba histolytica interacts with actin and is involved in cytoskeleton dynamics. *Journal of cell science* **117**: 3625-3634

Saito-Nakano Y, Nakazawa M, Shigeta Y, Takeuchi T, Nozaki T (2001) Identification and characterization of genes encoding novel Rab proteins from *Entamoeba histolytica*. *Molecular and biochemical parasitology* **116**: 219-222

Salas-Casas A, Ponce-Balderas A, Garcia-Perez RM, Cortes-Reynosa P, Gamba G, Orozco E, Rodriguez MA (2006) Identification and functional characterization of EhCIC-A, an *Entamoeba histolytica* CIC chloride channel located at plasma membrane. *Molecular microbiology* **59**: 1249-1261

Sehgal D, Bhattacharya A, Bhattacharya S (1996) Pathogenesis of infection by *Entamoeba histolytica*. *Journal of biosciences* **21**: 423-432

Seydel KB, Stanley SL, Jr. (1998) *Entamoeba histolytica* induces host cell death in amebic liver abscess by a non-Fas-dependent, non-tumor necrosis factor alpha-dependent pathway of apoptosis. *Infection and immunity* **66**: 2980-2983

Shah PH, Stiles JK, Finley RW, Lushbaugh WB, Meade JC (2002) *Trichomonas vaginalis*: characterization of a family of P-type ATPase genes. *Parasitology international* **51**: 41-51

Sharma V, O'Halloran DM (2014) Recent structural and functional insights into the family of sodium calcium exchangers. *Genesis* **52**: 93-109

Sharma V, Roy S, Sekler I, O'Halloran DM (2017) The NCLX-type Na(+)/Ca(2+) Exchanger NCX-9 Is Required for Patterning of Neural Circuits in *Caenorhabditis elegans*. *The Journal of biological chemistry* **292**: 5364-5377

Stanley SL, Jr., Becker A, Kunz-Jenkins C, Foster L, Li E (1990) Cloning and expression of a membrane antigen of *Entamoeba histolytica* possessing

multiple tandem repeats. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **87**: 4976-4980

Stanley SL, Jr., Zhang T, Rubin D, Li E (1995) Role of the *Entamoeba histolytica* cysteine proteinase in amebic liver abscess formation in severe combined immunodeficient mice. *Infection and immunity* **63**: 1587-1590

Strehler EE, Caride AJ, Filoteo AG, Xiong Y, Penniston JT, Enyedi A (2007) Plasma membrane Ca<sup>2+</sup> ATPases as dynamic regulators of cellular calcium handling. *Ann N Y Acad Sci* **1099**: 226-236

Suresh K, György H (2007) IP<sub>3</sub> receptors in cell survival and apoptosis: Ca<sup>2+</sup> release and beyond. *Apoptosis : an international journal on programmed cell death* **12**: 951-968

Szlufcik K, Missiaen L, Parys JB, Callewaert G, De Smedt H (2006) Uncoupled IP<sub>3</sub> receptor can function as a Ca<sup>2+</sup>-leak channel: cell biological and pathological consequences. *Biol Cell* **98**: 1-14

Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S (2011) MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular biology and evolution* **28**: 2731-2739

Teixeira JE, Huston CD (2008) Evidence of a continuous endoplasmic reticulum in the protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. *Eukaryotic cell* **7**: 1222-1226

Temesvari LA, Harris EN, Stanley SL, Jr., Cardelli JA (1999) Early and late endosomal compartments of *Entamoeba histolytica* are enriched in cysteine

proteases, acid phosphatase and several Ras-related Rab GTPases. *Molecular and biochemical parasitology* **103**: 225-241

Trejos-Suárez J, Castaño-Osorio JC (2009) Virulence Factors of the enteric protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. **13**: 100-110

Valle-Solis M (2013) Tesis Maestría.

Vanoevelen J, Dode L, Van Baelen K, Fairclough RJ, Missiaen L, Raeymaekers L, Wuytack F (2005) The secretory pathway  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mn}^{2+}$ -ATPase 2 is a Golgi-localized pump with high affinity for  $\text{Ca}^{2+}$  ions. *The Journal of biological chemistry* **280**: 22800-22808

Vercesi AE, Docampo R (1996) Sodium-proton exchange stimulates  $\text{Ca}^{2+}$  release from acidocalcisomes of *Trypanosoma brucei*. *The Biochemical journal* **315 ( Pt 1)**: 265-270

Vercesi AE, Moreno SNJ, Docampo R (1994)  $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$  Exchange in Acidic Vacuoles of *Trypanosoma-Brucei*. *Biochemical Journal* **304**: 227-233

Voigt H, Olivo JC, Sansonetti P, Guillen N (1999) Myosin IB from *Entamoeba histolytica* is involved in phagocytosis of human erythrocytes. *Journal of cell science* **112 ( Pt 8)**: 1191-1201

Welter BH, Laughlin RC, Temesvari LA (2002) Characterization of a Rab7-like GTPase, EhRab7: a marker for the early stages of endocytosis in *Entamoeba histolytica*. *Molecular and biochemical parasitology* **121**: 254-264

Wuytack F, Raeymaekers L, Missiaen L (2002) Molecular physiology of the SERCA and SPCA pumps. *Cell Calcium* **32**: 279-305

Ximenez C, Morán P, Ramos F, Ramiro M (2007) Amibiais intestinal: estado actual del conocimiento. **23**: 398-407

Ximenez C, Moran P, Rojas L, Valadez A, Gomez A, Ramiro M, Cerritos R, Gonzalez E, Hernandez E, Oswaldo P (2011) Novelties on amoebiasis: a neglected tropical disease. *Journal of global infectious diseases* **3**: 166-174

Yamamura H, Cole WC, Kita S, Hotta S, Murata H, Suzuki Y, Ohya S, Iwamoto T, Imaizumi Y (2013) Overactive bladder mediated by accelerated Ca<sup>2+</sup> influx mode of Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchanger in smooth muscle. *Am J Physiol-Cell Ph* **305**: C299-C308

Yan L, Stanley SL, Jr. (2001) Blockade of caspases inhibits amebic liver abscess formation in a mouse model of disease. *Infection and immunity* **69**: 7911-7914

Zalk R, Lehnart SE, Marks AR (2007) Modulation of the ryanodine receptor and intracellular calcium. *Annu Rev Biochem* **76**: 367-385

Zhu G, Keithly JS (1997) Molecular analysis of a P-type ATPase from *Cryptosporidium parvum*. *Molecular and biochemical parasitology* **90**: 307-316

Zlobl TL (2001) Amebiasis. *Prim Care Update Ob Gyns* **8**: 65-68

# SCIENTIFIC REPORTS

## OPEN Membrane Trafficking Modulation during *Entamoeba* Encystation

Emily Herman<sup>1</sup>, Maria A. Siegesmund<sup>2</sup>, Michael J. Bottery<sup>3</sup>, Ronny van Aarle<sup>3,4</sup>, Maulood Mohammed Shather<sup>5,6</sup>, Elizabet Caler<sup>5,6</sup>, Joel B. Decks<sup>1</sup> & Mark van der Giezen<sup>3,7</sup>

Received: 4 November 2016  
Accepted: 11 September 2017  
Published online: 09 October 2017

*Entamoeba histolytica* is an intestinal parasite that infects 50–100 million people and causes up to 55,000 deaths annually. The transmissible form of *E. histolytica* is the cyst, with a single infected individual passing up to 45 million cysts per day, making cyst production an attractive target for infection control. Lectins and chitin are secreted to form the cyst wall, although little is known about the underlying membrane trafficking processes supporting encystation. As *E. histolytica* does not readily form cysts *in vitro*, we assessed membrane trafficking gene expression during encystation in the closely related model *Entamoeba invadens*. Genes involved in secretion are up-regulated during cyst formation, as are some trans-Golgi network-to-endosome trafficking genes. Furthermore, endocytic and general trafficking genes are up-regulated in the mature cyst, potentially preserved as mRNA in preparation for excystation. Two divergent dynamin-related proteins found in *Entamoeba* are predominantly expressed during cyst formation. Phylogenetic analyses indicate that they are paralogous to, but quite distinct from, classical dynamins found in human, suggesting that they may be potential drug targets to block encystation. The membrane-trafficking machinery is clearly regulated during encystation, providing an additional facet to understanding this crucial parasitic process.

*Entamoeba histolytica* is one of the most common causes of death due to parasites in the world<sup>1</sup>. It is thought to infect 50–100 million people each year of whom 55,500 succumb due to dysentery, amoebic colitis and invasive disease such as amoebic liver abscess<sup>2,3</sup>. Although a global pathogen, it is a major issue in tropical areas within the Indian subcontinent, Africa and South and Central America<sup>4</sup>. The majority of *E. histolytica* infections are asymptomatic cyst spreaders, but 10% of infections will develop disease<sup>5</sup>, with symptoms including dysentery, colitis, and amoebic granulomas<sup>6</sup>. If arteries are perforated during infection, amoebae can spread to the liver and brain causing abscesses, to the heart causing pericarditis, and to the lungs causing pleuropulmonary disease<sup>6</sup>. Invasive infection and dysentery is commonly treated with nitroimidazole-derived drugs<sup>7</sup> and the aminoglycoside paromomycin, but surgical intervention may be necessary in cases of fulminant colitis<sup>8</sup>.

*E. histolytica* parasites are transmitted by ingestion of cyst-contaminated water. While the average infectious dose is > 1,000 organisms, a single infectious individual can pass up to 45 million cysts in their stool per day<sup>9</sup>. After exiting the host, cysts must survive the drying, nutrient poor, and thermo-variable conditions of the environment for several weeks to months. Once taken up, cysts face the harsh acidity of the stomach and the majority of the small intestine, rich with digestive enzymes, as excystation occurs later in the terminal ileum<sup>10</sup>. After excystation, the *Entamoeba* trophozoite divides and colonises the colon, in some cases causing tremendous tissue destruction. It is here that trophozoites form the hardy and infectious cysts that are excreted to the environment<sup>11</sup>.

The robustness and prodigious quantity of cysts shed by infected individuals means that communities in the developing nations that lack proper sanitation are particularly affected<sup>6</sup>. As a diarrheal disease, *Entamoeba* infection influences child mortality, development, and worker productivity, promoting poverty<sup>11</sup>. In regions with unreliable water treatment and waste disposal infrastructure, and where access to medicines for treatment and symptom management may be insufficient, controlling the spread of the environmental cyst form of *Entamoeba* is of utmost importance. Several groups have sought to elucidate the systems and molecules that are involved

<sup>1</sup>Department of Cell Biology, Faculty of Medicine and Dentistry, University of Alberta, T6G 2H7, Edmonton, Alberta, Canada. <sup>2</sup>Biosciences, University of Exeter, Stocker Road, Exeter, EX4 4QD, UK. <sup>3</sup>Department of Biology, University of York, Heslington, York, YO10 5DD, UK. <sup>4</sup>Centre for Environment, Fisheries, and Aquaculture Science (CeFAS), Barrack Road, The Nothe, Weymouth, Dorset, DT4 8UB, UK. <sup>5</sup>J. Craig Venter Institute, 9714 Medical Center Drive, Rockville, MD, 20850, USA. <sup>6</sup>Present address: National Heart, Lung, and Blood Institute (NHLBI), National Institutes of Health (NIH), 6701, Rockledge Drive, Room 9144, Bethesda, MD, 20892-7950, USA. Maria A. Siegesmund and Michael J. Bottery contributed equally to this work. Correspondence and requests for materials should be addressed to J.B.D. (email: decks@ualberta.ca) or M.v.d.G. (email: m.vandergiezen@exeter.ac.uk)

In encystation, recently reviewed in Mi-ichi *et al.* (2016) including Gal-lectin production, catecholamine pathway signalling, cholesterol sulphate synthesis, heat shock protein 90, chitin metabolism, proteolytic systems, and potentially enolase<sup>27</sup>. However, little is known about the underlying cellular trafficking events that facilitate encystation, and furthermore, how the quiescent cyst is prepared for eventual excystation.

The process of forming a stable, resistant cyst relies on the specific, ordered secretion of cyst wall proteins. It is thought that the cyst wall is assembled in three phases, according to the “wattle-and-daub” model<sup>28</sup>. In the foundation stage, the lectin Jacob is trafficked to the cell surface and there binds constitutively expressed Gal/GalNAc lectins<sup>13,14</sup>. During the “wattle” stage, chitin is synthesized and secreted, likely crosslinked by Jacob’s tandemly arranged chitin-binding domains. Jacob lectins and chitin are seen in separate vesicles in early encystation (12 hours post induction, hpi), and have begun to accumulate at the cyst wall at 24–36 hpi<sup>13</sup>. Although the timing is not clear, the chitin-cleaving enzyme chitinase and deacetylases trim and deacetylate extracellular chitin<sup>28,29</sup>. Finally, the Jesse3 lectin, which binds chitin and may also self-aggregate, solidifies the cyst wall in the “daub” phase, making it impermeable to small molecules<sup>13</sup>. Jesse3 is observed in vesicles beginning at 36 hpi, and is found in the cyst wall at 72 hpi<sup>13</sup>. The heavy secretory load clearly implicates the membrane trafficking system (MTS) in encystation.

Membrane trafficking is the movement of proteins and other macromolecules throughout the organelles of the endomembrane system, including endo- and exocytosis. It is indeed a defining feature of eukaryotic cells, and has been shown to be critical for parasite infection<sup>17</sup> and evasion of the immune system<sup>18</sup>. Several studies have implicated the MTS in *Entamoeba paratubis*<sup>19–21</sup>, and specifically encystation. Membrane trafficking events are regulated by small GTPases such as Rabs, involved with vesicle fusion dynamics, and Arfs, which regulate the assembly of protein coats on vesicles. Fourteen Rab genes were found to be upregulated during encystation by a microarray screen<sup>22</sup>. A targeted bioinformatics analysis has shown that *Entamoeba* has expanded its Rab protein family through gene duplication; it has over 100 Rab proteins<sup>23</sup>, many of which lack homologues in human<sup>24</sup>, raising the possibility that some divergent MTS proteins may be potential targets for drugs abrogating cyst formation. Furthermore, the *E. histolytica* genome paper reported that the amoebae contain basic vesicle transport machinery common to eukaryotic cells, and in addition to Rabs, it has also expanded its Arf GTPase complement<sup>25</sup>. However, an in-depth assessment of the *Entamoeba* MTS, and how it relates to encystation, has not yet been done. Due to its importance in cyst formation, we have taken a comparative genomics and transcriptomics approach to define the MTS gene complement of *Entamoeba*, and then assessed how these genes are modulated during encystation. A recent transcriptomic analysis of *E. histolytica* pathogenesis relative to its environment highlights the relevance of large-scale genomic approaches to understanding multiple aspects of this parasite’s biology and lifestyle<sup>26</sup>.

One membrane trafficking factor potentially involved in cyst formation in *E. histolytica* is the dynamin family of enzymes. Dynamins are large GTPase proteins involved in membrane remodelling<sup>27,28</sup>, although the exact mechanism by which dynamin drives membrane fission is still debated<sup>29</sup>. In general, dynamins first polymerise around the neck of a vesicle forming a helix, and then induce scission through tube constriction and/or membrane destabilization, by hydrolysing GTP. They are essential for myriad cellular processes, such as endocytosis, organelle division, cytokinesis, vesicle scission, and cytoskeletal organisation<sup>30,31</sup>. In a previous study of *Giardia intestinalis*, an unrelated enteric cyst-forming parasite, its single dynamin-related protein (Drp) was shown to be necessary in cyst formation<sup>32</sup>. It is associated with encystation-specific vesicles, and expression of a dominant negative Drp mutant blocks *Giardia* encystation<sup>33</sup>. Because of the involvement of dynamin in membrane trafficking, and the requirement of Drp function for *Giardia* stage conversion, we focused particularly on the expression of dynamin-related proteins during *Entamoeba* encystation.

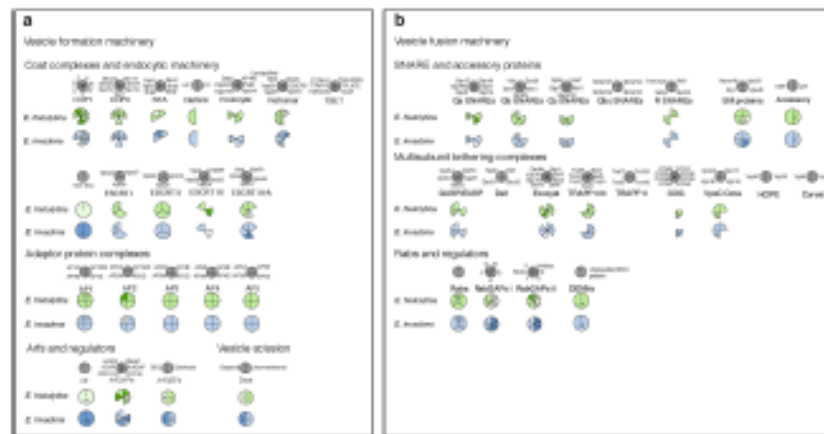
As *E. histolytica* cysts do not form readily *in vitro*, the closely related model *Entamoeba invadens* is often used to study cyst formation. *E. invadens* is a reptile pathogen, and encystation is easily induced under axenic conditions by glucose starvation<sup>34</sup>. We induced encystation in *E. invadens* and performed RNA-Seq on mRNA from the trophozoite (0 hpi), early encystation stage (24 hpi), late encystation stage (48 hpi), and the mature cyst (72 hpi), and identified MTS gene expression patterns during this process. In addition to showing the up-regulation of previously identified encystation genes such as Jacob, Jesse and chitinase, we found that the secretory pathway is generally up-regulated during cyst formation, as well as TGN-endosome trafficking. Furthermore, we found that the mature cyst contains specific mRNAs associated with clathrin-mediated endocytosis, potentially in preparation for excystation. Two highly divergent Drps are also implicated by their predominant expression and by their changed localization during encystation.

## Results

**Transcriptome assembly.** We induced encystation in *E. invadens* and performed transcriptomics in trophozoites, during early and late encystation, and in the mature cyst. Transcriptome sequencing resulted in 40 to 160 million reads per time point, with the fewest being at 48 hpi (late stage encystation) and the highest being at 0 hpi (trophozoite). After pre-processing to trim adapters and filter poor-quality reads, the number of reads were 34.3 million reads at 0 hpi, 27.8 million reads at 24 hpi, 9.1 million reads at 48 hpi, and 26.4 million reads at 72 hpi. These reads were mapped to the *E. invadens* IP-1 genome with PASA identifying 116 potential new transcripts. The *E. invadens* genome contains 11,553 predicted proteins, and only 473 have expression values of 0 FPKM at all time points. Therefore, approximately 96% of the *E. invadens* genome is transcribed at least at one time point during encystation. Of the 116 novel transcripts, only 26 retrieved any other sequence when used to search the NCBI non-redundant nucleotide and protein databases, and 11 of these are related to transposable element sequences (Supplementary Table S1). All genes are listed with expression values in Supplementary Table S1.

***E. histolytica* and *E. invadens* have a similar repertoire of MTS genes.** In order to support the validity *E. invadens* as a model to study the MTS during encystation, we used comparative genomics to assess





**Figure 1.** Coulson plot showing vesicle formation machinery (a) and vesicle fusion machinery (b) in *E. histolytica* and *E. invadens*. Filled sectors indicate presence of a homologue while empty sectors indicate that it could not be identified. Numbers indicate paralogues. Sectors are shaded lighter or darker to indicate where the two *Entamoeba* species differ in copy number.

the complement of MTS genes in *E. histolytica* and *E. invadens*. The predicted proteomes of *E. invadens* and *E. histolytica*, and the *E. invadens* transcriptome generated in this study, were examined for the presence of MTS genes using molecular data from human and other model organisms using the homology searching tool BLASTP. Figure 1a and b show the presence and paralogue number of vesicle formation and vesicle fusion machinery, respectively, in the two *Entamoeba* genomes. Orthologue accession numbers for all MTS components searched are available in Supplementary Table S2. In general, the presence/absence of MTS genes is conserved between the two species, with 246 of 367 identified genes showing one to one orthology. Excluding Arf and Rab GTPases and their regulators, there are 11 genes for which *E. invadens* and *E. histolytica* have a different number of paralogues, and in most of these cases, only one or two duplications have occurred.

The Arf and Rab GTPases, the TBC (Tyr-2/Bub2/Cdc16) proteins (Rab GTPase Activating Proteins; Rab GAPs), and the DENN domain-containing proteins (Guanine nucleotide Exchange Factors for Rabs; RabGEFs) are highly paralogous gene families. Phylogenetic analyses of Arf and Rab GTPases and their regulators were undertaken in order to determine 1:1 orthologues and independent expansions within *Entamoeba*. Supplementary Table S3 is a summary of this work, with the corresponding phylogenies found in Supplementary Figures S1M–N, S1R–T, S2A–B, and Supplementary Files 3 and 4. With the exception of the Arfs, more than half of these proteins have direct 1:1 orthology between *E. invadens* and *E. histolytica*, while less than 1/3 of the proteins are ‘singletons’ (i.e. one or more gene family members in one *Entamoeba* species with no clear orthologues in the other). The rest of the proteins make up orthologous groups with some expansion or loss events (i.e. 1 + :1 or 1:1 + orthology). Overall, the vast majority of GTPases and their regulators share orthology between the two species (>75%), although there have been multiple independent expansions in both species. While there is divergence in this one sub-system of the membrane-traffic machinery between the two organisms, the overall similarity of the remaining MTS complement in *E. histolytica* and *E. invadens* is high. 130 of 155 genes have 1:1 orthology, and there are 61 cases where a factor deduced as present in the LECA was not identified in either genome. Therefore, we suggest that *E. invadens* is a good proxy for studying encystation in the human pathogen *E. histolytica*.

The vesicle formation machinery (Fig. 1a) is largely complete relative to that of human and yeast model systems, despite the high sequence divergence of *Entamoeba* spp. genes. The only complex that appears to be absent given its complete lack of identified subunits is TSET, a recently discovered vesicle coat complex that has been partially or fully lost numerous times in eukaryotes<sup>19</sup>. Although other complexes show partial losses, it is not clear whether these are real gene absences or false negatives due to high sequence divergence, and generally enough members of the complex are present that it may still function even if some subunits are truly missing. There has been a clear *Entamoeba* lineage-specific duplication of the coat complex COPI, which is responsible for retrograde transport in the Golgi, and between the Golgi and ER<sup>16</sup>. There has also been a notable expansion of the Vps26 subunit of the retromer complex in both species, which plays a role in cargo preference for the complex in yeast and human<sup>16,20</sup>. Retromer is responsible for the recycling of lysosomal cargo receptors from the endosomes to the TGN in yeast and human<sup>17</sup>, and in *Entamoeba*, it has been shown to be targeted to pre-phagosomal vacuoles (PPVs), an *Entamoeba*-specific endolysosomal organelle important for pathogenesis<sup>21</sup>. Finally, there are duplications in the large subunits of the adaptor protein (AP) complexes 1 and 2, which interact with the vesicle coat proteins in TGN-endosome and endocytic trafficking, respectively<sup>16,20</sup>.



Common losses are observed in both *Entamoeba* species for the vesicle fusion machinery (Fig. 1b). Anterograde trafficking from the ER to the Golgi is supported by the presence of SNARE proteins Syntaxin 5, Bos1, Ykt6<sup>40</sup>, *unc-48a* and potentially Syntaxin of plants 7 (Syp7)<sup>41</sup>, as well as the SM protein Sly1 and the majority of the multi-subunit tethering complex (MTC) TRAPP1<sup>42</sup>. Conversely, neither the SNARE proteins associated with retrograde Golgi-ER trafficking, nor the MTC Dsl1, appear to be present. Only two subunits were identified of the Conserved Oligomeric Golgi (COG) complex, an MTC involved in retrograde Golgi trafficking<sup>43,44</sup>. However, as the COPI coat complex is present (and certain subunits duplicated), and Golgi-ER retrograde trafficking is an integral feature of ER resident protein recycling and cis/terminal maturation<sup>44,45-47</sup>, it is likely that this trafficking pathway is functional.

Genes involved in endosome-to-TGN trafficking are conserved and in some cases expanded; for example, Syntaxin 16, VU1, Syntaxins 6/10, and Vesicle Associated Membrane Proteins (VAMPs)<sup>40</sup>, *unc-48a* the Sec. 1/ Munc18-like protein Vps45<sup>48</sup>, and a partial GARP MTC complex<sup>49</sup>. This mirrors the expansions of the retromer subunit Vps26, as retromer is the coat complex that functions in this pathway. The endosome-to-lysosome trafficking pathway appears to be somewhat incomplete, as the SNAREs syntaxin 7 and syntaxin 8 could not be confidently identified, and while three out of four VpsC core components were found, we could not identify any of the HOPS (Vps41, Vps39) or Corvet (Vps3, Vps8) accessory proteins.

Two secretory SNARE subfamilies have also undergone expansion. While the SNARE proteins involved in constitutive versus regulated secretion are not well established outside of mammals<sup>50</sup>, there is evidence for an expansion of plasma membrane syntaxins, as well as VAMPs, which can function at the plasma membrane. The exocytic SM protein Munc18 was identified<sup>51</sup>, as well as a partial, but potentially functional, exocyst complex; the MTC involved in exocytosis<sup>52</sup>. This expansion certainly raises the possibility that extra machinery may support secretion of cyst components. In order to determine which MTS proteins are specifically involved in this process, we assessed their expression patterns during encystation.

**Genes differentially expressed during encystation fall into ten clusters of expression patterns.** Statistical pair-wise comparisons of each time point were conducted to identify significantly differentially expressed genes using edgeR<sup>53</sup>. This resulted in a set of 9,073 genes identified as differentially expressed between at least two time points, of which 4,987 were considered to be significant (defined as FDR < 0.01, fold change > 2). As the dispersion between genes was set a priori rather than estimated from the data, we chose not to focus on differential expression of individual genes. We opted instead to cluster genes based on their expression patterns, and then identify the membrane trafficking pathways for which a clear pattern is observed.

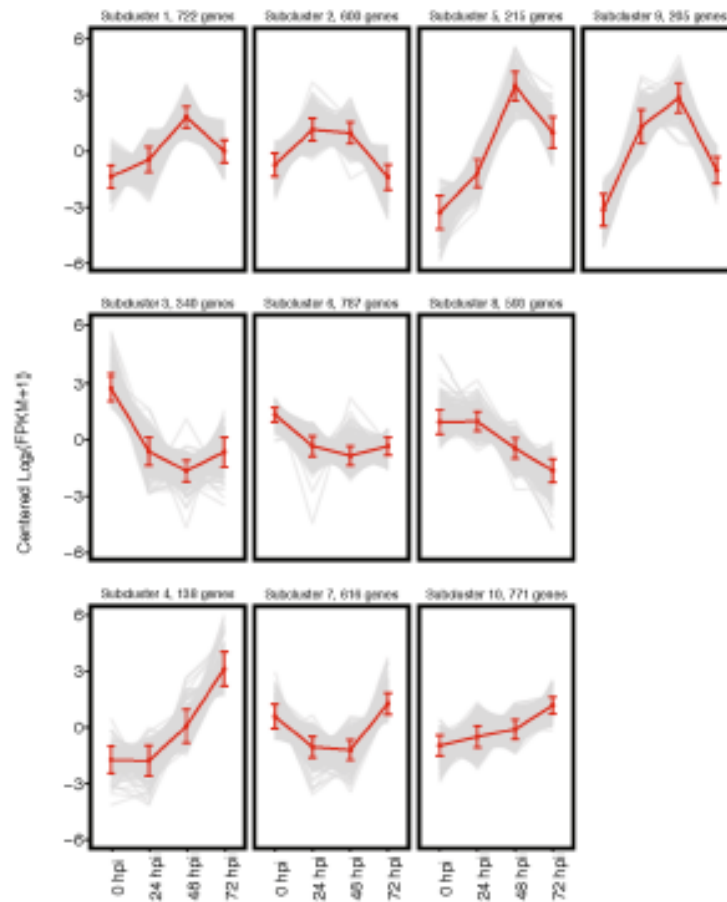
Ten clusters with elevated expression at one or more time point were identified using *k*-means clustering (Fig. 2). In general, the subclusters represent three over-arching patterns: genes whose expression increases during early and/or late encystation, but decreases in the mature cyst; genes whose expression decreases during encystation; and genes whose expression increases in the mature cyst. The first pattern – genes up-regulated during encystation – includes subclusters 1, 2, 5, and 9. Within this group, it is possible to further distinguish genes whose expression remains constant in both early (24 hpt) and late encystation (48 hpt, subcluster 2) from those whose expression peaks in late encystation (subclusters 1, 5, and 9). Subclusters 3 and 8 are characterised by a general decrease in expression during the encystation process, including in the mature cyst (72 hpt). Finally, genes whose expression peaks in the mature cyst make up subclusters 4, 7, and 10. Subcluster 7 is particularly intriguing, as its members are generally down-regulated during early and late encystation, but return to expression levels equivalent to or slightly higher than in the trophozoite (0 hpt). Subcluster 10, on the other hand, shows a pattern of steadily increasing expression throughout encystation and in the mature cyst. Subcluster 6 shows a pattern of downregulation between the trophozoite stage and early encystation (24 hpt); however, the magnitude of this change is low relative to the other expression patterns, and therefore we have chosen to focus on the other subclusters. Jacob lectins are found in subcluster 9, except E(jacob6 and E(jacob7 which are found in subclusters 4 and 5, respectively. Jesse lectins are found in subcluster 5. This is congruent with the notion that the Jacob proteins act at an earlier stage, as subcluster 9 describes genes that have high expression during early and late encystation, and Jesse proteins act later, as subcluster 5 describes genes specifically up-regulated in late encystation. Furthermore, all four chitinases have expression patterns in agreement with previous RT-PCR work<sup>54</sup> and are also members of subclusters 5 and 9.

The variance between these clusters can be accounted for within the first two principle components of the data set (Supplementary Figure S3). The majority of the variance is explained by principle component 1, accounting for 58.4% of the total variability within the data set. This component is dominated by the contrast in expression of genes within trophozoite (0 hpt) and within late encystation (48 hpt). Principle component 2 accounts for 33% of the variance within the data set, representing the contrast in expression of genes between the encystation (24 hpt) and cyst (72 hpt) stages. Differences within expression between trophozoite (0 hpt) and within late encystation (48 hpt) play a prominent role in distinguishing the expression of these clusters.

**Membrane trafficking gene expression during encystation.** Of approximately 400 MTS genes, 223 were identified as differentially expressed and could be clustered into the groups described above during encystation (Supplementary Table S1). Strikingly, we found that 1/4 of the ~400 trafficking components searched for in *E. invadens* encode multiple paralogues where two or more are found in subclusters with different general expression patterns. These findings point to a complex MTS with potentially functionally distinct paralogues that can be swapped in and out of protein complexes to finely tune trafficking processes during encystation. Rather than a blanket increase or decrease in expression of some trafficking factors over others, this suggests that the MTS is highly modulated and a critical part of encystation.

We identified 18 genes involved in secretion in subclusters 1, 2, 5, or 9, which show a pattern of up-regulation during encystation, and which do not have paralogues with opposing expression patterns (Supplementary

## Gene expression profiles



**Figure 2.** Differentially expressed transcripts cluster into ten expression profiles. Plots of expression profiles (centred log<sub>2</sub> FPKM) of transcripts that are significantly differently expressed at least one time point (FDR < 0.01 log<sub>2</sub> fold change > 2) split into ten subclusters defined using both *k*-means and MCL clustering algorithms. The number of genes in each cluster is provided above respective plots. Red points represent the cluster's mean expression profile.

Table S2). Several members of the COPII vesicle coat complex, responsible for the initial ER-to-Golgi step of trafficking secreted material, are up-regulated during encystation (Sar1<sup>98</sup> and two paralogues of Sec 24). Intra-Golgi and Golgi-ER retrograde trafficking is also represented in these subclusters, which include two of the six subunits of the COPI vesicle coat complex required for intra-Golgi and Golgi-ER trafficking, four BIG-like ArfGEF paralogues, as well as several SNARE proteins that function in this pathway (Syntaxin 5, Gos1, Bos1, Bet1) and the SM protein Sly1, which helps disassemble this SNARE complex. Post-Golgi secretory SNAREs are members of these subclusters: Syntaxin PM (two paralogues), and Syp7 as well as the cognate SM protein Munc18. Syp7 is a plant syntaxin thought to be involved in secretion in plants<sup>99</sup>, and due to its absence in human, it may represent a therapeutic target to disrupt encystation.

Rab1 and EhrabA, thought to function in early secretion<sup>100,101</sup>, appear to be down-regulated during encystation. However, they may play multiple roles in trafficking: while the *Entamoeba* Rab1 homologue has not been functionally characterized, Rab1 proteins in *Dictyostelium* cells are recruited to phagosomes<sup>98</sup>, and EhrabA has been shown to be involved in cell motility<sup>102</sup>.

The TGN-endosome recycling pathway is more modestly represented in subclusters 1, 2, 5, and 9, with five members. These include the SNARE protein Syntaxin 16, its cognate SM protein Vps45, EpsinR, and Rab1 (PIKfyve in mammals), which as well as a subunit of the GARP multi-subunit tethering complex, Vps51, is involved in the tethering of vesicles during fusion.

Overall, there is a weak endocytic/phagocytic signal in subclusters 3 and 8 (five members), whose expression decreases during encystation. These include both paralogues of Rab8, two cytohesin-like ArfGEPs, and Rab5. Contrary to this, the phagocytic Rab EhRab8 appears to be up-regulated during encystation. However, this gene is known to be activated by heat shock<sup>40</sup>, and may be activated as part of the stress response cascade that has been proposed to regulate encystation<sup>40</sup>, rather than as part of an increase in phagocytic machinery. The *E. invadens* genome has many genes with multiple paralogues, and it is often the case that while one paralogue of a gene appears to be down-regulated during encystation (in subcluster 3 or 8), the other paralogue does not change in expression. As such, there are few genes and pathways that clearly exemplify a pattern of downregulation. Despite the high modulation and differential expression of MTS components, it is relatively rare for two paralogues of any given gene to have 'opposing' expression patterns, i.e. one paralogue is a member of a subcluster whose expression increases during encystation, and the other is part of a subcluster whose expression decreases under those same conditions. The majority of these cases occur in highly paralogous gene families, such as the TBC-B family of RabGAPs, or the exocytic SNARE protein Vamp7. Given the extensive duplications and diversification in these gene families, we are hesitant to use their subcluster membership as evidence of an emphasized MTS pathway.

Curiously, there are 57 MTS genes whose expression increases from late encystation (48 hpt) to the mature cyst (72 hpt; subclusters 4, 7, 10). The most obvious example is the ESCRT complex proteins, where 7 of 17 are found in these subclusters. The ESCRT complexes are responsible for multivesicular body biogenesis, a mechanism by which plasma membrane and cytosolic proteins can be targeted to the lysosome for degradation. Other members of these subclusters that are involved in endosome recycling and endo-lysosomal function include the adaptor protein complex AP1γ subunit (two paralogues), EpsinR, Syntaxin 6 or 10, two putative DENN2 paralogues, Rab7, TBC-B, and TBC-E. Clathrin heavy chain is also highly expressed in the mature cyst. There are 7 secretory pathway genes that make up these subclusters, including two members of the COPII coat complex (Sec 23 and Sec 31), two non-human SNARE proteins thought to function in ER-to-plasma membrane trafficking in plants (NPSN11 and Syp7), a plasma membrane syntaxin, the COPI subunit COPB, and two BIG-like ArfGEPs. Finally, there are three ArfGAP1, one SMAP, and three uncharacterized ArfGAP paralogues in these subclusters, although their interacting Arf proteins and therefore functions are unknown. Other small G proteins and their regulators that could not be classified, or whose function is unknown, include five RabGEPs, three RabGAPs, two Arf proteins, and nine Rabs. These mRNAs are highly expressed in the mature cyst, although it is not clear whether they are translated into protein products at this stage. As the mature cyst is quiescent, it is possible that this is done to prepare for excystation, so that the cell can quickly perform early endocytic, exocytic and recycling functions prior to beginning the gene expression program seen in trophozoites. This may be analogous to increases in mRNA stability seen in late stage trophozoites of the malaria parasite *Plasmodium falciparum*, which has been suggested to allow nascent merozoites to rapidly activate their development cycle upon invasion of a new erythrocyte<sup>42</sup>. However, two proteomic analyses of *E. histolytica* have identified several membrane trafficking proteins (among others) present in the cyst<sup>43,44</sup>, suggesting that at least some MTS proteins are retained.

**Presence of divergent *Entamoeba* dynamin proteins during encystation.** One final membrane-trafficking gene of interest was identified as a member of subcluster 5, a dynamin-related protein (Drp). DRPs have been shown to be involved in membrane trafficking steps such as vesicle scission and vesicle fusion, as well as other cellular processes requiring membrane deformation including cytokinesis. Given that the single dynamin encoded by the enteric parasite *G. intestinalis* is required in its encystation<sup>45</sup>, we asked whether Drps might also play a role in encystation in *Entamoeba*.

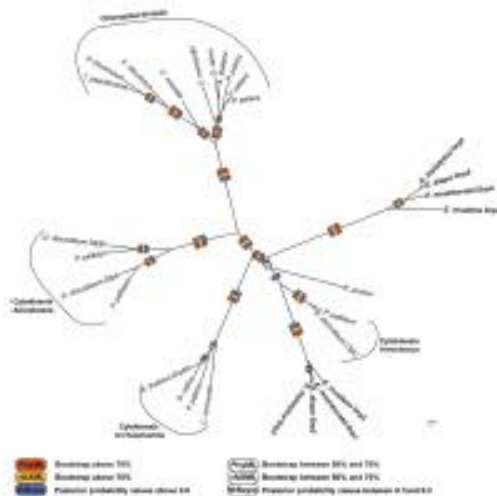
The *E. histolytica* genome encodes four dynamin homologues, EhDrp1 (EHL\_013180), EhDrp2 (EHL\_052740), EhDrp3 (EHL\_174650), and EhDRP4 (EHL\_139440). We further identified their homologues in the *E. invadens* genome: EIDrp1 (EIN\_081190), EIDrp2 (EIN\_114780), EIDrp2a (EIN\_428080), EIDrp3 (EIN\_376410) and EIDrp4 (EIN\_080030), based on sequence similarity.

While Drp 1–4 are comparable in length and molecular weight to the other dynamin family members, Drp3 and Drp4 appear to differ in domain structure from other dynamins. While *Entamoeba* Drp1 and 2 contain the classic N-terminal large GTPase domain and C-terminal GTPase effector domain, only the N-terminal large domain was identified in Drp3 and Drp4 using Pfam<sup>46</sup>, SMART<sup>47</sup>, and NCBI's Conserved Domain Database<sup>48</sup>. However, Drp3 and Drp4 are alignable in the region downstream of the GTPase domain, suggesting sequence divergence and perhaps non-identified functional domains.

**Phylogenetic analysis of DRPs in *Entamoeba* spp.** To assess how the *Entamoeba* Drps are phylogenetically related to other dynamins, we performed extensive global and amoebozoan phylogenetic analyses. The initial dataset contained 133 dynamins and dynamin related sequences (Supplementary Figure S4, which was then separated into Drp1 and Drp2 sequences (Supplementary Figure S5), and Drp3 and Drp4 sequences, with an emphasis on amoebozoan taxa (Fig. 3). The phylogenetic reconstructions clearly show conservation of the orthologues among the *Entamoeba* species. *Entamoeba* Drp1 and Drp2 clustered separately from other functionally characterized members of the dynamin protein family (Supplementary Figure S4) but their function is difficult to discern. However, *Entamoeba* Drp3 and Drp4 formed a well-supported relationship with free-living non-parasitic Amoebozoa, and the archaeplastid and Stramenopile lineages involved in cell and chloroplast division (Supplementary Figure S4 and Fig. 3). *Entamoeba* Drp3 and Drp4, together with the amoebozoan *D. discoideum* DrpC and *Polysphondylium pallidum* Drp homologue (EFA76188) form a well-supported clade, with the *Entamoeba* Drp4 clade being the outgroup to the other sequences. Importantly, there is no such human dynamin



## Phylogeny of Drp3 and Drp4 proteins



**Figure 3.** Phylogenetic analysis of the unusual dynamin-like proteins Drp3 and Drp4. This protein family contains dynamins involved in chloroplast division and cytokinesis and no homologs have been identified in humans. The PhyML Maximum Likelihood topology is shown. Bootstrap values and posterior probability values were calculated using PhyML, RAxML and MrBayes. The dataset contained 29 sequences with 572 informative residues (see Supplementary Table S7 for accession numbers).

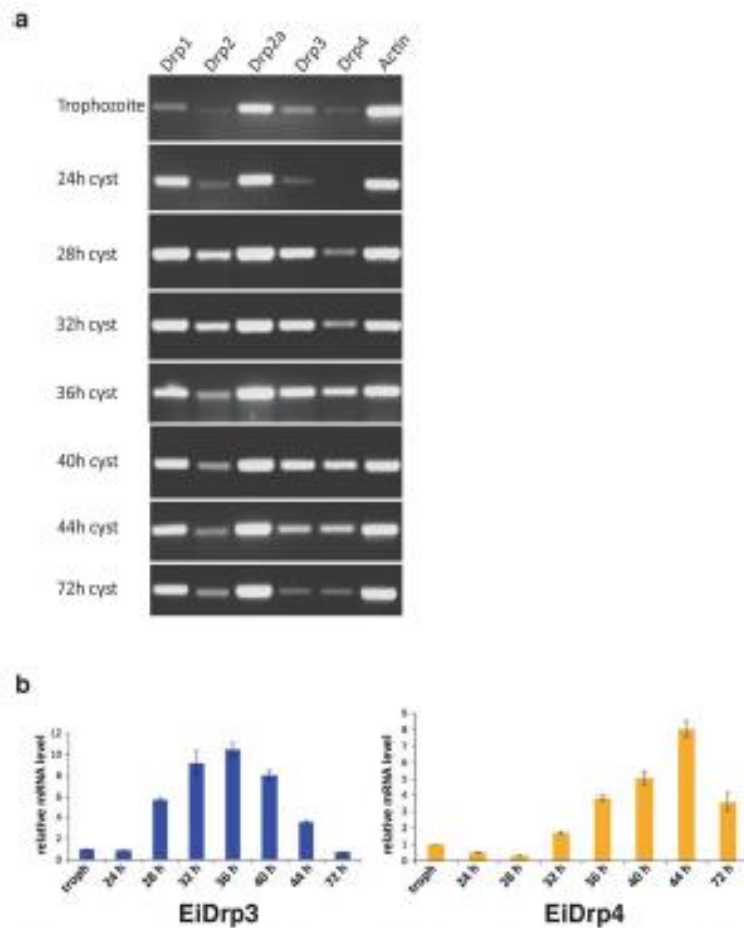
orthologue, therefore these divergent *Entamoeba* DRPs may be prospective therapeutic targets if they are relevant to cyst formation.

Surprisingly, the basal red alga *Cyanidioschyzon merolae* groups with the phaeophyceate taxa *Thalassiosira pseudonana*, *Phaeodactylum tricornutum* and *Ectocarpus siliculosus*, whose secondary plastid originates from a red algal endosymbiont (Fig. 3). This might suggest that these chloroplast-containing stramenopiles acquired this dynamin through the secondary plastid endosymbiosis event. This reconstruction is in agreement with an earlier analysis that suggested a link between cytokinesis and chloroplast division<sup>19</sup>.

**Divergent DRPs are significantly expressed in late encystation stage in *E. invadens*.** Identification of these unusual DRPs prompted us to look more closely at their expression during encystation. To this end, exponentially growing cells were glucose starved to induce cyst formation. In order to see more specifically how these DRPs are expressed, we performed reverse transcription PCR and quantitative PCR on mRNA sampled at the following time points: 0 hpt, 24 hpt, 28 hpt, 32 hpt, 36 hpt, 40 hpt, 44 hpt, and 72 hpt. Cyst formation was monitored by fluorescent microscopy using Calcofluor White, which stains the chitin cell wall (Supplementary Figure S6). In addition to monitoring cyst formation, total RNA was isolated at each time point and the expression of chitinases (known encystation markers) was analysed (Supplementary Figure S7). In agreement with previous studies<sup>64</sup>, chitinases are expressed during cyst formation, with the highest expression between 32 and 44 hpt.

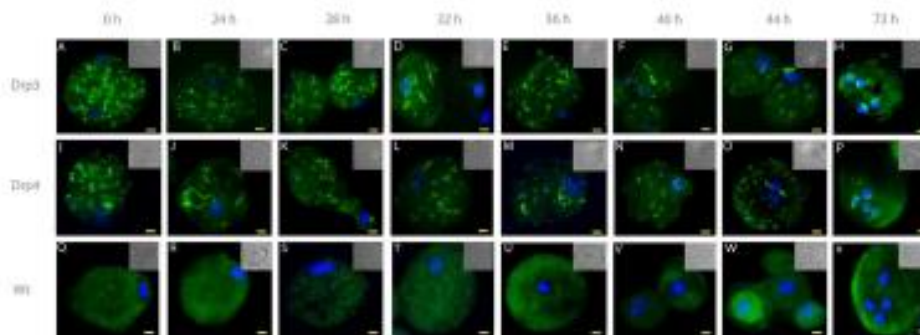
During cyst formation, reverse transcription PCR revealed that all *E. invadens* DRPs are up-regulated, however the degree of which is stage-specific for individual genes (Fig. 4a). EIDrp1 and EIDrp2 are expressed at low levels in the trophozoite stage, but EIDrp1 expression increases after 24 hpt and remains high until the late cyst stage, while EIDrp2 expression peaks at 28–32 hpt, and drops but remains constant after 36 hpt. Drp2a is constitutively highly expressed, suggesting a general cellular role for this gene.

RT-PCR, qPCR and Western blotting results show that the two divergent DRPs are predominantly expressed during cyst formation (Fig. 4 and Supplementary Figure S8). To directly compare gene expression, we determined the PCR amplification efficiency for each primer pair, with values of 106% for EIDrp3, 104% for EIDrp4, and 109% for the reference gene SKI-interacting protein SKIP. EIDrp3 expression increases during early encystation (28 hpt), peaks at mid-encystation (36 hpt), and drops during late encystation (40 + hpt). EIDrp4 expression peaks in late encystation, at 44 hpt, and drops once again in the mature cyst (72 hpt). The RNA-Seq and subcluster analysis also indicates that the expression of both EIDrp3 and EIDrp4 increases during encystation, as they are members of subclusters 1 and 10, respectively. These genes are therefore likely to be involved in cyst formation, and represent potential therapeutic targets as they are highly divergent from human dynamins.



**Figure 4.** Semi-quantitative expression of all *E. invadens* Drps and quantitative expression of divergent EiDrp3 and EiDrp4. *E. invadens* dynamin expression was assessed during cyst formation using semi-quantitative RT-PCR (a). Comparative analysis indicates that the unusual Drp3 and Drp4 dynamins that are absent in humans are only expressed during cyst formation. Stages shown are trophozoites, early cysts (24–28 hpt), mid cysts (32–40 hpt) and late and mature cysts (44–72 hpt). Actin expression was used as a loading control. Quantitative real-time PCR analysis of unusual *Entamoeba* dynamins during cyst formation (b). Relative quantification of *E. invadens* Drp3 (left) and Drp4 (right) expression in trophozoites versus cysts is shown. Time point of RNA extraction is indicated on the x-axis (early cysts: 24–28 hpt, mid cysts: 32–40 hpt and late and mature cysts: 44–72 hpt) and relative mRNA levels is shown on the y-axis. Standard deviations are based on triplicate experiments.

**Divergent Drps change cellular locations during encystation.** We have clearly demonstrated that the highly divergent Drp3 and Drp4 are upregulated during encystation. If these proteins play some role in encystation, it is likely that their cellular localization would change during the course of the encystation process. To investigate the possibility, we produced recombinant *E. invadens* cell lines producing hemagglutinin-tagged versions of Drp3 and Drp4 expressed using the pINDO-LUC vector developed in the Bhattacharya laboratory<sup>69</sup>. This vector has been demonstrated to continuously express inserted genes under control of the promoter of ribosomal protein gene L3 during stage conversion from trophozoite to cyst and back. Due to the asynchronous nature of *E. invadens* encystation<sup>70</sup>, we observed several different localization patterns variably across the time points (Supplementary Figure S9); however, the pattern representing the majority of cells at each time point is shown in Fig. 5. The localization of both Drp3 and Drp4 in the trophozoite seems punctate and diffuse, and Drp3 is localized to fewer but larger structures than Drp4 (Fig. 5). For Drp3, the localization stays similar for the first



**Figure 5.** Localisation of divergent Drps during encystation of *Entamoeba invadens*. Hemagglutinin-tagged *E. invadens* Drp3 and Drp4 were stably overexpressed using pENE0-LUC<sup>38</sup> under the control of the ribosomal protein gene L3 promoter. The HA-tag was visualised using anti-HA antibodies (ThermoFisher) as primary antibodies and secondary antibodies conjugated with Alexa Fluor 488 (Abcam). Shown are representative images of the most frequently observed phenotype at each time point, based on data in Supplementary Figure S9. Trophozoites and encysting cells were collected at indicated time points. Wildtype *E. invadens* TP-1 were treated the same to indicate absence of cross-reactivity. Nuclei are stained using DAPI and a bright field image is shown in the top right of each image. Bar equals 3  $\mu$ m.

28 hours after which the number of punctate structures reduces and more elongated structures appear (Fig. 5 and Supplementary Figure S9). The final cyst localization seems close to the nucleus suggesting a possible association with the ER. Drp4 on the other hand seems more or less similar throughout encystation but also localizes around the nucleus in the final cyst stage (Fig. 5 and Supplementary Figure S9).

## Discussion

*E. invadens* is a well-established model system in which to study cyst formation of the related human pathogen *E. histolytica*. As cyst wall formation by secretion of various lectins and chitin is critical to pathogenicity in *Entamoeba*, we have focused on the role of the membrane trafficking system (MTS) in this process.

The MTS gene complement of *E. invadens* and *E. histolytica* is highly similar. As these species are not immediate sister taxa<sup>72</sup>, these data might be used as a proxy for studying other *Entamoeba* species. Vesicle formation machinery presence is well-conserved relative to that of the model systems of human and yeast. Only the ESCRT family of proteins is relatively incomplete, although we cannot exclude the possibility that the potentially missing genes are present but highly divergent, and refractory to identification by BLAST searches alone. However, even in their absence, it is likely that the ESCRT complex is capable of generating multivesicular bodies, especially given that many ESCRT components show patterns of increased expression in the mature cyst. MVBs are sorting organelles; usually their contents are destined for lysosomal degradation, but can also be secreted via an unconventional pathway involving autophagy machinery<sup>73</sup>.

Overall, vesicle fusion machinery is less well-conserved. None of the SNARE proteins involved in retrograde trafficking from the Golgi to the ER could be found (Syntaxin 18, Sec. 20, Usa1, Sec. 22)<sup>46</sup>. Additionally, the COG complex, which is involved in intra-Golgi trafficking<sup>44</sup>, appears to be heavily reduced (only two subunits out of eight could be positively identified). Dsl1 appears to be missing, but it is typically partially or completely lost in organisms that lack peroxisomes<sup>74</sup>. In these cases where very few or no members of a complex could be identified, false negatives due to divergence are much less likely. *Entamoeba* does not have a 'stacked' Golgi body. Instead, large Golgi 'vesicles' surround the nucleus, as visualized by confocal microscopy of amoebae stained with anti-Arf antibodies<sup>74</sup>. One may speculate that these potential losses of intra-Golgi and Golgi-ER trafficking machinery are correlated with *Entamoeba*'s alternative Golgi organelle structure. However, the COPI coat complex, which also supports retrograde Golgi-ER trafficking is nearly complete, and almost all subunits have undergone gene duplication events in both *Entamoeba* species. This suggests that the typical Golgi-to-ER trafficking pathway is functional and may even have two functionally distinct COPI coat complexes. Additionally, two paralogues of the SM protein that functions in this step are present in both *Entamoeba* species, lending further support for this trafficking pathway. These results suggest that Golgi-ER trafficking in *Entamoeba* differs from what is required in mammalian and yeast cells<sup>75,76</sup>, in that it is apparently accomplished without the SNAREs and MTCs that tether incoming vesicles to target membranes in opisthokont systems.

The MTC complexes of the endocytic system are similarly reduced. GARP, which supports endosome-TGN trafficking<sup>49</sup>, appears to be missing one subunit (Vps52), and while the core TRAPP and VpsC core subunits are largely conserved, the subunits that are specific to TRAPP1 (another early endosome-TGN trafficking tether)<sup>77</sup>, and both Corvet and HOPS (early and late endosome/lysosome trafficking, respectively)<sup>78</sup> could not be found. Our results corroborate those shown in Klingner et al. 2013, in which neither Dsl1 nor Corvet were identified<sup>79</sup>. However, other MTS proteins that support these functions are present, such as the retromer complex and adaptor



protein complexes AP1 and AP3. Again, these pathways are likely functional, but perhaps do not require the canonical MTCs for vesicle fusion. In both this case and that of the Golgi-to-ER trafficking pathway above, it is possible that analogous machinery has evolved to take the place of the more canonical components. This would make for attractive therapeutic targets, but can only be addressed by molecular or biochemical means. Our identification of machinery (e.g. the VpsC or COPI complexes) that could serve as ball for interrogation to identify protein interactors should stimulate these types of analyses in the future.

Between *E. histolytica* and *E. invadens*, the presence and number of paralogues of MTS proteins is relatively similar, with the exception of Arf and Rab GTPases, and their regulators. While there has been significant innovation in both species, we do not suspect that this is related to encystation, as that is a feature of both organisms. Ras family GTPases commonly vary in number expanded in closely related taxa<sup>78</sup>, and in this case, may instead be an adaptation to their respective hosts, or other lifestyle factors. As shown in Supplementary Table S3, one-to-one orthology was observed in at least 50% of the Rab GTPases, and Arf and Rab regulators, suggesting a balance of functional retention and innovation. Given that the small GTPases are variably expanded, it is consistent that the number of cognate GAPs and GEFs similarly fluctuates. However, there are six *E. invadens*-specific Rab genes that are members of subclusters 1, 2, 5, and 9 – which are up-regulated during encystation – suggesting they may be involved in this process. Therefore, we cannot overlook the possibility that there may be some differences in the trafficking events underlying encystation in the two *Entamoeba* species. There are also a number of *E. histolytica*-specific Rabs, and again, these may be relevant to encystation as it occurs in their respective hosts.

The two pathways that chiefly characterize encystation are the secretory pathway, and TGN-endosome recycling. The purpose of the former is clear: to support Jacob and Jesse lectin secretion and therefore cyst formation. This correlates with the increase in expression of chitin-cleaving chitinases during encystation (Supplementary Figure S7)<sup>94</sup>. The role of the TGN-endosome recycling pathway in encystation is less clear. During encystation, vesicles containing cyst-forming material are transported to the cell surface, and the extra membrane from this exocytic process must be retrieved. It may be that endosome-to-TGN trafficking functions to retrieve surface proteins that have been internalized with this membrane, thus preventing them from being trafficked to the lysosome for degradation.

It is interesting to consider that many of the genes that are differentially expressed during encystation are small monomeric G proteins and their regulators, i.e. Arf and Rabs. This suggests that these proteins that control vesicle formation and fusion kinetics may be the 'gatekeepers' of cyst formation. Our work and others' has shown that Rabs are particularly differentially expressed during cyst formation<sup>95</sup>. Unfortunately, little work has been done to investigate the function of Rabs in *Entamoeba*, other than that of Rabs 5<sup>96</sup>, 7<sup>97</sup>, 8<sup>98</sup>, 11<sup>91-93</sup>, RabA<sup>99</sup>, and RabB<sup>90</sup>. Therefore, these unstudied Rabs represent potential therapeutic targets, in particular, those proteins that are highly expressed during encystation.

It has been previously shown that *E. histolytica* Rab11A is involved in encystation<sup>95</sup>, and Rab11 paralogues are also involved in protein recycling, as are their human orthologues<sup>90-93</sup>. In *E. invadens*, Rab11A is highly but consistently expressed at time points during encystation, while Rab11B is a member of subcluster 6, and appears to decrease slightly in expression during encystation. By contrast, Rab11C and Rab11D expression increases in early encystation, peaks at late encystation, and drops again in the mature cyst (subcluster 2), implicating Rab11C and Rab11D in cyst formation. Much of the work on *Entamoeba* Rabs has examined their involvement in phagocytosis and pathogenesis. Rab5 and Rab7, particularly, have been shown to be involved in phagosome and pre-phagosomal vacuole maintenance<sup>20,21,98,99</sup>. Three Rab7 paralogues are members of subclusters 1 and 2, suggesting that they may be involved in encystation, in contrast to other paralogues that have different expression patterns. This again lends support to the idea of a highly specialized MTS in *Entamoeba* where gene families encode functionally divergent paralogues.

The only clear pattern of downregulation during cyst formation is seen in some endocytic and phagocytic trafficking components, which is congruent with the idea that the amoeba is preparing to become a quiescent cyst. We propose that part of this preparation involves generating mRNAs for various endocytic and degradative trafficking genes that may be kept untranslated for rapid translation during excystation, similar to the mRNA localization that occurs in *Drosophila* embryogenesis<sup>66</sup>. Proteomics analyses of *E. histolytica* cysts have shown a handful of MTS proteins, among many others, present in mature cysts<sup>64,66</sup>, raising the possibility that these mRNAs may indeed be translated. Two proteins identified were clathrin heavy chain and a TBC-B homologue (EHL\_094140). Our analysis shows that the *E. invadens* orthologues of both genes are members of subcluster 10, whose expression peaks in the mature cyst. However, at this time, we cannot differentiate between long-lived proteins generated during encystation and untranslated mRNA pools kept in the cyst for excystation. Regardless, this raises the question of a mechanism to prevent mRNA translation, degradation, or protein functioning in the quiescent cyst. Cysts can remain infective for weeks under optimal conditions<sup>66</sup>, suggesting that there is a mechanism by which mRNA (or protein) is stored in an untranscribed or inactive manner during this time. Interestingly, there is evidence for the accumulation of mRNA in cysts of the amoeba *Acanthamoeba*<sup>69</sup>, and the ciliate *Colpoda inflata*<sup>69</sup>, suggesting that mRNA storage in cysts occurs in other organisms, although the mechanisms have not yet been deduced.

A similar study to ours was performed by Ehrenkaufer *et al.*<sup>60</sup>, which assessed genome-wide transcriptional changes in *E. invadens* using RNA-Seq. They generated gene expression profiles, and identified Gene Ontology (GO) terms enriched in each profile or profile group. Genes annotated with the GO term 'vesicle-mediated transport' were found to be significantly enriched in profiles with a pattern of increased gene expression during encystation. We found that overall, the membrane trafficking gene expression patterns we assigned are largely consistent with the profile assignments by Ehrenkaufer *et al.*<sup>60</sup>. Furthermore, consistent with our findings, they identified genes involved in RNA metabolism expressed in the mature cyst, potentially preconfiguring the cell for rapid excystation.

We identified four dynamin related proteins in *E. histolytica* and five in *E. invadens*. Entamoeba Drp1 and Drp2(a) both resemble canonical dynamin related proteins, while Drp3 and Drp4 do not. Immunofluorescence studies have previously shown EhDrp1 to bind to the nuclear membrane<sup>65</sup>, while the function of Drp2/Drp2a has not been studied. Although the phylogeny is not internally well-resolved, these proteins do group with other canonical dynamins, including metazoan dynamins. Drp3 and Drp4, however, form a well-supported clade with other amoebozoan, *Naegleria*, plant, and stramenopile and alveolate sequences, to the exclusion of any metazoan sequence. These homologues have been reported to work in cytokinesis in *Dictyostelium* and *Arabidopsis* and suspected to work in chloroplast division in both plant and Stramenopiles, based on phylogenetic affinity<sup>66</sup>. However, the Entamoeba Drp3 and Drp4 proteins are solely expressed during encystation, during which time two rounds of nuclear replication occur, but cytokinesis does not<sup>62,63</sup>. It is likely that the original function of this Drp subfamily is cytokinesis, based on this function being retained in two evolutionarily distant organisms, suggesting Entamoeba Drp3 and Drp4 have been repurposed in encystation, although their function is not known. It is worth noting that the RNASeq expression patterns were confirmed by RT-PCR, qPCR and Western blotting, serving not only to give confidence about the dynamic expression, but also as a validation of the RNASeq data generally.

The cellular location of these divergent Drps changed dramatically during encystation from a punctate diffuse localization to one surrounding the nucleus in the mature cyst suggesting an association with the ER. Further co-localization and knock-down experiments will allow us to understand the role of these unusual Drps more fully. The fact that these Drps do not have human orthologues raises the possibility of their use as therapeutic targets. In addition to these, we identified a SNARE protein, Syp7, which is specifically up-regulated during encystation, and lacks a human orthologue<sup>64</sup>. While disrupting them would not treat an infection, it could reduce parasite spread in a population. Currently, luminal amoebicides, which target organisms in the intestinal lumen rather than invasive tissue infection, include diloxanide furoate, lodoquinol, and paromomycin. Diloxanide furoate has an efficacy > 50%, while the other two have an efficacy rate > 80%, and are relatively safe<sup>67,68</sup>. However, some asymptomatic cases still fail to respond to treatment with these drugs, and it has been previously suggested that high rates of genetic polymorphisms in a limited geographical region, and extensive geographic diversity in general, may be responsible<sup>69,70</sup>. Additionally, drug resistance is an ever-growing problem, and *E. histolytica* resistance to treatment with metronidazole, which is effective against invasive Entamoeba, has been reported<sup>71</sup>. The development of new amoebicidal drugs is therefore still a valuable pursuit, especially drugs that limit cyst production, which is key in areas with poor sanitation.

In conclusion, we have shown, using the model *E. invadens*, that the membrane trafficking system is modulated during the encystation process. The normal secretory pathway supports exocytosis of cyst wall factors, and TGN-endosome recycling may be a mechanism to control membrane homeostasis. Furthermore, early endocytic factors such as clathrin, as well as phagocytic genes, appear to be upregulated in the mature cyst, suggesting that mRNAs or perhaps protein is stored in the cyst in preparation for excystation. Finally, Entamoeba expresses two highly divergent dynamin-related proteins specifically during encystation. Orthologues in other taxa are involved in cytokinesis, suggesting that the Entamoeba proteins have undergone neofunctionalization. These represent potential drug targets to be explored in future, as an additional way to lower diarrheal disease burden around the world.

## Methods

**Strains, Culture Conditions and Cyst Formation.** Trophozoites of *E. invadens* IP-1 were cultured in 50 mL culture flasks with unvented lids in axenic LY1-S-2 medium at 20°C<sup>72</sup>. To induce encystation, trophozoites in logarithmic growth phase were transferred into axenic glucose-free 50% LY-G medium<sup>100</sup>. For RNA-Seq experiments, samples were taken at 0, 24, 48, and 72 hours post-induction (hpi) of cyst formation; to examine the expression of dynamin-related proteins in cyst formation, samples were taken 0, 24, 28, 32, 36, 40, 44 and 72 hpi in accordance with previous studies<sup>15,66,70,101</sup>. The 72 hpi mature cyst sample was treated with 0.05% Sarkosyl (Sigma Aldrich) to destroy any remaining trophozoites. Cells were pelleted and washed in phosphate-buffered saline for subsequent RNA and protein extraction. *Escherichia coli* strain DH5 $\alpha$  was maintained in LB containing 100  $\mu$ g/ml ampicillin when used to support vector maintenance.

**Amplification and Cloning of EiDrp3 and EiDrp4.** Genes encoding EiDrp3 (GenBank accession number E1N\_376410) and EiDrp4 (E1N\_080030) were PCR amplified from genomic DNA of *E. invadens* IP-1 using primers adding hemagglutinin (HA) tags at the 3' end, for EiDrp3: 5'-ATG TCT ATC TTG AAT GAA GCA G-3' and 5'-CTA TGC ATA GTC TGG AAC GTC ATA TGG ATA CAT TTC TCG CTC TTT GG-3'; and for EiDrp4: 5'-ATG ACA TCA ACA CAG ACA ATG CG-3' and 5'-CTA TGC ATA GTC TGG AAC GTC ATA TGG ATA AAA GTT CAA TTT CTT TTT AAG TTG AGG-3'. The cycling parameters of PCR were: denaturation at 95°C for 45 s; annealing at 50–56°C for 45 s; elongation at 72°C for 1 min/kb; 35 cycles, using GoTaq G2 Hot Start Green Master Mix (Promega). PCR products were purified with QIAquick PCR purification kit (Qiagen) and cloned into pGEM-T-Easy and confirmed by sequencing. The genes were subsequently cloned into the *E. invadens* expression vector pBINEO-LUC<sup>102</sup>, a very kind gift of Professor Sudha Bhattacharyya's laboratory (Jawaharlal Nehru University, New Delhi, India). To facilitate cloning, KpnI and BamHI sites were added via PCR: for EiDrp3: 5'-AGA AGA GGT ACC ATG TCT ATC TTG AAT GAA CCA G-3' and 5'-TCT TCT GGA TCC CTA CAT TTC TCG CTC TTT GG-3'; for EiDrp4: 5'-AGA AGA GGT ACC ATG ACA TGA ACA CAG ACA ATG CG-3' and 5'-TCT TCT GGA TCC CTA AAA GTT CAA TTT CTT TTT AAG TTG AGG-3'. Constructs were confirmed by sequencing.

**Transfection of *E. invadens*.** Transfection was performed by electroporation according to Singh et al. 2012<sup>103</sup>. Briefly, *E. invadens* cells were grown up to 70% confluency, placed on ice for 15 min and harvested by



centrifugation at 400 g for 5 min at 4 °C. Cells were washed once with PBS pH 7.0 and once washed with incomplete cytomix buffer (120 mM KCl, 0.15 mM CaCl<sub>2</sub>, 10 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7.5, 25 mM HEPES, 2 mM EGTA, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, final pH 7.8). Subsequently, 2 × 10<sup>6</sup> trophozoites were re-suspended in 600 μl of complete cytomix buffer (5 mM reduced glutathione and 2 mM ATP). Cells were transferred to a 0.4 mm electroporation cuvette. 100 μg of plasmid DNA was added. Two consecutive pulses of 3000 V/cm were applied at capacitance of 25 μF using a Bio-Rad Gene Pulser Xcell Electroporation System. Electroporated cells were incubated on ice for 10 min, transferred to borosilicate tubes containing 12 ml of LYI-5 medium supplemented with 15% heat inactivated adult bovine serum and 2% vitamin mix. 10 μg of G418 was added after 24 hrs. Cells were subcultured with G418 containing media every 72 hrs.

**Fluorescence microscopy.** Immunofluorescence was performed according to Stegelmund *et al.*<sup>109</sup>. Trophozoites and cysts were harvested at 400 g/5 min, attached to poly-L-lysine coated glass slides for 20 min, fixed in 4% paraformaldehyde (PFA) for 45 min, and rehydrated with 1x PBS for 30 min. Trophozoites were permeabilized with 0.2% Triton X-100 in 1x PBS at room temperature for 1 hour. Cysts were permeabilized overnight at 4 °C. Cells were blocked with 2% BSA at room temperature for 2 hours and incubated with anti-HA primary antibodies (ThermoFisher) diluted to 1:500 in 0.2% Triton X-100, 0.02% sodium azide and 2% BSA for 1 hour at room temperature. Slides were washed twice with 0.2% Triton X-100 in 1x PBS for 3–5 min, and incubated with secondary antibodies conjugated with Alexa Fluor 488 (Abcam) diluted to 1:500 in 0.2% Triton X-100, 0.02% sodium azide, 1% BSA in 1x PBS, for 1 hour at room temperature. Slides were washed with 0.2% Triton X-100, 0.5% BSA in 1x PBS, 3 times for 5 min, each. Slides were mounted with Fluoroshield Mounting Medium with DAPI (Abcam) and covered immediately. Cells were examined using an Olympus IX-81 inverted microscope equipped with the appropriate filter combinations and a 100x objective. Cyst formation was monitored by Calcofluor White staining: two drops of 0.05% Calcofluor White solution (Fluka) were added to a microscope slide with 40 μL encysting cell suspension and incubated for 5 minutes at room temperature before applying the coverslip. Cysts were observed under ultraviolet light by fluorescent microscopy. Spores from the ascomycete fungus *Magnaporthe grisea* were used as a positive control. For a negative control, *E. trivandeni* mature cysts were not treated with Calcofluor White (Supplementary Figure S10).

**RNA extraction for RT-PCR and qPCR.** Trophozoites and the various cyst stages were harvested and washed in PBS. RNA was isolated using Trizol (Roche). Total RNA isolated was treated with DNaseI (Ambion) for 1 hour at 37 °C to remove any genomic DNA. To test for successful DNA removal, RNA samples were subjected to PCR using gene specific primers. Purified RNA was quantified spectrophotometrically using a Nanodrop ND-1000 (Thermo-Fisher). First strand cDNA synthesis was started from 2 μg RNA using Promega ML-MLRT reverse transcriptase in combination with random primers.

**Transcription analysis during cyst formation.** PCR was performed for 30 cycles at 95 °C for 45 s, 53 °C for 45 s, and 72 °C for 45 s using the GoTaq Master Mix (Promega). Prior to PCR, the annealing temperature for the primer pairs was determined experimentally by gradient PCR using a mix of cDNA samples from each time point. The chitinase primers and corresponding annealing temperatures were taken from a previous study<sup>64</sup>. All other primers used in this study are listed in Supplementary Table S4. Quantitative real-time PCR experiments were carried out using a Stratagene Mx3005 P real-time PCR system, Brilliant II Sybr Green qPCR Master Mix (Agilent) and cDNA prepared as described above. PCR was performed for 40 cycles at 95 °C for 30 s, 58 °C for 30 s, and 72 °C for 30 s. Primer specificities and PCR amplification efficiencies were analysed by melt curve and standard curve experiments. The melt curve was established for each primer pair by increasing temperatures at the end of the PCR reaction from 55 to 94 °C, and monitoring fluorescence. The standard curve for each primer pair was constructed by using serial diluted cDNA templates for PCR. qPCR experiments were performed in technical triplicates. The reference gene of choice was the SKI-Interacting protein SKIP (Accession number: AANW01003268), which has been shown to express stably during cyst formation in *E. trivandeni*<sup>64</sup>.

**RNA-seq analysis.** cDNA libraries were constructed for each time point (0, 24, 48, 72 hpi) using the Illumina TruSeq RNA Library Preparation kit and run on an Illumina HiSeq 2000 sequencer, generating 100 bp paired-end sequences. Raw reads were trimmed, clipped and filtered using the FASTX-Toolkit ([http://hannonlab.cshl.edu/fastx\\_toolkit/](http://hannonlab.cshl.edu/fastx_toolkit/)). The first 12 bp were trimmed of the reads using the fastx\_trimmer, and adapter sequences were removed using the fastx\_clipper tool (using 'AGATCGGAAGAGC' as adapter string). The 3' end of the reads were quality-trimmed using a Perl script written by Joe Pass (Bioinformatics Core Facility at the UC Davis Genome Center, USA) (Trim\_slidingWindow.pl; see Supplementary File 1), that uses a sliding window to trim the first base with a quality Phred score < 20, in the first sliding window with a quality Phred score < 20. Reads less than 30 bp were removed and processed sequences were paired using a Python script ([https://github.com/lexnederbragt/denovo-assembly-tutorial/blob/master/scripts/pair\\_up\\_reads.py](https://github.com/lexnederbragt/denovo-assembly-tutorial/blob/master/scripts/pair_up_reads.py)). Transcripts were assembled *de novo* using CLC Genomics Workbench software package (CLC, Denmark) clustered using CD-HIT-EST<sup>105</sup> and subsequently used to correct and refine the *E. trivandeni* IP-1 genomic sequence using a hybrid genomic guided and *de novo* approach to identify potential new transcripts (PASA)<sup>106</sup>. All raw sequence data are accessible at the NCBI Sequence Read Archive through accession numbers MF361146 - MF361261.

The assembled transcripts were preliminary annotated against the *E. trivandeni* IP-1 (JCVI) and *E. histolytica* HIM-1:EMSS (JCVI) annotated transcripts and proteomes (publically available at amoebaDB.org). All-against-all nucleotide BLASTN and BLASTX (translating a nucleotide query in six reading frames) searches were conducted<sup>107</sup>. Annotations were assigned to the RNA-Seq transcripts when hits had an E-value of at least 1e-3 and coverage of at least 50%. When no adequate hit was available the transcript was annotated as hypothetical. A second genome sequence of *E. trivandeni* IP-1 independently constructed by The Sanger Institute (NCBI GenBank,

accession number AANW00000000) was also used to annotate the RNA-Seq transcripts. Independent BLASTN was conducted for each RNA-Seq transcript against the NCBI Nucleotide BLAST database using BLAST+<sup>26</sup>. Annotations were accepted for BLASTN hits with an E-value < 1e-2 with a minimum coverage of 50%.

**Gene expression analysis.** The Trinity package<sup>108,110</sup> and edgeR<sup>109</sup> were used to determine the levels of gene expression using the mapped transcripts. Within the Trinity package, RSEM was used to calculate a Maximum Likelihood estimation of abundance based on the number of reads mapped at both an isoform level and gene level, given as fragments per kilobase of exon per million fragments mapped (FPKM)<sup>110</sup>. Differentially expressed genes were identified using edgeR, with a dispersion value of 0.4 (recommended for datasets with no biological replicates)<sup>109</sup>. Transcripts with a false discovery rate < 0.01 and a minimum log<sub>2</sub> fold change of 2-fold were classified as significantly differently expressed between two time points. TMM-normalized FPKM values for each gene across the four time points (0 hpt, 24 hpt, 48 hpt and 72 hpt) were calculated with default parameters<sup>111</sup> producing expression profiles for each gene. As the Expectation Maximization algorithm of RSEM assigns reads to isoforms based on the most likely relative abundances of the transcripts, in some cases alternative transcripts were identified as very lowly expressed at only one time point, and these appeared to not be biologically significant. Therefore, only transcripts with the highest average expression across conditions were considered in our analyses.

Significantly differentially expressed genes (FDR < 0.01, fold change > 2) were clustered in order to identify groups of similarly regulated genes using *k*-means clustering (Supplementary Table S5). The optimum number of clusters was determined using the median number of clusters proposed by 18 independent indexes (R package NbClust)<sup>112</sup>. Hierarchical clustering of differentially expressed transcripts with similar expression patterns using Euclidean distance was conducted using scripts from the Trinity package (clustering using 'analyze\_diff\_expr.pl' with the parameters -P 1e-2 and -C 1 and clusters split using 'define\_clusters\_by\_cutting\_tree.pl' parameters -K 10). To determine which variables (time points) within the data set were contributing the largest proportion of variation between the clusters, defined using the above techniques, Principal Component Analysis (PCA) was carried out. Scaled FPKM values for each gene at each of the four time points were used for the PCA analysis and a biplot was created using custom R script (Supplementary File 2) (R Core Team, 2013).

**Comparative genomics.** For all membrane trafficking components, *Homo sapiens* sequences that have been functionally characterized were used as queries to search the individual transcript files for each of the four time points, as well as the combined set of *E. invadens* transcripts. Additionally, searches were repeated in the predicted proteome of the *E. invadens* genome at AmoebaDB (<http://amoebadb.org/amoeba/>). In cases where an MTS component has not been described in human, the sequence from the organism in which it is best described or evolutionarily is closest to *E. invadens* was chosen; these include *Arsbitolopis thalassa*, *Naegleria gruberi*, *Saccharomyces cerevisiae*, and *Trypanosoma brucei*. tBLASTn searches were performed with a BLOSUM62 matrix and an E-value cut-off of 0.05 to identify potential homologues, which were then confirmed by reverse BLASTx searches into the *H. sapiens* genome. To be considered homologous, *E. invadens* sequences must retrieve the original human query sequence or a clear orthologue with an E-value < 0.05. As *E. invadens* sequences tend to be divergent, those that retrieved a clear orthologue of the human query by searching the NCBI non-redundant database with an acceptable E-value were also considered orthologous. Rab proteins were not searched for using BLAST, as a comparative genomic analysis of Rabs in *E. invadens* and *E. histolytica* was previously done by Nakada-Tsukut et al. 2010<sup>23</sup>.

Dynamins were identified by searching the *E. histolytica* genome using previously classified dynamin sequences from across the eukaryotic tree of life. The four *E. histolytica* dynamins, EhDrp1 (EHI\_013180), EhDrp2 (EHI\_052740), EhDrp3 (EHI\_174650), and EhDRP4 (EHI\_139440), were then used to search all available *Entamoeba* genomes on Sanger (<http://www.sanger.ac.uk/>) and AmoebaDB (<http://amoebadb.org/amoeba/>).

**Phylogenetics.** Several MTS gene families are highly paralogous, and phylogenetic trees were generated to confirm the identity of homologues found via BLAST. Sequences were aligned using MUSCLE v3.8.31<sup>113</sup>, visualized using Mesquite v3.03<sup>114</sup>, and then manually masked and trimmed to include only homologous positions. Masked alignments are available upon request. A list of sequence accessions, corresponding gene identifiers, and tree meta-data are listed in Supplementary Table S6. ProtTest v3.4<sup>115</sup> was used to determine the best-fit model of sequence evolution, which was LG<sup>116</sup> with gamma-distributed rate variation across sites (+G) and observed amino acid frequencies (+F) in the following trees: adaptin GADEZ subfamily, HSCRT Snf7 family, the TBC/RabGAP family, and the DENN RabGEF family. Both the Rab and Arf trees to assess *Entamoeba* spp. sequence orthology also used this model. The LG + G model was used in ArfGEF and SNARE Qc subfamily trees, and the WAG + G + F model<sup>117</sup> was used in ArfGAP trees. Phylobayes v3.3<sup>118–120</sup> and MrBAYES v3.2.2<sup>121,122</sup> were used for Bayesian inference of phylogeny, and RAxML v8.1.3<sup>123</sup> was used for Maximum-Likelihood analyses. Phylobayes was run until the largest discrepancy observed across all bipartitions was less than 0.1 and at least 100 sampling points were achieved, MrBAYES was used to search treespace for a minimum of one million MCMC generations, sampling every 1000 generations, until the average standard deviation of the split frequencies of two independent runs (with two chains each) was less than 0.01. Consensus trees were generated using a burn-in value of 25%, well above the likelihood plateau in each case. RAxML was run with 100 pseudoreplicates. MTS gene phylogenies can be found in Supplementary Figures S1 and S2.

The dynamin sequences from *E. invadens*, *Entamoeba dispar* and *Entamoeba moshkovskii* were extracted from the respective genome projects and aligned with homologous protein sequences found in Archaeplastida, stramenopiles and *N. gruberi* using ClustalW in Seaview 4.2.12<sup>124</sup>. Manual masking and trimming was performed in Seaview. Three datasets were constructed including a global dynamin-family phylogeny, a separate Drp1/2 phylogeny and a Drp3/4 phylogeny. The large dataset contained 133 sequences with 229 informative sites. The Drp1 and Drp2 dataset contained 66 sequences with 230 informative sites and the Drp3 and Drp4 dataset contained 29 sequences with 572 informative residues. A complete list of taxa and accession numbers can be found in



Supplementary Table S7. RAxML<sup>129</sup> and the Maximum Likelihood program PhyML v3.0<sup>130</sup> were used to generate trees for all datasets. MrBAYES<sup>131,132</sup> was run for the Drp3/Drp4 dataset. Modelgenerator v0.85<sup>133</sup> was used to determine the best-fit model of sequence evolution, which was the LG model<sup>134</sup> for all dynamin trees. For individual phylogenies, the following additional parameters were used: global dynamin phylogeny, LG + G; the Drp1/Drp2 phylogeny, LG + I + G (estimated proportion of invariant sites, + I); and Drp3/Drp4, LG + G. Bootstrap resampling was performed on ML trees with 100 replications for all three analyses. In addition, the Bayesian analysis for the Drp3/Drp4 dataset was performed using a mixed model accommodating 4 rate + inv categories containing 4 chains each. One million generations were calculated and trees sampled every 1,000 generations. The model stabilized rapidly and 200 trees were discarded as burn-in.

## References

- WHO, FAO & UNESCO. Report a consultation with experts on amoebiasis (1997).
- Lozano, R. et al. Global and regional mortality from 235 causes of death for 20 age groups in 1990 and 2010: A systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. *Lancet* **380**, 2095–2128 (2012).
- Verkerke, H. P., Peeter, W. A. & Marie, C. S. The dynamic interdependence of amoebiasis, innate immunity, and undernutrition. *Semin. Immunopathol.* **34**, 771–785 (2012).
- Ximénez, C., Morán, P., Rojas, L., Valdez, A. & Gómez, A. Reassessment of the epidemiology of amoebiasis in the wet. *Infect. Genet. Evol.* **9**, 3025–3032 (2009).
- Stanley, S. L. Amoebiasis. *Lancet* **361**, 1025–1034 (2003).
- Ali, V. & Nozaki, T. Current therapeutic, their problems, and sulfur-containing amino acid metabolism as a novel target against infections by kinetoplastid protozoan parasites. *Chem. Microbiol. Rev.* **20**, 164–187 (2007).
- Ishida, H. et al. Fulminant amoebic colitis with perforation successfully treated by staged surgery: A case report. *J. Gastroenterol.* **38**, 92–96 (2003).
- Gupta, S. S., Singh, O., Shukla, S. & Raj, M. K. Acute fulminant necrotizing amoebic colitis: a rare and fatal complication of amoebiasis: a case report. *Cases J.* **2**, 6557 (2009).
- Kenosh, J. H. & Ray, C. D. *Sherris Medical Microbiology*. <https://doi.org/10.1036/08385299> (2004).
- Nozaki, T. & Bhattacharya, A. Amoebiasis. <https://doi.org/10.1007/978-4-431-55260-0> (2015).
- Mondal, D., Petri, W. A., Sack, R. B., Kierstead, B. D. & Haque, R. *Entamoeba histolytica*-associated diarrheal illness is negatively associated with the growth of preschool children: evidence from a prospective study. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **100**, 1032–1038 (2006).
- Mishra, P., Yoshida, H. & Hamano, S. *Entamoeba* Encystation: New Targets to Prevent the Transmission of Amoebiasis. *PLoS Pathog.* **12**, e1005845 (2016).
- Chattopadhyay, A. et al. Evidence for a 'wattle and daub' model of the cyst wall of *Entamoeba*. *PLoS Pathog.* **5** (2009).
- Prinzard, M. et al. The Most Abundant Glycoprotein of Amoebic Cyst Walls (Jacks) is a Lectin with Two Cys-Rich, Chitin-Binding Domains. *Infect. Immun.* **68**, 4217–4224 (2000).
- Dun, S. et al. The cyst wall of *Entamoeba invadens* contains chitinase (deacetylated chitin). *Mol. Biochem. Parasitol.* **148**, 86–92 (2006).
- Yoga, H. D. et al. Cloning and expression of chitinases of *Entamoeba*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **85**, 139–147 (1997).
- Jensenius-Kauf, E., Morlon-Guyot, J., Dahier, W. & Meisner, M. Vacuolar protein sorting mechanisms in apicomplexan parasites. *Mol. Biochem. Parasitol.* **1–8**, <https://doi.org/10.1016/j.molbio.2016.01.007> (2015).
- Martens, P. T., Beudon, C., Lating, K. H., Nakason, S. K. & Field, M. C. Life and times: Synthesis, trafficking, and evolution of VSG. *Trends Parasitol.* **30**, 251–258 (2014).
- Nozaki, T. & Nakada-Tsukui, K. Membrane trafficking as a virulence mechanism of the enteric protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. *Parasitol. Res.* **98**, 179–183 (2006).
- Saito-Nakano, Y., Yasuda, T., Nakada-Tsukui, K., Leippe, M. & Nozaki, T. Rab5-associated vacuoles play a unique role in phagocytosis of the enteric protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. *J. Biol. Chem.* <https://doi.org/10.1074/jbc.M403987200> (2004).
- Nakada-Tsukui, K., Saito-Nakano, Y., Ali, V. & Nozaki, T. A Retromerlike Complex is a Novel Rab7 Effector That is Involved in the Transport of the Virulence Factor Cysteine Protease in the Enteric Protozoan Parasite *Entamoeba histolytica*. *Mol. Biol. Cell* **16**, 5294–5303 (2005).
- De Châtelet, A. E., Jodani, G., Nakada-Tsukui, K., Caler, E. & Nozaki, T. Transcriptome analysis of encystation in *Entamoeba invadens*. *PLoS One* **8**, e74840 (2013).
- Nakada-Tsukui, K., Saito-Nakano, Y., Huan, A. & Nozaki, T. Conservation and function of Rab small GTPases in *Entamoeba*: Annotation of *E. invadens* Rab and its use for the understanding of *Entamoeba* biology. *Exp. Parasitol.* **126**, 337–347 (2010).
- Saito-Nakano, Y., Lofhus, B. J., Hall, N. & Nozaki, T. The diversity of Rab GTPases in *Entamoeba histolytica*. *Exp. Parasitol.* **110**, 244–252 (2005).
- Lofhus, B. et al. The genome of the protist parasite *Entamoeba histolytica*. *Nature* **433**, 865–868 (2005).
- Wibet, C. et al. Extensive transcriptome analysis correlates the plasticity of *Entamoeba histolytica* pathogenesis to rapid phenotype changes depending on the environment. *Sci. Rep.* **6**, 25852 (2016).
- van der Bliek, A. M. & Meyerowitz, E. M. Dynamitin-like protein encoded by the *Drosophila* *shibire* gene associated with vesicular traffic. *Nature* **351**, 411–414 (1991).
- Chan, M. S. et al. Multiple forms of dynamitin are encoded by *shibire*, a *Drosophila* gene involved in endocytosis. *Nature* **351**, 583–586 (1991).
- Ferguson, S. M. & Carrillo, P. De. Dynamitin, a membrane-sensitizing GTPase. *Nat. Publ. Gr.* **13**, 75–88 (2012).
- Pradić, G. J. K. & McMahon, H. T. The dynamitin superfamily: universal membrane tubulation and fission molecules? *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **5**, 133–47 (2004).
- Gauchier, V., Schraner, E., Wild, P. & Hehl, A. B. The single dynamitin family protein in the primitive protozoan *Giardia lamblia* is essential for stage conversion and endocytic transport. *Traffic* **9**, 57–71 (2008).
- Vikspanzadara-Chamros, L. G. & Arroyo-Bogovich, A. Infection of Encystation of *Entamoeba invadens* by Removal of Glucose from the Culture Medium. *J. Parasitol.* **70**, 629–633 (1984).
- Hiroi, J. et al. Characterization of TSET, an ancient and widespread membrane trafficking complex. *Elife* **2014**, 1–18 (2014).
- Croson, P. & Leclercq, P. Coatomer interaction with di-lysine endoplasmic reticulum retention motifs. *Science* **263**, 1629–1631 (1994).
- Scaman, M. N. J. Recycle your receptor with retromer. *Trends Cell Biol.* **15**, 46–75 (2005).
- Pjerback, A. W. et al. Retromer binds the FANSHY sorting motif in SorLA to regulate amyloid precursor protein sorting and processing. *J. Neurosci.* **32**, 1467–80 (2012).
- Wuerner, T. et al. A loss-of-function screen reveals SNX5 and SNX6 as potential components of the mammalian retromer. *J. Cell Sci.* **120**, 45–54 (2006).
- Hiroi, J. & Robinson, M. S. Clathrin and adaptors. *Biochem. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* **1404**, 175–195 (1998).

39. Robinson, M. S., Sahlin, D. A. & Foster, S. D. Rapid inactivation of Proteins by Rapamycin-Induced Re-routing to Mitochondria. *Dev. Cell* **18**, 324–331 (2010).
40. Jahn, R. & Schädler, H. SNAREs — engines for membrane fusion. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **7**, 631–643 (2006).
41. Stawinska, I. N., Uemura, T., Shima, T., H. Sato, M. & Takeyasu, K. SYPT1, a plant-specific Qc-SNARE protein, reveals dual localization to the plasma membrane and the endoplasmic reticulum in Arabidopsis. *Cell Struct. Funct.* **33**, 185–192 (2008).
42. Hong, W. & Lev, S. Tethering the assembly of SNARE complexes. *Trends Cell Biol.* **24**, 35–43 (2014).
43. Ungar, D. et al. Characterization of a mammalian Golgi-localized protein complex, COG, that is required for normal Golgi morphology and function. *J. Cell Biol.* **157**, 405–415 (2002).
44. Walker, D. M., Paul, K. S. & Watan, M. G. Purification and characterization of a novel 13.5 hetero-oligomeric protein complex that stimulates *in vitro* Golgi transport. *J. Biol. Chem.* **273**, 29565–29576 (1998).
45. Ishii, M., Suda, Y., Kamikawa, K. & Nakano, A. COPI is essential for Golgi cis/trans maturation and dynamics. *Authors: J. Cell Sci.* <https://doi.org/10.1242/jcs.108043> (2016).
46. Martínez-Meráñez, J. A. et al. Post-Golgi vesicles contain retrograde but not anterograde proteins consistent with the cis/trans progression model of intra-Golgi transport. *J. Cell Biol.* **155**, 1213–1224 (2001).
47. Laney, J. et al. GTP hydrolysis by arf-1 mediates sorting and concentration of Golgi resident enzymes into functional COPI vesicles. *EMBO J.* **18**, 4935–4948 (1999).
48. Bard, C. G., Peterson, M., Cowles, C. R. & Hunt, S. D. A novel Sec 18p/NSF-dependent complex required for Golgi-to-endosome transport in yeast. *Mol. Biol. Cell* **8**, 1089–1104 (1997).
49. Condeelis, E. & Stevens, T. H. Vps52p, Vps53p, and Vps54p form a novel multivalent complex required for protein sorting at the yeast late Golgi. *Mol. Biol. Cell* **11**, 305–323 (2000).
50. Klepper, T. H., Klenke, C. N. & Paschaus, D. SNAREing the basis of multivalency: Consequences of protein family expansion during evolution. *Mol. Biol. Evol.* **25**, 2055–2068 (2008).
51. Hata, Y., Slaughter, C. A. & Südhof, T. C. Synaptic vesicle fusion complex contains unc-18 homologue bound to syntaxin. *Nature* **366**, 347–351 (1993).
52. Hsu, S. C. et al. The mammalian brain sec-4/8 complex. *Neuron* **17**, 1209–1219 (1996).
53. Robinson, M. D., McCarthy, D. J. & Smyth, G. K. edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics* **26**, 139–140 (2010).
54. Makita, A., Kamagai, M., Hirayama, K., Kobayashi, S. & Takachi, T. Different structure and mRNA expression of Entamoeba invadens chitinases in the encystation and excystation. *Parasitol. Res.* **109**, 417–423 (2011).
55. Nakano, A. & Muramatsu, M. A Novel GTP-binding Protein, Sarp, Is Involved in Transport from the Endoplasmic Reticulum to the Golgi Apparatus. *J. Cell Biol.* **109**, 2677–2691 (1995).
56. Zahraoui, A., Truchot, N., Chardin, P. & Tavtitan, A. The human rab genes encode a family of GTP-binding proteins related to yeast YPT1 and SDC4 products involved in secretion. *J. Biol. Chem.* **264**, 12394–12401 (1989).
57. Weber, B. H. & Tirmocari, L. A. Overexpression of a mutant form of HhRabA, a unique rab GTPase of Entamoeba histolytica, alters endoplasmic reticulum morphology and localization of the Gal/GalNAc adhesin lectin. *Inkaryot. Cell Biol.* **1014**–1026 (2009).
58. Gotthardt, D. et al. Proteomic Fingerprinting of Phagosome Maturation and Evidence for the Role of a G during Uptake. *Mol. Cell Proteomics* **5**, 2228–2243 (2006).
59. Busch, D. E. & Siderovski, D. P. G protein signaling in the parasite Entamoeba histolytica. *Exp. Mol. Med.* **45**, e13 (2013).
60. Romero-Diaz, M. et al. Structural and functional analysis of the Entamoeba histolytica HhRabA gene promoter. *BMC Mol Biol* **8**, 82 (2007).
61. Hendrick, H. M. et al. Phosphorylation of Eukaryotic Initiation Factor-2 $\alpha$  during Stress and Encystation in Entamoeba Species. *PLoS Pathog.* **12**, 1–21 (2016).
62. Shock, J. L., Pascher, K. P. & DeRisi, J. L. Whole genome analysis of mRNA decay in Plasmodium falciparum reveals a global lengthening of mRNA half-life during the intra-erythrocytic development cycle. *Genome Biol.* **10**, 10134 (2009).
63. Laza-Núñez, M. et al. Proteomic study of Entamoeba histolytica trophozoites, cysts, and cyst-like structures. *PLoS One* **11**, 1–24 (2016).
64. Ali, I. K. M. et al. Proteomic analysis of the cyst stage of Entamoeba histolytica. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **6** (2012).
65. Pfen, R. D. et al. Pfam: data, web tools and services. *Nucleic Acids Res.* **34**, D217–51 (2006).
66. Schultz, J., Copley, R. R., Doerks, T., Ponting, C. P. & Bork, P. SMART: a web-based tool for the study of genetically mobile domains. *Nucleic Acids Res.* **28**, 231–4 (2000).
67. Marchler-Bauer, A. et al. CDD: a Conserved Domain Database for the functional annotation of proteins. *Nucleic Acids Res.* **39**, D225–D229 (2010).
68. Miyagishi, S., Kawayama, H., Uraishihara, H. & Nakamichi, H. Evolutionary linkage between eukaryotic cytokinesis and chloroplast division by dynamin proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **105**, 15202–7 (2008).
69. Singh, N., Ojha, S., Bhattacharya, A. & Bhattacharya, S. Stable transfection and continuous expression of heterologous genes in Entamoeba invadens. *Mol. Biochem. Parasitol.* **184**, 9–12 (2012).
70. Sogoya-Gambao, N. C. et al. Entamoeba invadens, encystation process and encystase. *Exp. Parasitol.* **125**, 63–69 (2010).
71. Clark, C. G. et al. New insights into the phylogeny of Entamoeba species provided by analysis of four new small-subunit rRNA genes. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **56**, 2235–2239 (2006).
72. Duran, J. M., Arjand, C., Stefan, C., Lorenz, W. F. & Malvestro, V. Unconventional secretion of Ach1 is mediated by autophagosomes. *J. Cell Biol.* **188**, 527–536 (2010).
73. Klingner, C. M., Klute, M. J. & Dacks, J. B. Comparative genomic analysis of multi-subunit tethering complexes demonstrates an ancient pan-eukaryotic complement and sculpting in apicomplexa. *PLoS One* **8**, e70278 (2013).
74. Ghosh, S. K. et al. Chitinous secretion by encysting Entamoeba invadens and transfected Entamoeba histolytica trophozoites: Localization of secretory vesicles, endoplasmic reticulum, and Golgi apparatus. *Infect. Immun.* **67**, 3073–3081 (1999).
75. Vanthronen, S. M., Reilly, B. A., Chamberlain, S. J. & Walker, M. G. Dolp, an essential protein required for membrane traffic at the endoplasmic reticulum/Golgi interface in yeast. *Traffic* **2**, 212–21 (2001).
76. Zilov, S. N. & Lapushin, V. V. Cog5p depletion blocks vesicle-mediated Golgi retrograde trafficking in HeLa cells. *J. Cell Biol.* **168**, 747–759 (2005).
77. Cai, H., Zhang, Y., Pypart, M., Walker, L. & Ferro-Novick, S. Mutants in trs120 disrupt traffic from the early endosome to the late Golgi. *J. Cell Biol.* **171**, 825–833 (2005).
78. Balderhaar, H., Klein, J. & Ungermann, C. CORVET and HOPS tethering complexes - coordinators of endosome and lysosome fusion. *J. Cell Sci.* **126**, 1307–16 (2013).
79. Rojas, A. M., Fuentes, G., Raasch, A. & Valencia, A. The Rab protein superfamily: Evolutionary tree and role of conserved amino acids. *J. Cell Biol.* **196**, 189–201 (2012).
80. Hamada, Y., Saito-Nakano, Y., Nakada-Tsukui, K. & Nozaki, T. Endoplasmic reticulum-resident Rab6A GTPase is involved in phagocytosis in the protozoan parasite Entamoeba histolytica. *Cell Microbiol.* **18**, 1358–1373 (2016).
81. McGowan, G. C. & Tirmocari, L. A. Characterization of a Rab11-like GTPase, HhRab11, of Entamoeba histolytica. *Mol. Biochem. Parasitol.* **129**, 137–146 (2003).
82. Mitra, B. N., Saito-Nakano, Y., Nakada-Tsukui, K., Sato, D. & Nozaki, T. Rab11B small GTPase regulates secretion of cysteine proteases in the eukaryotic protozoan parasite Entamoeba histolytica. *Cell. Microbiol.* **9**, 2112–2125 (2007).



83. Temcovari, I. A., Harris, E. N., Stanley, S. L. & Cardelli, J. A. Early and late endosomal compartments of *Entamoeba histolytica* are enriched in cysteine proteases, acid phosphatases and several Ras-related Rab GTPases. *Mol. Biochem. Parasitol.* **103**, 225–241 (1999).
84. Okada, M. & Nomaki, T. New insights into molecular mechanisms of phagocytosis in *Entamoeba histolytica* by proteomic analysis. *Archives of Medical Research*. <https://doi.org/10.1016/j.arcmed.2005.10.003> (2006).
85. Klinger, C. M. et al. Resolving the homology–function relationship through comparative genomics of membrane-trafficking machinery and parasite cell biology. *Mol. Biochem. Parasitol.* <https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2016.07.003> (2016).
86. Lasko, P. mRNA localization and translational control in *Drosophila oogenesis*. *Gold Spring Arch. Perspect. Biol.* **4**, 1–15 (2012).
87. Patil, W. A. Jr & Singh, U. Diagnosis and Management of Amebiasis. *Clin. Infect. Dis.* **29**, 1117–1125 (1999).
88. Byers, T. J., Kim, B. G., King, L. E. & Hoag, E. R. Molecular Aspects of the Cell Cycle and Encystation of *Acanthamoeba*. *Rev. Infect. Dis.* **13**, 537b–84 (1991).
89. Benítez, L. & Gutiérrez, J. C. Encystation-specific mRNA is accumulated in the matting cysts of the ciliate *Colpoda inflata*. *Biochem. Mol. Biol. Int.* **41**, 1137–1141 (1997).
90. Ehrenkaufer, G. M. et al. The genome and transcriptome of the ciliac parasite *Entamoeba invadens*, a model for encystation. *Genome Biol.* **14**, R77 (2013).
91. Jais, R., Siermal, S., Bhattacharya, S. & Bhattacharya, A. Identification and partial characterization of a dynamin-like protein, EhDLP1, from the protist parasite *Entamoeba histolytica*. *Parasitol. Cell* **9**, 215–223 (2010).
92. Levins, N. D. Protozoan parasites of domestic animals and of man (1975).
93. Singh, N., Bhattacharya, S. & Paul, J. *Entamoeba invadens*: Dynamics of DNA synthesis during differentiation from trophozoite to cyst. *Exp. Parasitol.* **127**, 329–333 (2011).
94. Baslam, D. C., Brandtzi, F., Olgut, M. S. & Sanderfoot, A. A. In *The Antihelminthics Book* **65**, 1 (2008).
95. Bloemmann, J. & Thernick, F. Treatment of Asymptomatic Intestinal *Entamoeba histolytica* Infection. *N. Engl. J. Med.* **347**, 1376–1384 (2002).
96. Pollard, J. & McCarthy, J. In *Encyclopedia of Antibiotics* Sixth Edition: A Clinical Review of Antibacterial, Antifungal and Antiviral Drugs (eds Grayson, M. L. et al.) 2107–2109 (CRC Press, 2010).
97. Hightight, A., Kobayashi, S., Taketachi, T., Thammapalerd, N. & Nomaki, T. Geographic diversity among genotypes of *Entamoeba histolytica* field isolates. *J. Clin. Microbiol.* **41**, 3748–56 (2003).
98. Singh, J. P. & Kashyap, A. A comparative evaluation of percutaneous catheter drainage for resistant amebic liver abscesses. *Am. J. Surg.* **158**, 58–62 (1989).
99. Clark, C. G. & Diamond, L. S. Methods for cultivation of larval parasitic protozoa of clinical importance. *Clin. Microbiol. Rev.* **15**, 329–341 (2002).
100. Sanchez, L., Enca, V. & Eichinger, D. Identification of a developmentally regulated transcript expressed during encystation of *Entamoeba invadens*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **67**, 125–135 (1994).
101. Eichinger, D. Encystation of *Entamoeba* parasites. *BioEssays* **19**, 633–639 (1997).
102. Singh, N., Ojha, S., Bhattacharya, A. & Bhattacharya, S. Establishment of a transient transfection system and expression of firefly luciferase in *Entamoeba invadens*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **183**, 90–3 (2012).
103. Sogamond, M. A., Hehl, A. B. & van der Gieren, M. Mitosomes in trophozoites and cysts of the reptilian parasite *Entamoeba invadens*. *Parasitol. Cell* **10**, 1582–1585 (2011).
104. Ehrenkaufer, G. M., Haque, R., Hackney, J., Eichinger, D. J. & Singh, U. Identification of developmentally regulated genes in *Entamoeba histolytica*: Insights into mechanisms of stage conversion in a protozoan parasite. *Cell. Microbiol.* **9**, 1426–1444 (2007).
105. Fu, L., Niu, B., Zhu, Z., Wu, S. & Li, W. CD-HIT: Accelerated for clustering the next-generation sequencing data. *Bioinformatics* **28**, 3150–3152 (2012).
106. Hsu, B. J. et al. Automated eukaryotic gene structure annotation using EVIDENCEModeler and the Program to Assemble Spliced Alignments. *Genome Biol.* **9**, R7 (2008).
107. Altschul, S. F. et al. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* **25**, 3389–3402 (1997).
108. Camacho, C. et al. BLAST+ architecture and applications. *BMC Bioinformatics* **10**, 1 (2009).
109. Grabherr, M. G. et al. Full-length transcriptome assembly from RNA-Seq data without a reference genome. *Nat. Biotech.* **29**, 644–652 (2011).
110. Li, B. & Dewey, C. RSEM: accurate transcript quantification from RNA-Seq data with or without a reference genome. *BMC Bioinformatics* **12**, 323 (2011).
111. Robinson, M. D. & Oshlack, A. A scaling normalization method for differential expression analysis of RNA-seq data. 1–9. <https://doi.org/10.1186/gb-2010-11-3-r25> (2010).
112. Charrod, M., Ghazali, N., Botta, V. & Nikraf, A. NcClust: An R Package for Determining the Relevant Number of Clusters in a Data Set. *J. Stat. Softw.* **61** (2014).
113. Edgar, R. C. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res.* **32**, 1792–1797 (2004).
114. Maddison, W. P. & Maddison, D. R. Mesquite: a modular system for evolutionary analysis (2015).
115. Durbin, D., Taboada, G. L., Doulo, R. & Pronda, D. ProtTest-3HPC: Fast selection of best-fit models of protein evolution. *Bioinformatics* **6586 LNCS**, 177–184 (2011).
116. Lu, S. Q. & Gascaud, O. An improved general amino acid replacement matrix. *Mol. Biol. Evol.* **25**, 1307–1320 (2008).
117. Whelan, S. & Goldman, N. A general empirical model of protein evolution derived from multiple protein families using a maximum-likelihood approach. *Mol. Biol. Evol.* **18**, 691–699 (2001).
118. Lartillot, N. & Philippe, H. A Bayesian mixture model for across-site heterogeneities in the amino-acid replacement process. *Mol. Biol. Evol.* **21**, 1095–1109 (2004).
119. Lartillot, N. & Philippe, H. Computing Bayes Factors Using Thermodynamic Integration. *Syst. Biol.* **55**, 195–207 (2006).
120. Lartillot, N., Brinkmann, H. & Philippe, H. Suppression of long-branch attraction artifacts in the animal phylogeny using a site-heterogeneous model. *BMC Evol. Biol.* **7**(Suppl 1), 94 (2007).
121. Ronquist, F. & Huelsenbeck, J. P. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics* **19**, 1572–1574 (2003).
122. Huelsenbeck, J. P., Ronquist, F., Nielsen, R. & Bollback, J. P. Bayesian Inference of Phylogeny and Its Impact on Evolutionary Biology. *Science* (80-). **294**, 2310–2314 (2001).
123. Stamatakis, A. RAxML version 8: A tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies. *Bioinformatics* **30**, 1312–1313 (2014).
124. Gouy, M., Guindon, S. & Gascaud, O. SeaView version 4: A multiplatform graphical user interface for sequence alignment and phylogenetic tree building. *Mol. Biol. Evol.* **27**, 221–4 (2010).
125. Guindon, S. et al. New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: assessing the performance of PhyML 3.0. *Syst. Biol.* **59**, 307–321 (2010).
126. Kearse, T. M., Mooney, C. J., Pentony, M. M., Naughton, T. J. & McInerney, J. O. Assessment of methods for amino acid matrix selection and their use on empirical data shows that ad hoc assumptions for choice of matrix are not justified. *BMC Evol. Biol.* **6**, 29 (2006).

### Acknowledgements

The authors thank Audrey Farbos, Karen Moore and Konrad Paszkiewicz for facilitating the sequencing experiments. The Exeter Sequencing Facility was funded by a Wellcome Trust Institutional Strategic Support Award (WT097835MF). MMS acknowledges support from the Iraqi Ministry of Higher Education and Scientific Research (MOHESR) and the University of Baghdad. MvdG is grateful for support from the University of Exeter and Higher Education Funding Council for England (HEFCE). We thank Marwan Al-Maqsoofi and Christian Hacker (both University of Exeter) for technical support. Emily Hierman was supported by a Graduate studentship from Alberta Innovates Health Solutions and a Vanier Graduate Scholarship. Work in the Dacks lab is supported by NSERC Discovery Grant (RHS0021028). JBD is the Canada Research Chair Tier II in Evolutionary Cell Biology. The views expressed in this manuscript are those of the authors and do not necessarily represent the views of the National Heart, Lung, and Blood Institute, the National Institutes of Health, or the U.S. Department of Health and Human Services.

### Author Contributions

M.v.d.G. and J.B.D. designed and supervised experiments; M.A.S. and M.M.S. performed the laboratory experiments; E.H., M.A.S., M.J.B., M.M.S., R.v.A. and E.C. contributed to the data analysis; E.H., M.A.S. and M.J.B. organized, designed, and wrote the paper; E.H., J.B.D. and M.v.d.G. critically revised the manuscript. All authors reviewed the final manuscript.

### Additional Information

**Supplementary information** accompanies this paper at <https://doi.org/10.1038/s41598-017-12875-6>.

**Competing Interests:** The authors declare that they have no competing interests.

**Publisher's note:** Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

 **Open Access** This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons license and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2017