



CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y ESTUDIOS AVANZADOS  
DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE INFECTÓMICA Y PATOGÉNESIS MOLECULAR

**“Análisis de la participación de las proteínas metiltransferasas de arginina  
PRMT5 y PRMTA de *Entamoeba histolytica* en fagocitosis y choque térmico”**

TESIS

Que presenta

M. en C. Christian Medina Gómez

Para obtener el grado de

DOCTOR EN CIENCIAS

Director de Tesis:

Mario Alberto Rodríguez Rodríguez

Ciudad de México

Enero, 2021

**El presente trabajo fue desarrollado en el laboratorio 2 del departamento de Infectómica y Patogénesis Molecular del Centro de Investigación y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV) bajo la dirección del Dr. Mario Alberto Rodríguez Rodríguez y con el apoyo financiero CONACYT con el número de registro 558449.**

## **Dedicatorias**

### **A mis padres**

#### **María Emilia Gómez Gumeta y José Alfredo Medina Meléndez**

El esfuerzo y dedicación que puse en mi trabajo es para ustedes, por ser mis ejemplos de vida, por enseñarme todo lo que sé, porque gracias a ustedes soy la persona que soy y porque me enseñaron a cuidar de todo, a ser responsable y a ser dedicado con las cosas que hago. Gracias por apoyarme en venir aquí, en mostrarme su apoyo en mi decisión de dedicarme a la ciencia y en esta etapa para completar mi formación profesional, sé que voy a contar con ustedes en todo momento.

## **Agradecimientos**

### **Dr. Mario Alberto Rodríguez Rodríguez**

Por darme la oportunidad y la confianza de pertenecer a su grupo de trabajo durante los últimos 6 años, de apoyarme tanto académica como moralmente cuando las cosas no salieron como se esperaban, por su paciencia y sus observaciones, las cuales me han ayudado a crecer como profesional, por todo lo que aprendí estando bajo su dirección, tanto en investigación como personalmente.

### **A mis asesores**

#### **Dr. José Luis Rosales Encina**

#### **Dra. Patricia Talamás Rohana**

#### **Dra. Elisa Azuara Liceaga**

#### **Dr. Jesús Valdés Flores**

Por sus observaciones, comentarios y críticas que siempre ayudarán a personas como yo, en su formación y para permitirnos siempre mejorar académica y personalmente. Gracias por su apoyo en este trabajo.

#### **Carlos Vázquez Calzada**

#### **Mario Rodríguez Nieves**

Gracias por ser no solo mis compañeros de trabajo, sino también mis amigos, por su soporte técnico, ayuda en todo momento en el laboratorio, por su paciencia y por ser responsables directos de que este trabajo haya sido terminado de manera óptima.

## **Dra. Jeni Bolaños Rebolledo**

Por ser no solo una profesional, amiga, mamá y persona ejemplar de quien me llevo tanto aprendizaje, sino porque sin ti este trabajo no se hubiera podido terminar, eres una gran investigadora, pero eres mejor ser humano, gracias por toda tu ayuda y presencia en el laboratorio.

## **A mis amigos del laboratorio**

A todos mis amigos del laboratorio, a Mariana, Susana, Ramón, Josué, Arturo, Rigo, Jorge y a los que ya se fueron, por su amistad, por ser mi segunda familia, por haberme ayudado tanto personalmente como en los experimentos en el laboratorio, por las convivencias, aventuras, buenos y malos ratos, anécdotas y por ser quienes son, gracias.

## ÍNDICE

I. Lista de Tablas .....	i
II. Lista de figuras .....	i
III. Abreviaturas .....	iii
IV. RESUMEN .....	iv
V. ABSTRACT .....	v
1. INTRODUCCIÓN .....	1
1.1 <i>Entamoeba histolytica</i> .....	1
1.2 Mecanismos de patogenicidad.....	4
1.3 Características del genoma de <i>E. histolytica</i> .....	6
1.4 Regulación de la cromatina.....	7
1.5 Modificaciones postraduccionales de proteínas.....	9
1.6 Metilación de proteínas histonas y no histonas.....	9
1.7 Proteínas metiltransferasas de arginina (PRMT's).....	11
2. ANTECEDENTES .....	17
2.1 PRMT's en otros parásitos.....	17
2.2 PRMT's en <i>Entamoeba histolytica</i> .....	20
3. JUSTIFICACIÓN .....	24
4. HIPÓTESIS .....	25
5. OBJETIVO GENERAL.....	25
5.1 Objetivos particulares.....	25
6. MATERIALES Y MÉTODOS .....	26
6.1 Análisis <i>in silico</i> de las proteínas EhPRMT5 y EhPRMTA .....	26

6.2 Cultivo de trofozoítos de <i>E. histolytica</i> .....	26
6.3 Obtención de eritrocitos .....	27
6.4 Obtención de proteínas y electroforesis .....	27
6.5 Western blot .....	28
6.6 Inmunofluorescencia .....	29
6.7 Silenciamiento de EhPRMTA .....	30
6.7.1 Amplificación del gen EhPRMTA .....	30
6.7.2 Clonación en el vector pCRII-TOPO .....	31
6.7.3 Obtención de células competentes .....	31
6.7.4 Obtención de DNA plasmídico .....	32
6.7.5 Digestión con enzimas de restricción.....	32
6.7.6 Electroforesis en geles de agarosa.....	33
6.7.7 Purificación de DNA a partir de geles de agarosa .....	33
6.7.8 Ligación .....	34
6.7.9 Transfección de trofozoítos de <i>E. histolytica</i> .....	34
6.8 Ensayos de crecimiento, migración, choque térmico y fagocitosis en trofozoítos silenciados.....	35
6.9 Estadística .....	36
7. RESULTADOS .....	37
7.1 Análisis <i>in silico</i> de EhPRMT5.....	37
7.2 Ensayo de dimetilación <i>in vitro</i> de la arginina 3 de la histona H4 (H4R3) ....	40
7.3 Expresión y localización subcelular de la proteína EhPRMT5 durante el choque térmico.....	42
7.4 Expresión y localización subcelular de la proteína EhPRMT5 durante la eritrofagocitosis .....	46
7.5 Análisis <i>in silico</i> de la EhPRMTA .....	49
7.6 Western blot de EhPRMTA en extractos de trofozoítos .....	54

7.7 Expresión y localización subcelular de la proteína EhPRMTA durante la eritrofagocitosis .....	55
7.8 Expresión y localización subcelular de la proteína EhPRMTA durante el choque térmico.....	57
7.9 Efecto del silenciamiento de EhPRMTA en la virulencia <i>in vitro</i> del parásito y en choque térmico.....	60
8. DISCUSIÓN .....	69
9. CONCLUSIÓN .....	78
10. PERSPECTIVAS.....	78
11. BIBLIOGRAFÍA .....	79
12. APÉNDICE .....	91



## I. Lista de Tablas

**Tabla 1.** Identidad de EhPRMTA de *E. histolytica* con las PRMT's de *H. sapiens*

## II. Lista de figuras

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

**Fig. 2.** Conversión de la cromatina a heterocromatina y eucromatina por modificaciones al DNA o a proteínas histonas

**Fig. 3.** Tipos de metilación de los residuos de arginina y tipos de proteínas metil-transferasas de arginina (PRMT's)

**Fig. 4.** Estructura general de las proteínas metil-transferasas de arginina

**Fig. 5.** Ensayos de actividad enzimática *in vitro* de EhPRMT5 y EhPRMTA

**Fig. 6.** Localización subcelular de EhPRMT5 y EhPRMTA en trofozoítos de *E. histolytica*

**Fig. 7.** Dominios estructurales de la proteína EhPRMT5

**Fig. 8.** Alineamiento de las secuencias de aminoácidos de las proteínas EhPRMT5 y HsPRMT5

**Fig. 9.** Comparación estructural de las proteínas EhPRMT5 y HsPRMT5

**Fig. 10.** Western blot sobre ensayos de metilación en histonas comerciales con un anticuerpo contra la dimetilación de H4R3

**Fig. 11.** Expresión de EhPRMT5 durante el tratamiento de choque térmico

**Fig. 12.** Localización de la proteína PRMT5 en trofozoítos durante el tratamiento de choque térmico

**Fig. 13.** Inmunofluorescencia de EhPRMT5 y EhHsp70 durante el choque térmico

- Fig. 14.** Metilación de arginina en Hsp70
- Fig. 15.** Expresión de EhPRMT5 durante la fagocitosis
- Fig. 16.** Inmunofluorescencia de PRMT5 durante la eritrofagocitosis
- Fig. 17.** Alineamiento de las secuencias de aminoácidos de EhPRMTA, EhPRMT1a y EhPRMT5 con PRMTs de tipo I
- Fig. 18.** Búsqueda de aminoácidos conservados entre EhPRMTA y RnPRMT1
- Fig. 19.** Comparación estructural entre EhPRMTA con RnPRMT1 y EhPRMT5
- Fig. 20.** Inmunodetección de EhPRMTA
- Fig. 21.** Expresión de EhPRMTA durante la fagocitosis
- Fig. 22.** Inmunofluorescencia de EhPRMTA durante la eritrofagocitosis
- Fig. 23.** Expresión de EhPRMTA en choque térmico
- Fig. 24.** Inmunofluorescencia de EhPRMTA en choque térmico
- Fig. 25.** Vector de silenciamiento PSA8
- Fig. 26.** Amplificación del gen *Ehprmta*
- Fig. 27.** Silenciamiento de la proteína EhPRMTA
- Fig. 28.** Efecto del silenciamiento de EhPRMTA en el crecimiento de *E. histolytica*
- Fig. 29.** Efecto del silenciamiento de EhPRMTA en la migración de los trofozoítos
- Fig. 30.** Efecto del silenciamiento de EhPRMTA en la eritrofagocitosis de *E. histolytica*
- Fig. 31.** Efecto del silenciamiento de EhPRMTA en la sobrevivencia de los trofozoítos durante el choque térmico

### III. Abreviaturas

<b>ADMA</b>	Dimetil-arginina asimétrica
<b>Adomet</b>	S-adenosil-metionina
<b>DAPI</b>	4',6-diamidino-2-fenilindol
<b>EhPRMT</b>	Proteína metil-transferasa de arginina de <i>Entamoeba histolytica</i>
<b>EhPRMTAsil</b>	Proteína metil-transferasa Atípica de <i>E. histolytica</i> silenciada
<b>GAR</b>	Motivo rico en glicina-arginina
<b>H4R3</b>	Arginina 3 de la histona 4
<b>HsPRMT</b>	Proteína metil-transferasa de arginina de <i>Homo sapiens</i>
<b>MMA</b>	Monometil-arginina
<b>MOCK</b>	Transfección con vector vacío
<b>PCR</b>	Reacción en cadena de polimerasa
<b>PDB</b>	Protein Data Base Archive
<b>PKMT</b>	Proteína metil-transferasa de lisina
<b>PRMT</b>	Proteína metil-transferasa de arginina
<b>RNP</b>	Ribonucleoproteína
<b>S-Adohcy</b>	S-adenosil-homocisteína
<b>SDMA</b>	Dimetil-arginina simétrica
<b>SDS-PAGE</b>	Gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico

#### IV. RESUMEN

*Entamoeba histolytica* es el parásito causante de la amibiasis en humanos, siendo una de las principales parasitosis en países en vías de desarrollo. El mecanismo citopatogénico de este organismo se divide en tres fases principales: adhesión, citólisis y fagocitosis. Sin embargo, los mecanismos que permiten modular estos y otros procesos en la vida del parásito, así como la respuesta a diferentes condiciones de estrés, no son completamente conocidos. En eucariotas, un mecanismo que participa en la regulación tanto de la expresión genética como de diferentes vías de señalización se realiza mediante modificaciones postraduccionales de proteínas, una de las cuales es la metilación de aminoácidos específicos, como lisina y arginina. La metilación de argininas es realizada por metiltransferasas de arginina (PRMT's, por sus siglas en inglés de "Protein Arginine Methyltransferases"). En *E. histolytica* se han identificado cinco genes que codifican para PRMT's (EhPRMT1a-c, PRMT5 y EhPRMTA). En nuestro trabajo de maestría se caracterizaron preliminarmente a las enzimas EhPRMT5 y EhPRMTA, las cuales mostraron actividad de metiltransferasa sobre histonas comerciales. Anticuerpos específicos contra EhPRMT5 y EhPRMTA inmunolocalizaron a ambas proteínas en el citoplasma y en el núcleo de los trofozoítos. En el presente trabajo se analizó la participación de ambas proteínas en la fagocitosis y en la respuesta a choque térmico. Ambas proteínas aumentaron su expresión en ensayos de eritrofagocitosis y de choque térmico. Además, EhPRMT5 colocalizó con Hsp70 en posibles gránulos de estrés durante el choque térmico, y se concentró en el citoplasma durante la eritrofagocitosis, mientras que EhPRMTA aumentó su localización en núcleo en ambas condiciones, sugiriendo que las dos proteínas participan en esos eventos. Por otra parte, el silenciamiento de EhPRMTA evidenció que esta enzima funge como regulador negativo de la proliferación de los trofozoítos y de la fagocitosis, pero actúa como regulador positivo en la migración celular y en la resistencia al choque térmico, funciones similares a las que realiza la enzima de mamíferos PRMT2.

## V. ABSTRACT

*Entamoeba histolytica* is the causing parasite of human amebiasis, being one of the main parasitic diseases in developing countries. The cytopathogenic mechanism of this parasite is divided in three main phases: adhesion, cytolysis and phagocytosis. However, the way the parasite modulates these and other processes in its life, as well as its response to stress conditions are not fully known. Regarding eukaryotic organisms, postranslational modifications (PTM) are one way that these organisms can modulate genetic expression as well as signaling pathways, one of these PTM is the methylation of specific amino acids, such as lysine or arginine. Arginine methylation is carried out by protein arginine methyltransferases (PRMT's). In *E. histolytica*, five PRMT's encoding genes have been identified (EhPRMT1a-c, EhPRMT5 and EhPRMTA). In our previous work, EhPRMT5 and EhPRMTA were preliminarily characterized; both proteins showed methyltransferase activity on commercial histones. Specific antibodies against EhPRMT5 and EhPRMTA localized both proteins in cytoplasm and nuclei of trophozoites. In this work we analyzed the participation of both proteins in phagocytosis and heat shock, where they increased their expression in both conditions. EhPRMT5 colocalized with Hsp70 in structures identified as possible stress granules during heat shock, as well as it was concentrated in the cytoplasm during phagocytosis, while EhPRMTA increased its location within the nuclei in both conditions, suggesting the participation of EhPRMT5 and EhPRMTA in these events. On the other hand, EhPRMTA silencing showed that this enzyme negatively regulates growth and phagocytosis, and at the same time, it positively regulates cell migration and heat shock resistance. Such functions are similar to the ones performed by mammalian PRMT2.

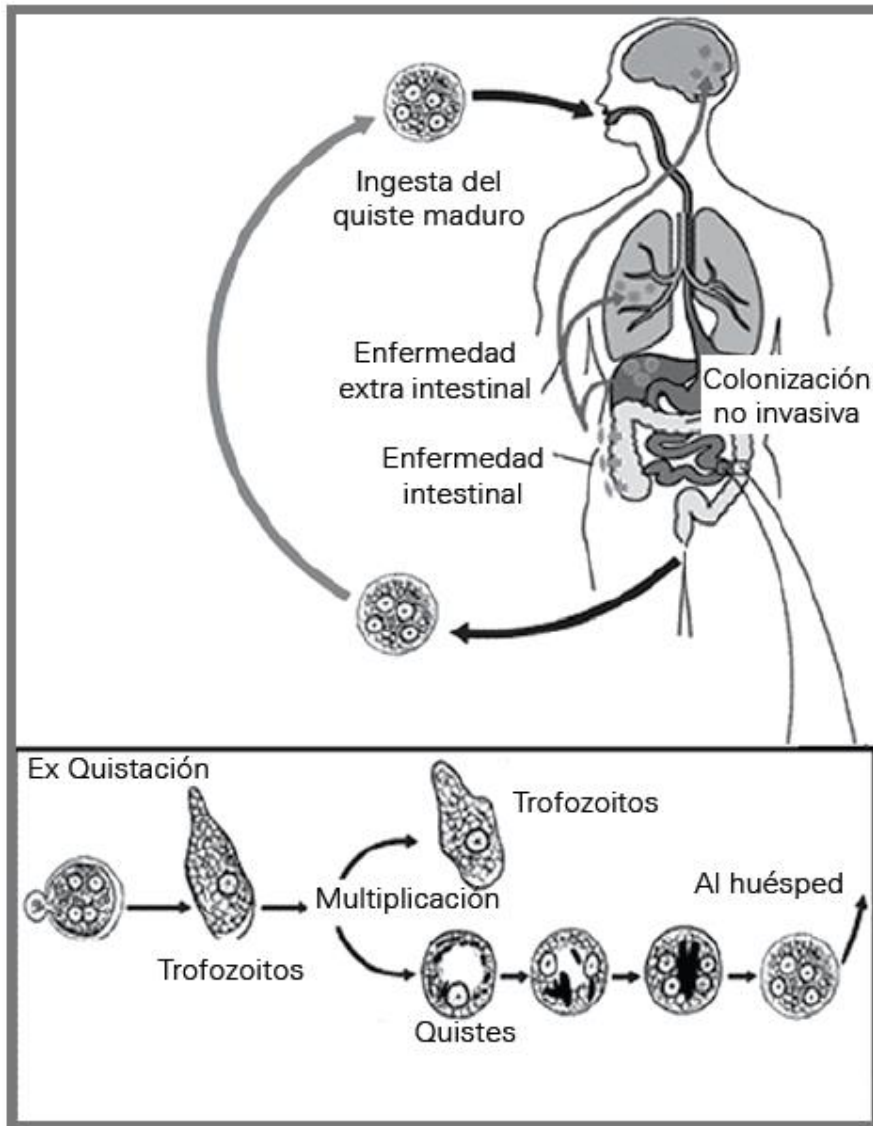
## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1 *Entamoeba histolytica*

*Entamoeba histolytica* es un parásito protozoario patogénico causante de la amibiasis en humanos, siendo una de las parasitosis más importantes en el mundo (Gómez *et al.* 2007). Esta infección ocurre de manera particular en países en vías de desarrollo, donde puede encontrarse de manera endémica en áreas como México, América Central, América del Sur, Asia, África y algunas islas del Pacífico (González *et al.* 2012). La transmisión del parásito se da por vía fecal-oral (Ali y Clark, 2008), siendo el humano el único hospedero conocido del parásito. Se calcula que existen aproximadamente de 48 a 50 millones de casos de amibiasis en todo el mundo, siendo el trópico la región con mayor incidencia de amibiasis. En México, *E. histolytica* es una de las principales causas de enfermedad entérica, donde hasta un 8.41% de la población tiene anticuerpos circulantes contra la amiba (González *et al.* 2012). Se considera también que el 10% de la población en el país está infectada, siendo la población más afectada los individuos menores de 15 años, y con un incremento marcado en niños de 5 a 9 años (Ximénez *et al.*, 2009).

La amibiasis se caracteriza de manera principal por disentería y dolor abdominal, donde puede existir diarrea acuosa con moco abundante (Chacín-Bonilla, 2013). La región del intestino grueso que sufre más afectaciones es el colon ascendente durante la colitis grave, donde puede haber disentería severa y pueden presentarse cuadros febriles y dolor abdominal (Tanyuksel *et al.*, 2003). La manifestación más frecuente de amibiasis extraintestinal es el absceso hepático por diseminación vía sanguínea a través de la vena porta desde el intestino, caracterizado por una mayor afección en lóbulo derecho del hígado, donde estudios en modelos animales han revelado que el daño tisular mayoritario es causado por la propia respuesta inflamatoria del hospedero y que puede resultar en la ruptura del absceso hacia otras cavidades, choque séptico y finalmente la muerte (Chacín-Bonilla, 2013). El parásito tiene un ciclo de vida simple que consiste en dos fases de desarrollo, la infectiva o quiste y la invasiva o trofozoíto

(González *et al.* 2012) (Fig. 1). La parasitosis se adquiere por ingestión de quistes que una vez en el intestino, se adhieren al lumen y sufren un desenquistamiento para dar lugar a 8 trofozoítos que se alimentan de las bacterias de la flora y se multiplican por fisión binaria (González *et al.*, 2012). Después de multiplicarse, los trofozoítos pueden agregarse, lo cual se cree puede desencadenar tanto el enquistamiento como la virulencia del parásito, dado que en esta fase de agregación las células liberan proteínas y activadores celulares que podrían fungir como auto-activadores de virulencia (Zaki *et al.*, 2006). Los trofozoítos en esta fase tienen un tamaño entre 20 y 40  $\mu\text{m}$ , y el único organelo típico identificable es el núcleo (Ximénez *et al.* 2007). Los trofozoítos pueden volverse invasivos y empezar a destruir la barrera epitelial del intestino, donde matan células del hospedero, inducen la sobreproducción de moco y de inflamación, provocando en última instancia disentería. La ruptura de la barrera epitelial del lumen intestinal provoca la pérdida de agua y sangre que se manifiestan en las heces (diarrea mucoide y sanguinolenta). A partir de este momento los trofozoítos pueden diseminarse hacia otros órganos (Faust y Guillen, *et al.* 2012), o sufrir enquistamiento y ser liberados en las heces (Fig. 1). Los quistes tienen la característica de ser redondos u ovaes y tienen un tamaño de 10 – 20  $\mu\text{m}$  de diámetro, son inmóviles y presentan una pared rígida de quitina que ayuda al quiste a sobrevivir fuera del huésped (González *et al.* 2012; Campos-Peralta *et al.*, 2011). Estos quistes pueden sobrevivir en tierra durante un tiempo aproximado de ocho días y si se mantienen en un rango de temperatura que oscile alrededor de los 10 °C pueden sobrevivir por un periodo de hasta un mes (Ximénez *et al.*, 2007). En los quistes se pueden observar de uno a cuatro núcleos correspondientes a los trofozoítos que surgirán de los mismos una vez que vuelvan a colonizar el intestino de otro hospedero.



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



## 1.2 Mecanismos de patogenicidad

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

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

Citolisis: una vez establecido el contacto con la célula blanco, el parásito induce diversos mecanismos citotóxicos para matar a las células del lumen intestinal. Algunos de ellos incluyen el aumento de  $Ca^{+2}$  intracelular (Marie y Petri, 2014), la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) (Ralston *et al.* 2011) y la pérdida de integridad de la membrana celular (Chacín-Bonilla, 2013; Marie y Petri, 2014), proceso que *E. histolytica* lleva a cabo mediante dos grupos de proteínas: las cisteína proteasas (CP) y los amebaporos (Campos-Peralta *et al.* 2011; Marie y Petri, 2014). Los amebaporos se insertan en la membrana con el objetivo de crear canales, modificando completamente el equilibrio iónico de la célula epitelial y provocando la muerte (Reyes y León, 2002). Se cree que los trofozoítos de *E. histolytica* son resistentes a la actividad de los amebaporos principalmente por la presencia de fosfolípidos neutros en su membrana, incapaces de unir a los

amebaporos (Reyes y León, 2002). Las cisteína proteasas (CP's) son proteasas de secreción que son críticas en el proceso invasivo por su capacidad de degradar componentes de la matriz extracelular, así como se ha demostrado la capacidad de estas proteínas de inactivar precursores de moléculas del sistema inmune, como IL-18, además de hidrolizar moléculas como C3, IgA, IgG y componentes del complemento (Que *et al.* 2003; Kelsall *et al.* 1993). A partir de la secuenciación del genoma de *E. histolytica* se ha deducido que existen aproximadamente 50 genes que codifican para CP's, las cuales son sintetizadas como precursores que contienen tres segmentos: un péptido-señal de 12 a 14 aminoácidos, un prodominio de 78 a 82 aminoácidos y el dominio catalítico de 216 hasta 225 aminoácidos (Ocádiz-Ruiz *et al.* 2005). Entre las CP's más estudiadas se encuentran las ACP1-3 y la EhCP5, que degradan proteínas de matriz como laminina, fibronectina, colágeno y elastina (Stanley y Reed, 2001; Campos-Peralta, 2011). Otra CP importante del parásito es EhCP112, que forma parte del complejo EhCPADH junto con una adhesina (EhADH112), y que también podría participar en la virulencia del parásito (Que *et al.* 2000; Ocádiz *et al.* 2005; Ocádiz-Ruiz *et al.*, 2013; Ocádiz-Ruiz *et al.*, 2016).

Fagocitosis: Este evento consiste en la ingestión por parte del parásito tanto de moléculas inertes como de fragmentos celulares y células vivas, las cuales pueden ser células de epitelio intestinal, eritrocitos y células del sistema inmune. Cuando los trofozoítos ingieren partículas cuyo contacto se realiza a través de fuerzas electrostáticas se denomina fagocitosis inespecífica (Bailey *et al.* 1990), mientras que la fagocitosis específica depende del contacto directo, es decir de los trofozoítos con las células blanco, ingiriéndolas vivas o lisadas (Arroyo y Orozco, 1987). Este proceso puede dividirse en varios pasos, de los cuales destacan primeramente la unión de las partículas o células a receptores de superficie de la célula fagocítica, la interacción entre los ligandos y los receptores que desencadenarán eventos como la reorganización del citoesqueleto y por tanto extensión de los pseudópodos, los cuales podrán rodear a la partícula o célula para formar el fagosoma, que se fusionará a los endosomas tardíos y permitirán la digestión de las partículas consumidas por la célula (Martínez-Palomo *et al.* 1985).

En este proceso pueden participar moléculas de superficie como la lectina Gal-GalNAc y la adhesina de 112 kDa, componentes del citoesqueleto y elementos que contribuyen a su estructuración, así como GTPasas pequeñas de la familia Rab, miosina IB, moléculas de señalización que inician vías específicas como la cinasa PI2-K, Rac A y la cinasa PAK que participan en la formación del fagolisosoma, donde los materiales ingeridos son degradados por la acción de proteasas, lisozimas, glicosidasas, amebaporos y fosfolipasas (Marion et al, 2005; Okada, 2006).

La eritrofagocitosis por parte del parásito ha sido propuesta como un indicador de patogenicidad y es considerada como una de las características más prominentes de la virulencia del parásito (Orozco *et al.* 1983). La endocitosis por parte del parásito conlleva cambios bioquímicos como el aumento en el consumo de oxígeno y glucosa, la actividad del ciclo de las pentosas y hexosas fosfato, y la producción de peróxido de hidrógeno (estallido respiratorio) (Loftus *et al.* 2005). Cuando la fagocitosis ocurre, se presenta el estallido respiratorio como parte de procesos metabólicos para remover el material endocitado (Talamás-Lara *et al.*, 2014). En la eritrofagocitosis se pueden apreciar también dos procesos importantes: un evento similar a opsonización de los eritrocitos por parte de los parásitos y la inducción de la exposición de fosfatidil-serina en la superficie de los eritrocitos, la cual estimula la polimerización de la actina en *E. histolytica*, que se conoce como un evento necesario para una fagocitosis eficiente (Talamás-Lara et al, 2014).

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

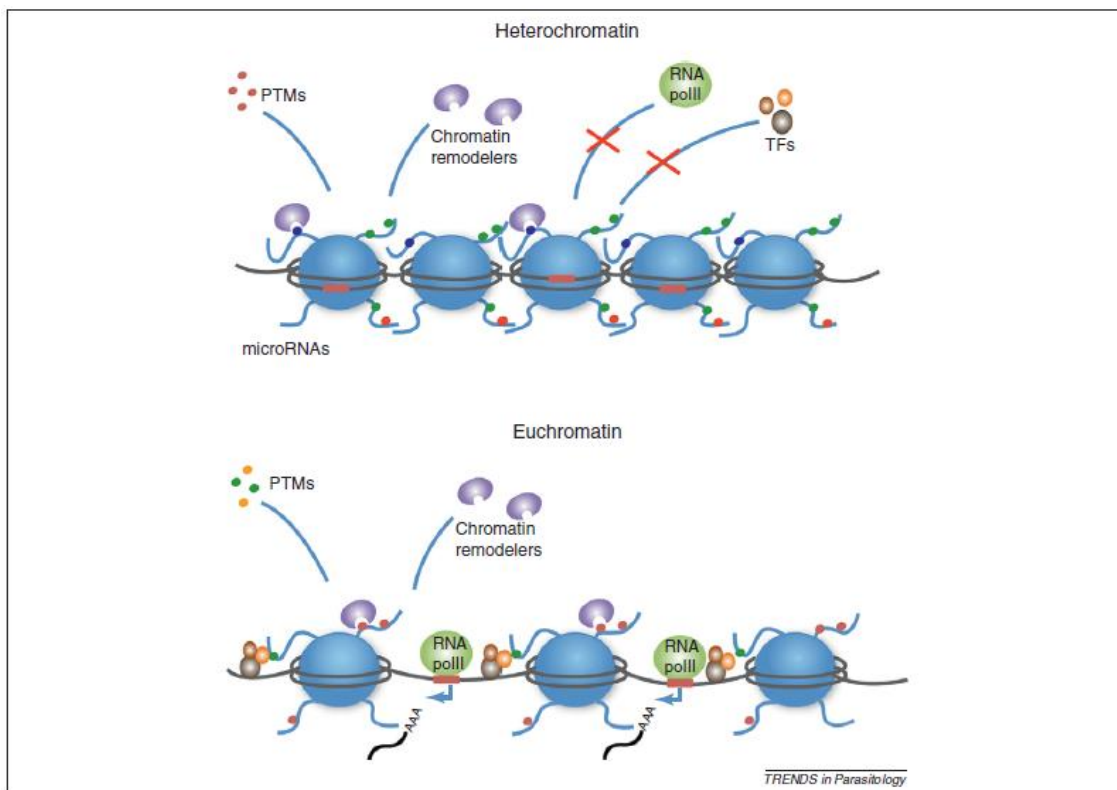
El genoma de *E. histolytica* tiene un tamaño aproximado de 20 Mb, el cual está constituido por un aproximado de 8,201 genes de 1.17 kb de longitud promedio, y que comprenden el 46% del genoma del parásito (Loftus *et al.*, 2005; Lorenzi *et al.* 2010). Se ha predicho también que un 25% de los genes contienen al menos un intrón y que hasta un 6% contienen múltiples intrones (Loftus *et al.*, 2005). Además, el 31.8% de las proteínas predichas no tienen homólogos en otros organismos, encontrándose cierto nivel de redundancia en los genes que codifican

para factores de virulencia (Loftus *et al.* 2005). La comparación de los genes amibianos que codifican para enzimas del metabolismo secundario con los de otros organismos, ha mostrado que a través de la evolución ha ocurrido pérdida secundaria de genes, así como también la transferencia horizontal de genes desde organismos como las bacterias (López *et al.* 2010). Debido a que el parásito sobrevive en un ambiente pobre en oxígeno como el intestino, éste ha evolucionado para ser un fermentador estricto, que utiliza enzimas similares a las de las bacterias para obtener energía de su principal fuente, la glucosa, por lo que carece también de enzimas pertenecientes a un metabolismo aeróbico, como las del ciclo de Krebs y de la cadena respiratoria (Loftus *et al.* 2005). Por la misma razón, se piensa que la presencia de bacterias y de metabolitos orgánicos preformados disponibles en el intestino ha sido otra de las razones de la eliminación de vías metabólicas, como la síntesis de aminoácidos, excepto la serina y la cisteína, así como la de síntesis de ácidos grasos, pero conservando la habilidad de sintetizar fosfolípidos (Loftus *et al.* 2005; Marie y Petri, 2014). Este parásito también carece de la capacidad de sintetizar purinas, pirimidinas y timidilatos, los cuales debe obtener a través de rutas de salvamento (Abrahamsen *et al.* 2004).

#### **1.4 Regulación de la cromatina**

Diversos procesos necesitan realizarse para que los genes se encuentren disponibles a las maquinarias de transcripción, ya que el DNA en las células eucariotas se encuentra compartimentalizado en el núcleo celular unido estrechamente a proteínas histonas, formando la cromatina (Zhang y Reinberg, 2001). El empaquetamiento de la cromatina es importante ya que influye en cuanto a su viabilidad para ser molde para la transcripción y, por tanto, para la expresión genética. En su forma más empaquetada tiene efectos represores ya que las secuencias reguladoras anteriormente mencionadas deben estar expuestas para ser blanco de los factores de transcripción y que los genes puedan expresarse (Recillas y Escamilla, 2004).

La regulación epigenética se refiere a la inducción de cambios en la estructura de la cromatina, y éstos pueden tener efecto en la regulación de la expresión de genes (Croken *et al.* 2012). Los cambios epigenéticos pueden definirse como cualquier cambio heredable en la expresión de los genes sin que se modifique la secuencia de DNA, de manera que la información contenida puede transmitirse a la siguiente generación (Croken *et al.* 2012). Estos cambios pueden darse por modificación de la estructura de la cromatina (Croken *et al.* 2012), la cual resulta en cambios que permiten el acceso al DNA de complejos transcripcionales y a las polimerasas, produciendo DNA accesible o eucromatina, o DNA compacto o heterocromatina (Mirelman *et al.*, 2008; Croken *et al.* 2012) (Fig. 2).



**Fig. 2. Conversión de la cromatina a heterocromatina y eucromatina por modificaciones al DNA o a proteínas histonas:** La heterocromatina es un estado compacto con modificaciones post-traduccionales (PTMs) que previenen el acceso a la RNA polimerasa II (RNA pol II) y factores transcripcionales (TFs). La eucromatina es un estado de cromatina abierta mantenida por complejos moleculares para permitir el acceso a los complejos antes mencionados. (Tomada de Croken *et al.* 2012).

## **1.5 Modificaciones postraduccionales de proteínas**

Las proteínas pueden sufrir numerosas modificaciones químicas en su estructura que tienen importantes efectos moduladores y pueden conllevar el encendido o apagado de su función biológica, alterar su localización celular, su capacidad para interactuar con otras proteínas o determinar que la proteína debe ser degradada (Morales *et al.*, 2016). Estas modificaciones que ocurren en las proteínas sintetizadas son las modificaciones postraduccionales y pueden tener lugar mediante mecanismos enzimáticos o no enzimáticos. La naturaleza de las modificaciones puede ser variada, ya que las proteínas pueden sufrir oxidación, glicosilación, acetilación, proteólisis, fosforilación, metilación y ubiquitinación, entre otras (Pérez-Sala, 2012). Con esto, la estructura y funciones de las proteínas aumenta para dar lugar a una extensa variedad de especies que pueden desempeñar distintas funciones celulares, como la regulación de respuestas celulares, amplificación de una señal para su posterior transmisión entre compartimentos distantes de la célula, metabolismo de biomoléculas, participación en la respuesta a fármacos, etc. (Pérez-Sala, 2012; Biggar y Li, 2015).

## **1.6 Metilación de proteínas histonas y no histonas**

Los extremos N-terminal de las histonas sobresalen de la estructura globular de los nucleosomas. Éstas son regiones ricas en residuos que pueden ser blanco de modificaciones como acetilaciones, metilaciones y fosforilaciones, entre otras, las cuales en diversas combinaciones pueden afectar positiva o negativamente el nivel de compactación de la cromatina (Recillas y Escamilla, 2004).

Las modificaciones post-traduccionales de las histonas son llevadas a cabo por enzimas modificadoras hacia sus dominios globulares y en sus extremos N-terminales, siendo las más estudiadas la acetilación y la metilación, dándose ésta última de manera principal en los residuos de lisina y arginina de las histonas H3 y H4 (Rice y Allis, 2001; Karkhanis *et al.* 2011). Las modificaciones a las cuatro histonas principales (H2A, H2B, H3 y H4) forman el “código de histonas” para

dictar expresión de genes, promoviendo su expresión o represión, entre otras funciones (Biggar y Li, 2015).

Además de afectar las propiedades físicas de la cromatina actuando sobre las histonas; la metilación de residuos de lisina o arginina en proteínas no histonas ha surgido como una modificación postraduccional importante debido a su participación en funciones regulatorias en un amplio rango de procesos celulares (Zhang et al. 2012; Biggar y Li, 2015). Se puede establecer el modelo de “escritor-lector-borrador” para este tipo de modificación. Como un ejemplo, en una metilación en un residuo de arginina, la metiltransferasa funge como un “escritor” al agregar el grupo metilo al residuo en un sustrato dado, esto se traducirá en cambios en la actividad o localización de la proteína sustrato o provocará que la proteína pueda interactuar con proteínas “lectoras” (efectoras), para posteriormente y una vez terminado el estímulo, la señal sea removida por un “borrador” para devolver el sustrato a su estado basal (Biswas y Rao, 2018).

Las proteínas metiltransferasas tienen la capacidad de metilar proteínas histonas y no histonas, siendo estas últimas proteínas que participan en funciones como replicación, síntesis y reparación de DNA, síntesis de proteínas, metabolismo de RNA, progreso del ciclo celular, apoptosis, transducción de señales y en respuesta a estímulos de estrés (Wei et al, 2014). Como un ejemplo, la proteína p53, que participa en la regulación del ciclo celular y apoptosis, es metilada tanto en residuos de arginina como de lisina. En el caso de su metilación en arginina, tiene un rol crucial en la apoptosis inducida por daño de DNA, además de que una sobreexpresión de una metiltransferasa de arginina aumenta el arresto del ciclo celular dependiente de p53 (Wei *et al.* 2014). Para el caso de lisina, la monometilación de p53 reprime la transcripción, mientras que la dimetilación aumenta su capacidad transcripcional (Wei *et al.* 2014). La metilación también puede ocurrir en proteínas de vías de señalización como RAF, teniendo como efecto la disminución en la fosforilación de factores como ERK1 y ERK2 (Biggar y Li, 2015). Otras proteínas que sufren el mismo efecto son las MAP cinasas o las proteínas JAK-STAT, con diversos efectos (Wei et al, 2014; Biggar y Li, 2015).

El punto final de la transducción de señales es comúnmente definido por cambios específicos en la transcripción de genes. Para que la transcripción ocurra, la cromatina debe estar en una forma abierta para permitir el acceso a los factores de transcripción, polimerasas y otras proteínas regulatorias (Fig. 2). Ya que la metilación de histonas juega una parte importante para definir la estructura de la cromatina, es importante entender cómo la metilación de histonas está integrada con la metilación de proteínas no histonas para regular procesos nucleares.

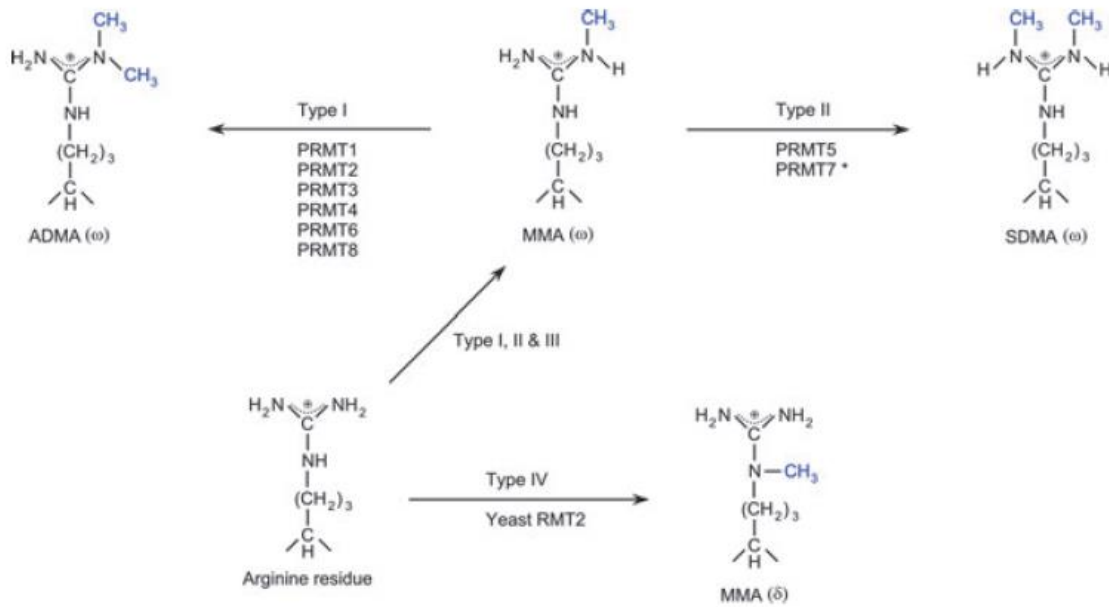
### **1.7 Proteínas metiltransferasas de arginina (PRMT's)**

A diferencia de la acetilación y la fosforilación, la metilación no cambia la carga de las proteínas, lo que ha dificultado la identificación de las enzimas responsables de este proceso (Strahl y Allis, 2000). Durante los últimos años se esclareció que las enzimas que se encargan de adicionar los grupos metilo a las histonas (desde 1 hasta 3 grupos) son las metiltransferasas de histonas. Estas enzimas transfieren los metilos hacia residuos de arginina (R) o lisina (K) situados en los extremos N-terminales de las histonas (Zhang *et al.* 2012). Las metil-transferasas se dividen en dos grupos principales: las metiltransferasas de lisina (PKMT's) y las metiltransferasas de arginina (PRMT's). Estas enzimas transfieren los grupos metilo a partir del sustrato S-adenosil-L-metionina (Adomet o SAM) a residuos de R y K en las proteínas, formando los productos S-adenosil-L-homocisteína y metil-argininas o metil-lisinas (Volkel y Angrand, 2006; Lakowski *et al.* 2009).

En el humano se han descubierto hasta el momento 10 isoformas de PRMTs: PRMT1-PRMT10. Todas tienen motivos conservados en sus dominios catalíticos, aunque no se ha demostrado actividad de metiltransferasa para PRMT10 (Hirouchi *et al.* 2013, Wei *et al.* 2014). Estas proteínas se han clasificado de acuerdo a la naturaleza del producto metilado que resulta de la reacción: las enzimas de tipo I, monometilan (MMA) y dimetilan asimétricamente (ADMA) residuos de arginina ( $\omega$ -N<sup>G</sup>-monometil y  $\omega$ -N<sup>G</sup>,N<sup>G</sup>-dimetil arginina respectivamente); las enzimas tipo II monometilan y dimetilan simétricamente (SDMA) a los residuos de arginina ( $\omega$ -N<sup>G</sup>-monometil y  $\omega$ -N<sup>G</sup>,N<sup>G</sup>-dimetil arginina respectivamente) (Lee *et al.* 2005; Wang *et al.* 2012; Hirouchi *et al.* 2013) (Fig. 3). Las enzimas de tipo III y IV solo realizan la



monometilación, las de tipo III dan como resultado  $\omega$ -N<sup>G</sup>-monometil arginina (MMA), mientras que las de tipo IV catalizan la formación de  $\delta$ -N<sup>G</sup>-metilarginina, esta última se ha reportado únicamente en la enzima RMT2 de levadura (Bedford y Clarke, 2009; Wang y Li, 2012). La forma en que dos grupos metilo pueden ser adicionados al residuo de arginina correspondiente son la procesiva o la distributiva (Morales *et al.* 2016), en donde la primera consiste en dos reacciones de metilación que ocurren por cada evento de unión enzima-sustrato, mientras que la segunda consiste en que un producto monometilado se disocia de la enzima después de una sola reacción de metilación y posteriormente se realiza la adición del segundo metilo. En este modelo la dimetilación es posible, con la condición de que los niveles del producto dimetilado incrementen una vez que la concentración del sustrato monometilado sea suficiente para competir con el sustrato sin modificaciones para la unión. Esto determinará el tipo de producto que se formará de cada enzima (Morales *et al.* 2016). En un estudio se demostró que la PRMT5 de humano (HsPRMT5) sola o en complejo con la proteína MEP50 cataliza la dimetilación de sustratos de manera distributiva, además de que se demostró que los sitios distantes del sitio de metilación son importantes para el reconocimiento del sustrato por parte de la enzima (Wang *et al.* 2014).



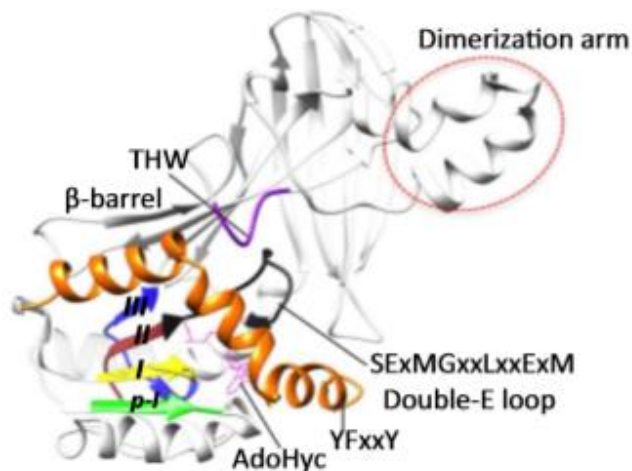
**Fig. 3. Tipos de metilación de los residuos de arginina y tipos de proteínas metiltransferasas de arginina (PRMT's).** Las PRMT's se han clasificado de acuerdo a la naturaleza del producto metilado, monometilación (MMA), dimetilación asimétrica (ADMA) o dimetilación simétrica (SDMA) (Tomada de Wang *et al.* 2012).

Las PRMT's tienen como sustrato proteínas que contienen motivos ricos en glicina y arginina (GAR) en secuencia RGG, RG o RXG (Fan *et al.*, 2009; Wang y Li, 2012). La metilación de argininas por las PRMT's está involucrada en diversos procesos bioquímicos y biológicos, como la transducción de señales, la proliferación celular, la regulación de la transcripción y el "splicing" de RNA (Hirouchi *et al.* 2013). Entre las PRMT's más estudiadas se encuentra PRMT1 y PRMT5, enzimas características por ser las representantes de los grupos I y II respectivamente, y porque se han encontrado homólogos de ambas en diversos organismos (Fisk y Read, 2011). El análisis de PRMT1 ha demostrado que para su función la enzima debe dimerizarse, y que esta oligomerización podría favorecer la actividad enzimática, donde argininas monometiladas podrían recibir el segundo grupo metilo por sitios activos adyacentes sin necesidad de la liberación del sustrato (forma distributiva) (Bachand 2007). Esta enzima se encuentra localizada en el citoplasma y en el núcleo celular, aunque hasta el momento no se conoce la

manera en que es importada al interior nuclear; referente a este aspecto, un estudio demostró que PRMT1 se acumula en el núcleo cuando la metilación se inhibe, uniéndose a sustratos no metilados hasta que la reacción de metilación es completada, regresando posteriormente al citoplasma, su ubicación principal (Herrmann *et al.* 2005). A esta proteína se han asociado dos funciones principales: biogénesis de mRNA y formación de heterocromatina (Herrmann *et al.* 2005). En la primera, se ha observado que PRMT1 es reclutada a genes transcripcionalmente activos, y que la metilación de argininas por esta enzima está involucrada en la síntesis de mRNA para la liberación de RNP's mensajeras desde los sitios de transcripción y su consecuente exporte nuclear (Bachand 2007). Se ha observado además que los sustratos mayoritarios de esta enzima en humano son proteínas nucleares como las histonas H3 y H4, además de fibrilarina y nucleolina (involucradas en procesamiento y biogénesis de pre-mRNA y ribosomas) (Herrmann *et al.* 2005).

La estructura de una proteína metiltransferasa de arginina canónica comprende dos estructuras principales: el sitio de unión de Adomet (también conocido como el extremo N-terminal de Rossmann), y el dominio C-terminal el cual es un barril beta (Tewary *et al.* 2019) (Fig. 4). La estructura contiene un brazo de dimerización el cual surge a partir del barril beta hacia el sitio de unión a Adomet (Fisk y Read, 2011; Cura *et al.* 2013); las proteínas metiltransferasas de arginina deben mantener un estado de dímero para ser activas funcionalmente. En las PRMT's de tipo I y III, existen tres hélices dinámicas en el extremo N-terminal de Rossmann que participan en la unión a Adomet (Fig. 4) y su núcleo catalítico es muy similar en las PRMT's (Tewary *et al.* 2019). Este último está compuesto por seis motivos característicos indispensables para la función de transferencia de grupos metilo (Fig. 4): el motivo I (VLD/VGxGxG) forma el núcleo de unión a Adomet y contiene tres glicinas conservadas en todas las PRMT's; el post motivo I (V/I-X-G/A-X-D/E) forma las interacciones de unión a hidrogeno con la parte media de ribosa del Adomet a través de un residuo de ácido glutámico o aspártico; el motivo II (E/K/VDII) estabiliza al motivo I a través de la formación de una hoja beta; el motivo doble-E contiene la secuencia SExMGxxLxxExM en donde los dos residuos

de ácido glutámico posicionan la arginina sustrato; el motivo III (LK/xxGxxxP) forma una hoja beta paralela al motivo II y por último el bucle crítico THW, localizado cerca del sitio activo, el cual es importante para la unión al sustrato así como para la estabilización de la hélice alfa del extremo N-terminal (Fig. 4) (Wei et al, 2014). La molécula usada como donador de grupos metilo por las enzimas metiltransferasas de arginina, el Adomet, es un compuesto pequeño, el cual después de la transferencia de metilo, produce S-adenosil homo cisteína (Adohcy). Ambos compuestos están formados químicamente por cuatro partes: un anillo de adenina, un anillo de ribosil, un átomo de azufre que sostiene el grupo metilo y dos extremos amino y carboxilato (Tewary et al. 2019).



**Fig. 4. Estructura general de las proteínas metil-transferasas de arginina:** En este modelo de la PRMT1 de *Danio rerio* se observan los seis motivos característicos en el sitio activo para la función enzimática: I en amarillo, post-I en verde, II en café, III en azul, bucle doble-E SexMGxxLxxExM en negro y el bucle THW en rosa. El motivo FYxxY, el cual forma parte de la hélice alfa del extremo N-terminal juega un rol clave en la unión de Adomet (Tomado de Tewary *et al.* 2019).

A pesar de que aún no se comprende del todo el mecanismo de reconocimiento de los residuos de arginina sustrato por parte de las PRMT's, se sabe que el sitio de unión del residuo de arginina está provisto de dos residuos de ácido glutámico en el motivo doble-E (conservados en todas las enzimas PRMT's) en donde la superficie catalítica está negativamente cargada para poder atrapar al grupo guanidino de la arginina, positivamente cargado (Tewary *et al.* 2019). El mecanismo de catálisis aceptado involucra estos dos residuos de glutamato, los cuales posicionan el grupo guanidino para permitir la transferencia del grupo metilo desde el Adomet, en donde el primero contribuye al alineamiento por una interacción electrostática y el segundo participa en la unión vía hidrógeno (Tewary *et al.* 2019).

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

Las enzimas PRMT's comparten ciertas características dependiendo de su tipo de actividad. Las de tipo I contienen dos aminoácidos conservados que pertenecen al

sitio de unión con el donador de metilos S-adenosilmetionina, los cuales son una serina (S) y una tirosina (Y) localizados en las posiciones 217 y 154, respectivamente, de la enzima PRMT4 (CARM1) y se identificó que la fosforilación en el residuo S217 impide la unión al Adomet y por lo tanto se inhibe su actividad de metiltransferasa (Feng *et al.* 2009). En cuanto a Y154, la unión del intermediario S-adenosilhomocisteína provoca una reorientación del grupo hidroxilo de S217 que forma un puente de hidrógeno fuerte con un oxígeno carbonilo de Y154, el cual es crítico para la unión del Adomet (Feng *et al.* 2009). Se desconocen las cinasas responsables de la fosforilación y desfosforilación de esos residuos, así como también el sitio celular donde se lleva a cabo este proceso. Notablemente, estos residuos no se encuentran en enzimas de tipo II (Feng *et al.* 2009).

## **2. ANTECEDENTES**

### **2.1 PRMT's en otros parásitos**

La metilación de argininas parece ser una modificación evolutivamente antigua, aunque ausente en procariotas. Los protozoarios forman parte de una de las primeras ramas en la evolución del linaje eucariota, y varios grupos de ellos son parásitos importantes para el humano y otras especies. La secuenciación y registro de los genomas de eucariotas unicelulares ha permitido la comparación y el hallazgo de homólogos de PRMT's en estos organismos. Los diversos análisis revelan que *prmt1*, *prmt3* y *prmt5* son los genes codificantes para metiltransferasas de arginina más conservados a lo largo de la evolución de los eucariotas (Bachand, 2007). Además, se ha observado que PRMT2, PRMT8 y PRMT9 al parecer no tienen homólogos en eucariotas unicelulares, las cuales pudieron haber evolucionado como enzimas requeridas para funciones de tejidos específicos en organismos multicelulares (Bachand, 2007).

Existen diversos parásitos protozoarios de importancia en salud para el humano, en donde a pesar de los estudios realizados hasta el momento, el conocimiento acerca de la metilación a argininas, así como los mecanismos e importancia es

limitado. Los parásitos en donde más se han hecho estudios con respecto a estas proteínas contienen al menos una PRMT tipo I homóloga a la PRMT1 de humano (HsPRMT1) y al menos una de tipo II homóloga a la PRMT5 (HsPRMT5), siendo diferente el número y tipo de PRMT's potenciales en cada especie, y en donde los más estudiados han sido *Toxoplasma gondii*, *Plasmodium falciparum* y *Trypanosoma brucei* (Fisk y Read, 2011).

En *T. gondii* se han identificado cinco PRMT's, de las cuales se han caracterizado las PRMT1 y PRMT4 (CARM1), con actividad enzimática de metiltransferasa y que en ensayos *in vitro* metilan H4R3 y H3R17, respectivamente (Saksouk *et al.* 2005). Además, este parásito cuenta con un homólogo a PRMT5 (tipo II), y homólogos a PRMT3 y 6 (Fisk y Read. 2011). En presencia de ATP y de proteínas con actividad SWI/SNF (remodelación de cromatina), CARM1 aumentó su habilidad para metilar *in vitro* histonas nucleosomales, lo que sugiere que esta enzima podría actuar en combinación con otros elementos para la remodelación de la cromatina *in vivo* (Fisk y Read, 2011). PRMT4 parece ser esencial en la inducción de formación de bradizoítos, mientras que PRMT1 (TgPRMT1) se encuentra asociada a la expresión de genes durante las fases de taquizoítos y bradizoítos, así como también parece participar en la regulación de la división celular (Gissot *et al.* 2007). Se ha observado también que TgPRMT1 co-precipita con un ortólogo de la proteína Argonauta (TgAgo), que participa en el mecanismo de silenciamiento mediante RNA interferente (Croken *et al.* 2012). También la metilación de TgAgo se relaciona con el reclutamiento de la nucleasa estafilocócica Tudor (TSN), que posee una mayor actividad de procesamiento de RNA interferente comparada con TgAgo, lo que significaría que, aunque TgPRMT1 puede metilar histonas, la metilación de proteínas no histonas podrían ser más significativa en la sobrevivencia del parásito (Croken *et al.* 2012). TgPRMT1 además contribuye de manera importante al monometiloma del parásito, en donde su ausencia se ve relacionada con una ausencia importante de productos monometilados, en las cuales se encuentran proteínas cinasas y de unión a RNA, con lo cual TgPRMT1 es un regulador importante de MMA e indirectamente de la actividad de MMA en el

núcleo, así como también de la regulación de puntos de control de ciclo celular en este organismo (Yakubu *et al.* 2017).

El genoma de *P. falciparum* codifica únicamente para tres PRMT's putativas, que incluyen los correspondientes homólogos de PRMT1 y PRMT5 (Fisk, Read. 2011). PfPRMT1 recombinante es capaz de metilar a la histona H4 en R3 y a H2A (función *in vivo* desconocida), formando MMA y ADMA (Fan *et al.* 2009). Estas metilaciones son dinámicas durante el desarrollo del parásito, donde se observa además que los patrones incrementan a medida que el organismo madura, concretamente en trofozoítos tardíos y esquizontes (Fan *et al.*, 2009). En este mismo estudio se encontró también que PfPRMT1 logra la metilación de sustratos proteicos originarios del parásito, como fibrilarina y PABPII, ambas participantes de la síntesis y procesamiento de mRNA, además de una proteína similar a un factor de splicing. Por otro lado, se ha observado que el nivel de RNA codificante para la PfPRMT5 sufre un decremento durante la fase de esquizonte (Fisk y Read, 2011). Además, se ha observado que el residuo R17 de la histona H3 está metilado, modificación que posiblemente sea llevada a cabo por la PRMT de *P. falciparum* con homología a CARM1 (PRMT4) (Trelle *et al.* 2009).

Los cinetoplástidos, como *T. brucei*, son el grupo de parásitos en donde se ha realizado la mayor investigación en metilación de argininas. Este parásito tiene cinco PRMT's putativas, que incluyen también los homólogos de PRMT1 y PRMT5 (Fisk y Read, 2011). PRMT1 tiene una conservación en la secuencia de aminoácidos de aproximadamente 50% con sus homólogos de humano y levadura, y es capaz de formar estructuras oligoméricas *in vitro* (Pelletier *et al.* 2005). En un estudio se demostró que la enzima tiene actividad de tipo I y que realiza la metilación de forma distributiva, pero no es esencial para la sobrevivencia de la forma procíclica del parásito (Pelletier *et al.* 2005). *T. brucei* tiene una proteína homóloga a PRMT7, la cual a través de cromatografía de intercambio iónico se observó que la forma de incorporación del grupo metilo era enteramente de tipo MMA, concluyendo que TbPRMT7 es una enzima de clase III, por lo que se postula que podría actuar en conjunto con las otras PRMT's del



parásito participando en la adición del primer grupo metilo a los sustratos de las metiltransferasas de tipo I y II para producir ADMA o SDMA (Fisk *et al.* 2009). Los niveles de RNA del gen codificante para TbPRMT7 disminuyen un 60% en la transición de fase logarítmica hacia la fase estacionaria en la forma procíclica, y se incrementan hasta 30% durante la diferenciación de la fase sanguínea a la fase procíclica (Fisk y Read, 2011). El parásito tiene también una proteína homóloga a PRMT6, la cual en humano tiene funciones en la reparación del DNA y en el control transcripcional (Wei *et al.* 2014). Se ha demostrado que la proteína es capaz de metilar histonas *in vitro*, además de tener una localización subcelular casi exclusivamente citoplasmática (Fisk *et al.*, 2010). La proteína TbPRMT6 tiene capacidad de autometilación, además de ser más selectiva que sus homólogas en cuanto a sus sustratos (Fisk *et al.* 2010). Su desregulación tiene consecuencias en el crecimiento celular, ya que en las formas procíclicas y sanguíneas las células inician la división celular, pero no logran completarla, por lo que TbPRMT6 podría participar activamente en el crecimiento celular y en la citocinesis (Fisk *et al.* 2010). Además, TbPRMT6 tiene interacción con proteínas del poro nuclear, indicando que la enzima podría tener función de proteína acarreadora (Fisk *et al.* 2010). La proteína homóloga a PRMT5 (de tipo II) es una proteína constitutiva en las formas sanguíneas y procíclicas y no es esencial para el crecimiento (Pasternack *et al.* 2007). *In vitro*, TbPRMT5 metila histonas y otras proteínas, como la proteína básica de mielina y RBP16 (Pasternack *et al.* 2007). TbPRMT5 se encuentra localizada mayoritariamente en el citoplasma al igual que su homóloga de humano, así como también puede interactuar con una helicasa de RNA putativa asociada a factores de inicio de la transcripción (Pasternack *et al.* 2007).

## **2.2 PRMT's en *Entamoeba histolytica***

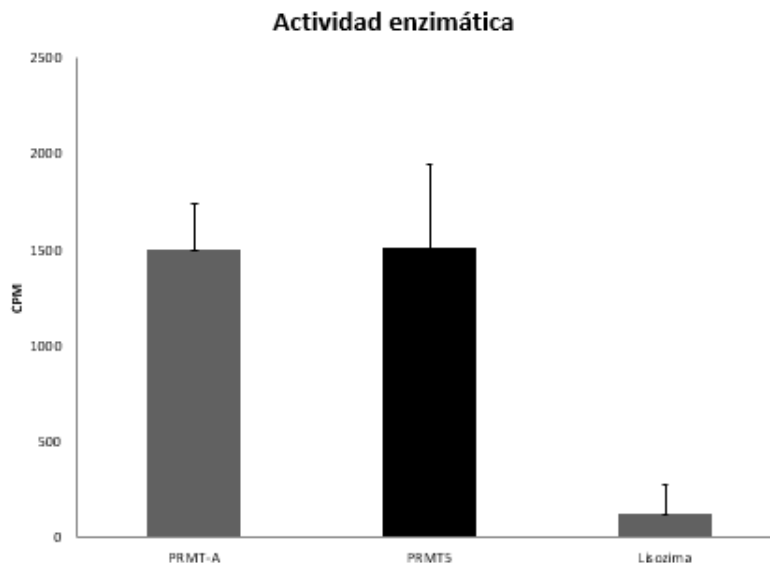
Mediante análisis *in silico* se identificó la presencia de cinco PRMT's putativas en *E. histolytica* (Fisk y Read, 2011), en donde originalmente se sugirió que cuatro de ellas eran homólogas a PRMT1 y una a PRMT5. Sin embargo, Borbolla-Vázquez *et al.* (2015) reportaron una relación filogenética de tres de estas PRMTs de *E.*

*histolytica* (EhPRMTs) con la PRMT1 de humano, llamándolas EhPRMT1a, EhPRMT1b y EhPRMT1c; otra de las EhPRMTs mostró relación filogenética con PRMT5, por lo que se le denominó EhPRMT5, mientras que la proteína restante no mostró homología significativa con alguna otra PRMT, por lo que se consideró como una PRMT atípica (EhPRMT-A) (Borbolla-Vázquez *et al.* 2015).

Mediante ensayos de RT-PCR se demostró la expresión de las cinco EhPRMTs en los trofozoítos de *E. histolytica* y utilizando un anticuerpo contra la PRMT1 de humano en ensayos de Western blot se identificaron de dos a tres bandas de 37 a 38 kDa en extractos totales de amiba, sugiriendo la expresión de las tres EhPRMT1 a nivel proteico (Borbolla-Vázquez *et al.*, 2015). Además, mediante inmunofluorescencia, EhPRMT1a-c se localizaron tanto en el núcleo como en el citoplasma de los trofozoítos (Borbolla-Vázquez *et al.*, 2015). Adicionalmente, la proteína recombinante EhPRMT1a mostró actividad de metiltransferasa sobre histonas comerciales de ternera y específicamente se detectó la dimetilación asimétrica de H4R3 (Borbolla-Vázquez *et al.*, 2015). Debido a la alta homología que presentan las tres EhPRMT1, se sugirió una actividad redundante de las tres enzimas.

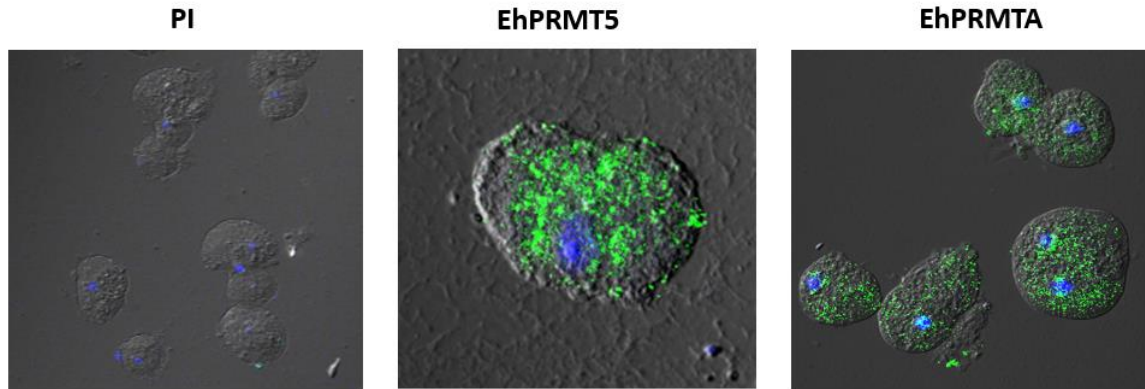
En nuestro trabajo de maestría (Medina-Gómez, 2015) se realizó la caracterización parcial de las dos PRMT's restantes (EhPRMT5 y EhPRMT-A). El alineamiento de la secuencia de aminoácidos de EhPRMT5 con la de su homóloga de humano reveló un 30.6% de identidad, mientras que el alineamiento de EhPRMTA con todas las PRMT's de humano, mostró una mayor identidad de esta proteína con PRMT1, 3, 6 y 8 de humano (HsPRMT1, 3, 6 y 8), en donde todas ellas forman parte de las enzimas de tipo I (Medina-Gómez, 2015). Se obtuvieron ambas proteínas de manera recombinante con el fin de usarlas en ensayos de actividad enzimática y además para obtener anticuerpos específicos contra cada una. En los ensayos de actividad enzimática utilizando las proteínas recombinantes de EhPRMT5 y EhPRMTA y de Adomet acoplado a tritio ([H<sup>3</sup>]Adomet) se encontró que ambas enzimas logran la transferencia de grupos

metilo a una mezcla de histonas comerciales de ternera (Medina-Gómez, 2015) (Fig. 5).



**Fig. 5. Ensayos de actividad enzimática *in vitro* de EhPRMT5 y EhPRMTA.** Las proteínas recombinantes de EhPRMT5 y EhPRMTA o lisozima (control negativo) se pusieron en contacto con histonas comerciales en presencia de [<sup>3</sup>H]AdoMet. Posteriormente se midió la incorporación de [<sup>3</sup>H] en las histonas (Medina-Gómez, 2015).

Los ensayos de inmunofluorescencia realizados en trofozoítos de *E. histolytica* utilizando los anticuerpos contra las proteínas recombinantes revelaron que EhPRMT5 se encuentra de manera casi exclusiva en el citoplasma, mientras que EhPRMTA se encontró distribuida también a lo largo del citoplasma, así como alrededor y en el interior de los núcleos (Medina-Gómez, 2015) (Fig. 6). Sin embargo, hasta el momento no se conoce si EhPRMT5 y EhPRMTA tienen participación en algún proceso de importancia para la sobrevivencia del parásito o en su virulencia y patogenicidad.



**Fig. 6. Localización subcelular de EhPRMT5 y EhPRMTA en trofozoítos de *E. histolytica*.** Los trofozoítos de *E. histolytica* se fijaron, permeabilizaron e incubaron con los anticuerpos contra las proteínas recombinantes de EhPRMT5 y EhPRMTA y posteriormente con un anticuerpo secundario acoplado a Alexa 488 (verde). Los núcleos se contratiñeron con DAPI (azul) y las muestras se analizaron por microscopía confocal. PI, suero pre-inmune (Medina-Gómez, 2015).

### 3. JUSTIFICACIÓN

El estudio de las metiltransferasas de arginina ha aumentado su importancia, debido a que se ha observado la participación de estas enzimas en procesos celulares de gran importancia, incluyendo vías de señalización para la diferenciación celular, reparación de DNA, ciclo celular y activación o represión de la transcripción, entre otros. En nuestro grupo de trabajo se identificaron cinco genes que codifican PRMTs en *E. histolytica* y se caracterizó la actividad enzimática y la localización subcelular de una de las homólogas a PRMT1 (Borbolla-Vázquez *et al.*, 2015), así como también ya se conoce la actividad de metiltransferasa de las otras dos PRMTs (PRMT5 y PRMTA) y su localización subcelular en trofozoítos de *E. histolytica*. Sin embargo, hasta el momento no se conoce su participación en los procesos de la vida del parásito, así como la manera en que interaccionan con otras proteínas y sus sustratos potenciales. Por lo tanto, es necesario conocer los procesos biológicos en los que intervienen y si dicha participación es importante para la sobrevivencia, virulencia y/o patogenicidad del parásito.

#### **4. HIPÓTESIS**

Las proteínas PRMT5 y PRMTA de *E. histolytica* participan en procesos celulares relacionados con virulencia y en la respuesta del parásito a condiciones de estrés.

#### **5. OBJETIVO GENERAL**

Caracterizar el papel de las enzimas metil-transferasas de arginina PRMT5 y PRMTA de *Entamoeba histolytica* en la respuesta a choque térmico y en la virulencia *in vitro*.

##### **5.1 Objetivos particulares**

1. Analizar *in silico* la proteína EhPRMT5 en *E. histolytica*.
2. Evaluar la expresión y localización subcelular de la proteína EhPRMT5 durante la eritrofagocitosis y el choque térmico.
3. Analizar *in silico* la proteína EhPRMTA en *E. histolytica*.
4. Evaluar la expresión y localización subcelular de la proteína EhPRMTA durante la eritrofagocitosis y el choque térmico.
5. Evaluar el efecto del silenciamiento de la proteína EhPRMTA en la respuesta a choque térmico y en factores asociados a la virulencia *in vitro* del parásito.

## 6. MATERIALES Y MÉTODOS

### 6.1 Análisis *in silico* de las proteínas EhPRMT5 y EhPRMTA

A partir de las secuencias de aminoácidos de EhPRMT5 y EhPRMTA reportadas en AmoebaDB (<https://amoebadb.org/amoeba>, números de acceso EH\_158560 y EH\_159180, respectivamente) se obtuvo su estructura tridimensional utilizando el servidor I-TASSER (<https://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER>). Se obtuvieron también las estructuras tridimensionales de las proteínas RnPRMT1, HsPRMT2 y HsPRMT5 (NP\_077339.1, AAI00027.1 y AAH25979.1, respectivamente). Para el análisis comparativo se usó el programa Chimera 1.13rc (<https://www.cgl.ucsf.edu/chimera>). La búsqueda de dominios de las proteínas se realizó utilizando el servidor Interpro (<https://www.ebi.ac.uk/interpro>), mientras que los alineamientos correspondientes fueron realizados usando el servidor TCOFFEE (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/tcoffee>) y ClustalW (<https://www.genome.jp/tools-bin/clustalw>).

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

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

### **6.3 Obtención de eritrocitos**

Se obtuvo una muestra de sangre humana por punción venosa y se colocó en solución Alseaver (anticoagulante) que contiene 1.4 mM de ácido cítrico (Sigma, UEA), 15.5 mM de citrato de sodio (Sigma, EUA), 36 mM de cloruro de sodio (Merck, México) y dextrosa a pH 6.1. La muestra se centrifugó a 500 x g y se lavaron cuatro veces por 10 min con la misma solución. Los sobrenadantes, que contenían las células blancas, se eliminaron y los eritrocitos, presentes en la pastilla, se cuantificaron en una cámara de Neubauer. Finalmente, los eritrocitos se ajustaron a una concentración de  $1 \times 10^8$  en medio TYI (sin suero) y se almacenaron a 4 °C hasta por una semana.

### **6.4 Obtención de proteínas y electroforesis**

Los trofozoítos se cosecharon y se resuspendieron en PBS en presencia de una mezcla de inhibidores de proteasas (Complete protease inhibitors Roche 2x, PMSF 2 mM, leupeptina 20  $\mu$ M, NEM 50 mM, PHMB 5 mM, E-64 10  $\mu$ M,  $\text{Na}_3\text{VO}_4$  2 mM, NaF 100 mM, Iodoacetamida 10 mM, Tris/-HCl 50 mM). La lisis se realizó mediante congelación con nitrógeno líquido y descongelación. Los extractos solubles se obtuvieron después de centrifugar a 300 x g durante 10 min a 4 °C. La concentración de proteínas se determinó mediante el método colorimétrico de Bradford.

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



## 6.5 Western blot

Las proteínas separadas por electroforesis se transfirieron a membranas de nitrocelulosa (Bio-Rad) o de fluoruro de polivinilideno (PVDF) (GE Healthcare) en una unidad de electrotransferencia (Bio-Rad). La cámara se llenó con solución de transferencia (Tris 0.025 M, glicina 0.190 M, metanol 10%, pH 8.3) fría y se colocó en hielo para transferir las proteínas a 250 mA por 2 h. Después, la membrana de nitrocelulosa se tiñó con rojo de Ponceau (rojo de Ponceau 0.1% y ácido acético 1%), para verificar la presencia de las proteínas en la membrana, o en el caso de las membranas PVDF se activaron previamente con metanol a temperatura ambiente por 10 min (estas membranas no se pueden teñir con rojo de Ponceau). A continuación, para bloquear las uniones inespecíficas, la membrana se incubó con PBS-Tween 0.5%, leche 5% (solución bloqueadora) y para la inmunodetección de las proteínas EhPRMT5 y EhPRMT-A se utilizaron los anticuerpos obtenidos contra sus respectivas proteínas recombinantes (Medina-Gómez, 2015), diluidos 1:2000 en solución bloqueadora. La membrana se incubó toda la noche en agitación a 4 °C. Posteriormente, se realizaron tres lavados de 15 min y tres de 5 min con PBS-Tween 0.5 %. Posteriormente, las membranas se incubaron 2 h a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario anti-IgG de conejo acoplado a peroxidasa (GeneTex), diluido 1:10000 en solución bloqueadora. Al término de la incubación se realizaron los mismos lavados con PBS-Tween 0.5 %, como se describió anteriormente. Finalmente, la unión antígeno-anticuerpo se reveló por quimioluminiscencia (ECL, Amersham) y el resultado se guardó en el fotodocumentador Microchemi (DNR Bio-Imaging Systems).

Para el análisis de la expresión durante la eritrofagocitosis, los trofozoítos se incubaron a 37° C con los eritrocitos en una proporción 1:50 en medio TYI a diferentes tiempos (5, 10 y 15 min), como condición basal se utilizaron trofozoítos en ausencia de eritrocitos (tiempo 0). Los eritrocitos no ingeridos por las amibas se lisaron con agua destilada posterior a la incubación. Las muestras se centrifugaron a 300 x g durante 5 min. El sobrenadante fue descartado y los extractos totales de

las amibas que fagocitaron eritrocitos se sometieron a los ensayos de Western blot. Como control de carga, se reveló la presencia de actina en las mismas membranas. La expresión relativa se calculó mediante la densitometría de las bandas obtenidas, normalizadas con el contenido de actina, usando el software GraphPad Prism 7. La expresión relativa en los trofozoítos en condiciones basales se determinó arbitrariamente como la unidad.

Para el análisis de la expresión durante el choque térmico, antes de los ensayos de Western blot, los trofozoítos se incubaron a 42°C durante 15, 30 y 60 min. Como condición basal se utilizaron trofozoítos mantenidos a 37 °C. Como control de carga, se reveló la presencia de actina en las mismas membranas y la expresión relativa se calculó como se mencionó arriba. La expresión relativa en los trofozoítos en condiciones basales se determinó arbitrariamente como la unidad.

## **6.6 Inmunofluorescencia**

A partir de un cultivo de trofozoítos en confluencia, las amibas se despegaron de la caja de cultivo al ser incubadas en hielo, se recolectaron por centrifugación. Posteriormente, se colocaron en cajas de seis pozos (Hailun), a las cuales previamente se les colocaron cubreobjetos y se incubaron por 1 h a 37 °C para permitir la adherencia de las amibas al vidrio. Posteriormente, las muestras se lavaron con PBS 1x pH 6.8, se fijaron y se permeabilizaron con metanol frío al 100% por 10 min y se bloquearon con suero fetal bovino al 10% durante 1 h a 37°C. A continuación, se agregaron los anticuerpos primarios contra las proteínas EhPRMT5 y EhPRMT-A en dilución 1:100 y se incubaron a 4°C durante toda la noche. Después de lavarse con PBS tres veces, los cubreobjetos se incubaron 2 h a 37 °C con el anticuerpo secundario conjugado al fluoróforo Alexa 488 (Life Technologies) en dilución 1:400, se lavaron de nuevo con PBS y posteriormente para teñir los núcleos las muestras se incubaron con 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI). Las muestras se montaron con 8 µl de VECTASHIELD (VECTOR laboratorios, Inc H-1000) en portaobjetos y se analizaron por microscopía confocal en un microscopio Zeiss LSM700 y los resultados se analizaron con el programa ZEN 2012 (Zeiss).

Para la inmunolocalización de las PRMT's durante la eritrofagocitosis, los trofozoítos adheridos a los cubreobjetos se incubaron a 37 °C con eritrocitos en una relación 1:50 durante 5, 10 y 15 min antes de realizar los ensayos de inmunofluorescencia y como condición basal se utilizaron trofozoítos en ausencia de eritrocitos (tiempo 0). Por otra parte, para la inmunolocalización de las proteínas de interés durante el choque térmico, los trofozoítos adheridos a los cubreobjetos se incubaron a 42 °C durante 15, 30 y 60 min antes de realizar los ensayos de inmunofluorescencia. Como condición basal se utilizaron trofozoítos incubados a 37 °C (tiempo 0). En el caso de la co-localización de EhPRMT5 y Hsp70, después de incubar a los trofozoítos con el anticuerpo anti EhPRMT5, las muestras se incubaron con un anticuerpo monoclonal de ratón  $\alpha$ -Hsp70 (Abcam) en una dilución 1:100 y como anticuerpo secundario anti-IgG de ratón acoplado a rodamina en una dilución de 1:400.

## **6.7 Silenciamiento de EhPRMTA**

Para lograr el silenciamiento de la metiltransferasa EhPRMTA, se realizó la clonación en anti-sentido del gen codificante en el vector pSA8 (Ankri et al. 1998) amablemente donado por el Dr. Serge Ankri de Technion Institute, Israel. Este vector posee los genes de resistencia a ampicilina y a neomicina, lo que nos permitió seleccionar a las bacterias transformadas y a los trofozoítos transfectados, respectivamente. El silenciamiento se logra mediante la producción de RNA en antisentido, y, por lo tanto, complementario a la secuencia del mRNA codificado por la célula, produciéndose un RNA de doble cadena que posteriormente es degradado.

### **6.7.1 Amplificación del gen EhPRMTA**

Para llevar a cabo la clonación en el vector antes mencionado, el gen se amplificó utilizando oligonucleótidos iniciadores específicos. Uno de ellos contenía cuatro bases para el correcto posicionamiento de la enzima, el sitio de reconocimiento para *NotI* y las primeras 11 bases codificantes del gen (5'-CCCCGCGGCCGCCATGAAAGAAAT-3'), mientras que el otro contenía cuatro

bases para el correcto posicionamiento de la enzima, el sitio de reconocimiento para *Bgl*II y la secuencia complementaria reversa de los últimos nucleótidos codificantes del gen (CCCCAGATCTTTAAAATTCAT). Para la reacción de amplificación se utilizaron 200 ng de DNA genómico de *E. histolytica*, 10 µM de cada uno de los oligonucleótidos iniciadores, 50 mM de MgCl<sub>2</sub>, 5 µL de solución amortiguadora 10X, 0.5 U de enzima Taq polimerasa (Invitrogen) y agua para alcanzar un volumen final de 50 µl. Las condiciones de la reacción fueron: (i) 3 min de desnaturalización a 94 °C; (ii) 35 ciclos con 1 min de desnaturalización a 94 °C; 1.5 min de alineamiento a 55 °C; y 3 min de síntesis at 72 °C; y (iii) 10 min de síntesis a 72 °C. Finalmente, el producto de la reacción se analizó mediante electroforesis en geles de agarosa al 1% teñidos con bromuro de etidio.

### **6.7.2 Clonación en el vector pCRII-TOPO**

Posteriormente, el amplificado se clonó en el vector de tránsito pCRII-TOPO (Invitrogen). Para ello, 4 µl del producto de amplificación se mezclaron con 1 µg de solución de sales (NaCl 1.2 M y MgCl<sub>2</sub> 60 mM) y agua hasta un volumen final de 5 µl. Entonces, se adicionó 1 µg del vector y se incubó a temperatura ambiente durante 30 min. Finalmente, esta mezcla se utilizó para transformar células competentes de *E. coli* cepa DH5α.

### **6.7.3 Obtención de células competentes**

Se tomó una colonia de *E. coli* DH5α y se sembró en 5 mL de medio LB, se incubó a 37 °C en agitación durante 16 a 18 h. Posteriormente, 500 µl de este cultivo se inocularon en 40 ml de medio LB, el cual se incubó a 37 °C a 180 rpm, hasta alcanzar una densidad óptica (DO) de 0.4 – 0.5 a 600 nm. Una vez obtenida esta DO, se colectó el cultivo en tubos, que se mantuvieron a 4 °C por 10 min. Después, los tubos se centrifugaron a 800 x g durante 5 min a 4 °C, se desechó el sobrenadante y la pastilla se resuspendió en 20 ml de CaCl<sub>2</sub> 50 mM estéril frío y se incubó durante 20 min a 4 °C. Transcurrido este tiempo, el tubo se centrifugó nuevamente a 800 x g durante 5 min a 4 °C, se desechó el sobrenadante y se

resuspendió la pastilla en 4 mL de CaCl<sub>2</sub> 50 mM frío y estéril. Las células se almacenaron a 4 °C hasta por 7 días o a -70 °C en alícuotas con 15% de glicerol.

#### **6.7.4 Obtención de DNA plasmídico**

Se tomó una colonia de *Escherichia coli* transformada y se sembró en 5 ml de medio LB adicionado con ampicilina (100 µg/ml), el cual se incubó a 37 °C a 180 rpm durante 16 a 18 h. Posteriormente, las células se transfirieron a un microtubo y se centrifugaron a 13000 x g a 4 °C durante 5 min; se desechó el sobrenadante y se repitió el paso con todo el volumen del cultivo, hasta obtener una pastilla de células, la cual se resuspendió en 100 µl de solución GTE (glucosa 50 mM, Tris 25 mM pH 8.0, EDTA 10 mM). Después, se adicionaron 200 µl de solución de lisis alcalina (NaOH 0.2 M, SDS 1%), se agitó suavemente y se incubó 5 min a 4 °C. Una vez transcurrido el tiempo, se adicionaron 150 µL de solución de acetato de potasio, se mezcló por inversión suave y se incubó 5 min más a 4 °C. Posteriormente, se centrifugó a 14000 x g a 4 °C durante 5 min y se transfirió el sobrenadante a un tubo limpio. Se adicionaron 400 µL de solución de fenol saturado/cloroformo (1:1 v/v), se centrifugó a 14000 x g durante 2 min y se recuperó la fase acuosa. Posteriormente, se adicionó 1 ml de etanol absoluto frío y se incubó 5 min a 4 °C. se centrifugó a 14000 x g durante 5 min a 4 °C y se decantó el etanol. El DNA plasmídico se lavó dos veces con 1 mL de etanol al 70% frío y se centrifugó a 14000 x g durante 5 min. De nuevo se decantó el etanol y se dejó secar la pastilla hasta que éste se evaporó por completo. Finalmente, la pastilla se resuspendió en 30 µL de agua estéril y se almacenó a -20 °C hasta su uso. El DNA obtenido se cuantificó por espectrofotometría a una longitud de onda de 260/280 nm. La integridad del DNA se confirmó en geles de agarosa al 1% teñidos con bromuro de etidio.

#### **6.7.5 Digestión con enzimas de restricción**

El plásmido pCRII-TOPO-*Ehprm*<sub>ta</sub>, así como el vector PSA8 se sometieron a una doble digestión con las enzimas *Bgl*II y *Not*I. Para esto, se incubó 1 µg de DNA plasmídico con las enzimas y su amortiguador correspondiente en un volumen

final de 50  $\mu$ L. La mezcla se incubó por 4 h a 37 °C. Los productos digeridos se analizaron por electroforesis en geles de agarosa y se purificaron las bandas de interés.

#### **6.7.6 Electroforesis en geles de agarosa**

Los productos de PCR amplificados, la integridad de los DNA plasmídicos obtenidos, así como la verificación de la liberación de los insertos del gen *Ehprmta* fueron analizados por electroforesis en geles de agarosa al 1%, los cuales fueron preparados en amortiguador TAE (40 mM tris acetato y 1 mM EDTA). Las muestras se cargaron con amortiguador de carga (azul de bromofenol 0.25%, xilencianol 0.25% y glicerol) y la electroforesis se llevó a cabo manteniendo un voltaje constante de 70 volts por 40 minutos. Los geles se tiñeron en una solución de bromuro de etidio (10 mg/mL) y las bandas de DNA se visualizaron utilizando un transiluminador de luz UV.

#### **6.7.7 Purificación de DNA a partir de geles de agarosa**

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

### 6.7.8 Ligación

El fragmento de interés, digerido y purificado, se ligó al vector pSA8 en una proporción molar de 1:3 (vector: inserto). Las mezclas de ligación se realizaron en un volumen final de 10  $\mu$ L, conteniendo 50 ng del plásmido PSA8, la cantidad necesaria del inserto *Ehprmta* para obtener la relación molar deseada, 1  $\mu$ L (100 unidades) de la enzima T4 DNA ligasa (Invitrogen), 2  $\mu$ L de amortiguador T4 Ligasa 5X (Invitrogen) y agua libre de nucleasas para completar el volumen de reacción, la cual se incubó de 16 a 18 h a 16 °C. En este ensayo se utilizaron como control negativo la misma reacción, pero sin inserto. Después, las mezclas se utilizaron para la transformación de bacterias *E. coli* DH5 $\alpha$ . A las colonias que crecieron en el medio agar LB adicionado con ampicilina (100  $\mu$ g/mL) se les extrajo el DNA plasmídico y se analizaron mediante la digestión con las enzimas BglII y NotI y por PCR utilizando los iniciadores del gen *Ehprmta* para confirmar la clonación. Finalmente, la construcción se secuenció para confirmar la orientación del gen y la ausencia de mutaciones.

### 6.7.9 Transfección de trofozoítos de *E. histolytica*

La construcción con el gen *Ehprmta* en antisentido en el plásmido pSA8 (Fig. 25) se transfectó en trofozoítos de la cepa HM1:IMSS. Para esto,  $3.5 \times 10^5$  trofozoítos se resuspendieron en 5 ml de medio TYI-S-33 y se colocaron en placas de 6 pozos un día antes de la transfección. Al siguiente día, en un tubo Falcon de 15 mL se incubaron 20  $\mu$ g de la construcción con 100  $\mu$ l de medio M199 (L-cisteína 5.7 mM, HEPES 25 mM, ácido ascórbico 0.6 mM, M199 35 mM) precalentado a 37 °C, donde se agregó primeramente el plásmido y luego el medio. A continuación, se adicionaron 20  $\mu$ l de Superfect (Qiagen) y la mezcla se incubó 20 min a temperatura ambiente. Luego, las amibas (con al menos 70% de confluencia) se lavaron una vez con 5 ml de medio basal M199 para después agregar 1.8 mL de medio M199 suplementado con 15% de suero bovino al tubo Falcon con la mezcla DNA/M199/Superfect, donde la mitad del volumen se agregó a las células y la mitad a la mezcla donde se encontraba el DNA. La mezcla DNA/M199/Superfect se agregó a las amibas por goteo homogeneizando de manera suave. Una vez

hecho esto, las amibas se llevaron a una incubadora de CO<sub>2</sub> (5%) por 4 h a 37 °C. Al término de esta incubación, las células se despegaron del pozo y se transfirieron a un tubo con medio TYI-S-33 precalentado a 37 °C y después de 48 h se adicionó el antibiótico G418 a una concentración final de 1 µg/mL. Después del crecimiento de los trofozoítos en presencia de esta concentración del fármaco, se removió el medio y la concentración del antibiótico se aumentó de manera gradual hasta alcanzar la concentración de 40 µg/mL. Como control, los trofozoítos se transfectaron con el vector vacío (MOCK).

El silenciamiento de EhPRMTA se verificó mediante ensayos de Western blot, como se describió anteriormente, comparando la cantidad de EhPRMTA en las amibas transfectadas con la construcción y las MOCK. En este caso, como unidad de expresión relativa se tomaron los valores de las amibas MOCK.

### **6.8 Ensayos de crecimiento, migración, choque térmico y fagocitosis en trofozoítos silenciados**

Una vez corroborado el silenciamiento de la proteína EhPRMTA, se procedió a evaluar el efecto del silenciamiento en el crecimiento celular, fagocitosis, migración y respuesta a choque térmico.

Para evaluar el crecimiento de los trofozoítos, se colocó un inóculo inicial de 2 x 10<sup>5</sup> mil amibas sin transfectar (WT), amibas transfectadas con el vector vacío (MOCK) o con la construcción de EhPRMTA en antisentido en tubos de cultivo con un volumen total de 10 mL de medio TYI-S-33. En el caso de las amibas transfectadas se adicionó además G418 a una concentración final de 40 µg/µL. Entonces, la cantidad de trofozoítos viables se determinó cada 24 h mediante la técnica de exclusión de azul de tripano en cámara de Neubauer.

En el caso de los ensayos de fagocitosis, se incubaron trofozoítos WT, MOCK o de EhPRMTA en antisentido con eritrocitos, en una proporción de 1:50, a 37 °C durante 0 (ausencia de eritrocitos), 5, 10 y 15 min, para después lisar los eritrocitos no ingeridos mediante la incubación por 10 min con agua bidestilada.



Después de lavados exhaustivos, los trofozoítos se lisaron con ácido fórmico y la eritrofagocitosis se midió mediante la cuantificación de la hemoglobina liberada por los eritrocitos ingeridos a una absorbancia de 400 nm.

Para los ensayos de choque térmico,  $1 \times 10^6$  trofozoítos WT, Mock o transfectados con la construcción de EhPRMTA en antisentido se resuspendieron en 1 ml de PBS para posteriormente incubarlos a 42 °C por 15, 30, 45 y 60 min. Una vez terminada la incubación, las amibas se tiñeron con azul tripano para verificar la viabilidad y se contaron las células vivas en cámara de Neubauer.

Para los ensayos de migración de los trofozoítos se utilizaron cámaras Transwell (Life Sciences). Para ello, un total de  $2.5 \times 10^5$  trofozoítos se resuspendieron en medio TYI (sin suero) y se colocaron en la parte superior del transwell en placas de 24 pozos, mientras que en la parte inferior como quimioattractante se utilizó medio TYI-S-33 (con 15% de suero). Las muestras se incubaron por 3 h a 37 °C, y al término de este tiempo se contaron las amibas que migraron a la parte inferior de la cámara.

## **6.9 Estadística**

Los resultados obtenidos se expresaron como la media  $\pm$  el error estándar de al menos tres experimentos independientes y las comparaciones estadísticas se analizaron mediante ANOVA de dos vías, considerando una  $p \leq 0.05$  como diferencia significativa.

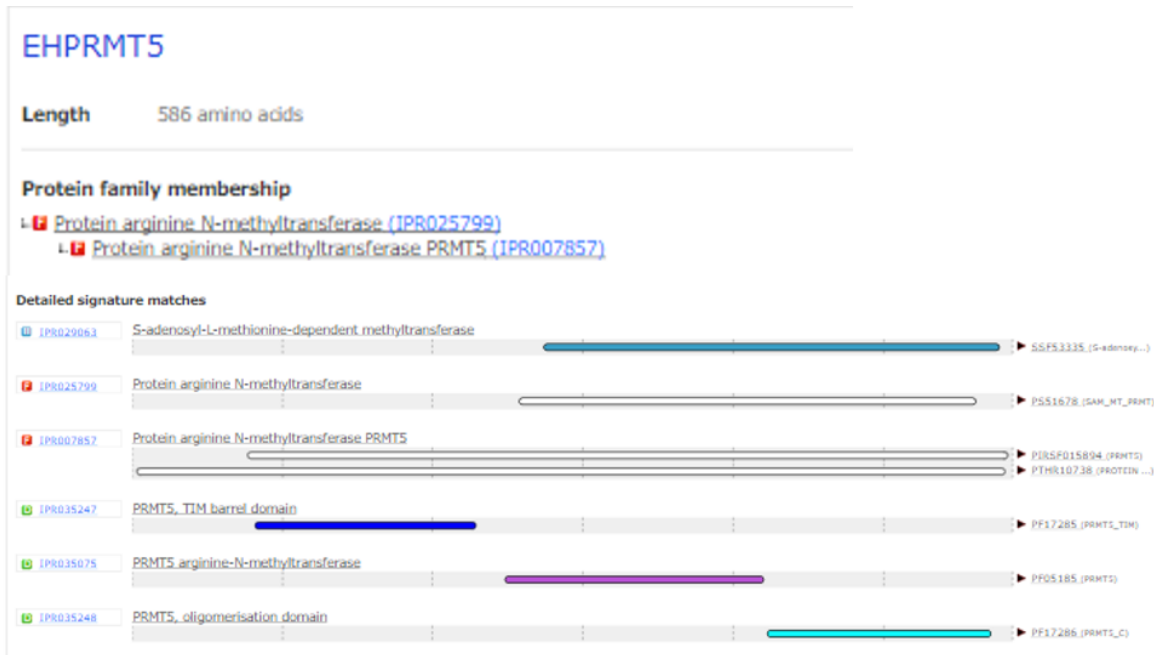
## 7. RESULTADOS

### 7.1 Análisis *in silico* de EhPRMT5

Mediante el análisis de la secuencia de 586 aminoácidos de la proteína EhPRMT5 en el servidor InterPro, se identificaron varios aspectos importantes, como la identidad de la proteína, la cual corresponde a una metiltransferasa dependiente de S-adenosil-metionina (SAM o AdoMet), así como tres dominios principales, los cuales también están presentes en la proteína homóloga de humano (HsPRMT5) (Antonysamy et al. 2012) y que son importantes en la actividad enzimática de la misma, los cuales son el dominio de barril TIM, el dominio de actividad catalítica, y el dominio de dimerización (Fig. 7). El primero destaca porque en la proteína de humano, este segmento de la enzima sirve para unirse a otra proteína llamada MEP50, la cual, al unirse, aumenta la capacidad de PRMT5 para catalizar la metilación de los sustratos, así como su afinidad a los mismos (Stopa et al. 2015). Por esta razón se buscó en el genoma de *E. histolytica* una proteína homóloga a MEP50, sin resultados positivos, por lo que la presencia del dominio TIM en EhPRMT5 sugiere la existencia de una proteína con la misma función de MEP50, pero con secuencia diferente.

Al comparar la secuencia de EhPRMT5 con su ortólogo en humano (HsPRMT5) se encontró un 30.66% de identidad entre ambas proteínas. Además, se observó en EhPRMT5 un alto porcentaje de identidad de los aminoácidos que componen los diferentes dominios funcionales de HsPRMT5. Así, la secuencia de EhPRMT5 posee la mayoría de los residuos importantes para la interacción con S-adenosil-homocisteína (S-Adohcy), (Tewary et al. 2019), los cuales corresponden a la tirosina 324, fenilalanina 327, ácido aspártico 330 y lisina 333 de HsPRMT5 (Tewary et al. 2019), aunque el residuo de ácido aspártico es sustituido en EhPRMT5 por ácido glutámico (Fig. 8). Esto sugiere que EhPRMT5 realiza los pasos posteriores a la catálisis, en este caso, la retención y posterior liberación del S-Adohcy. Interesantemente, la fenilalanina 327 en HsPRMT5 determina la producción de SDMA, mientras que en las enzimas de tipo I, que producen ADMA, en este sitio contienen un residuo de metionina (posición 48 en HsPRMT1)

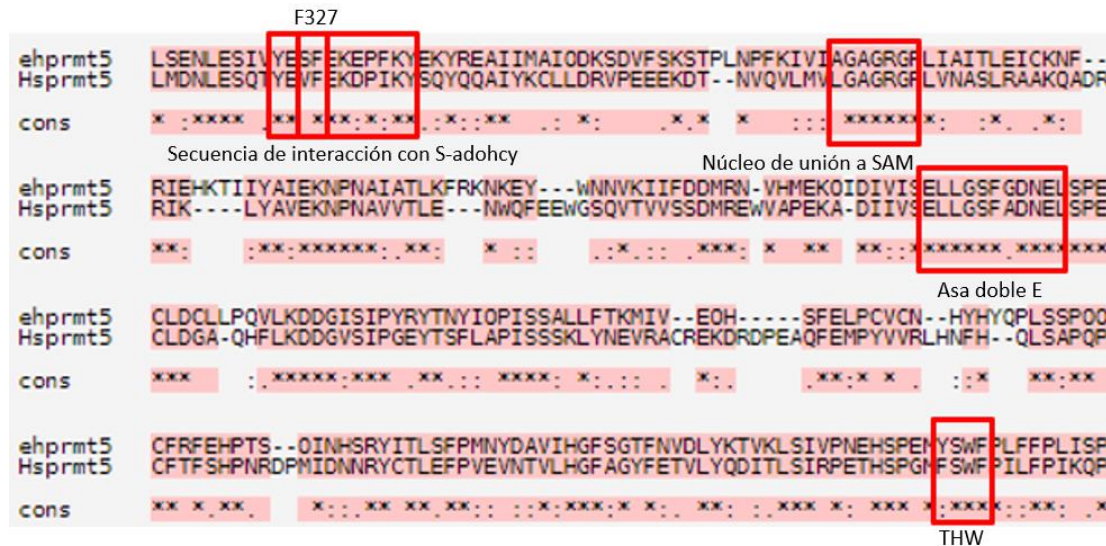
(Fuhrmann and Thompson. 2015). Este hallazgo sugiere fuertemente que EhPRMT5 produce SMDA.



**Fig. 7. Dominios estructurales de la proteína EhPRMT5.** La búsqueda de dominios en EhPRMT5 que se realizó con el servidor Interpro reveló la presencia de los dominios de barril TIM, el núcleo catalítico y el brazo de dimerización, los cuales están presentes en todas las PRMT's de la familia PRMT5.

Por otra parte, en el motivo del sitio de unión a SAM contiene tres glicinas conservadas en todas las PRMT's (LGxGxG), estando las tres presentes en EhPRMT5 (Fig. 8). La proteína de amiba también contiene conservada la secuencia del loop doble E, clave para el reconocimiento de las argininas sustrato, en donde la superficie catalítica está negativamente cargada y por lo tanto es capaz de atrapar el grupo guanidino positivamente cargado del residuo de arginina blanco, en donde los glutamatos que flanquean el loop están posiblemente implicados en desprotonar y activar el átomo de nitrógeno guanidino para la

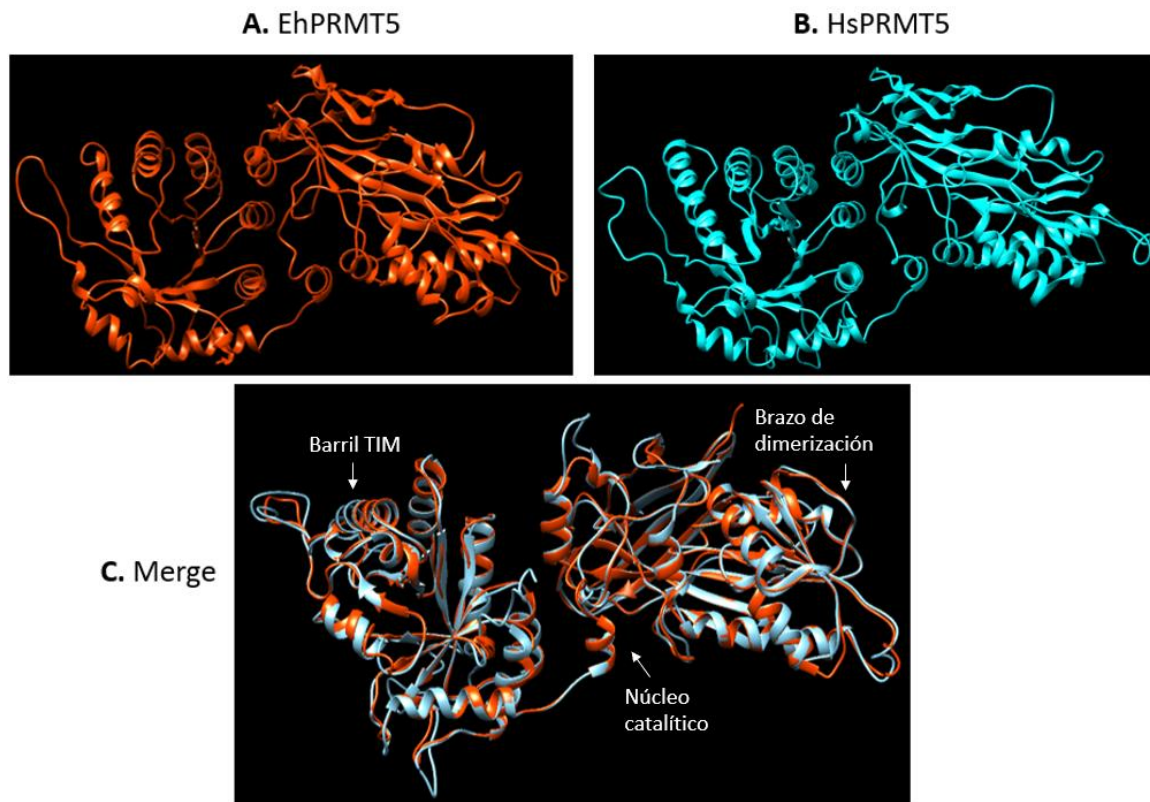
transferencia del grupo metilo (Debler et al. 2016, Jain et al. 2016, Tewary et al. 2019). Por último, la secuencia del loop THW (llamado así por la conservación de la secuencia treonina-histidina-triptófano en enzimas de tipo I), de importancia para la unión del sustrato y para la interacción con el dominio catalítico y barril TIM (Antonysamy *et al.* 2012), en enzimas de tipo II tiene la secuencia es FSW. En este loop, EhPRMT5 conserva los residuos de fenilalanina y triptófano, aunque la serina se encuentra sustituida por tirosina (Fig. 8). Todo lo anterior sugiere fuertemente que esta proteína amibiana es ortóloga a HsPRMT5 y por lo tanto se sugiere que el producto de su actividad es SMDA.



**Fig. 8. Alineamiento de las secuencias de aminoácidos de las proteínas EhPRMT5 y HsPRMT5.** Las secuencias de EhPRMT5 y HsPRMT5 se alinearon mediante ClustalW. Las secuencias de interacción con S-Adohcy, el núcleo de unión a SAM, el asa doble E y el loop THW se indican con recuadros.

Además, la estructura 3D predicha para EhPRMT5 mostró una identidad de 33.11% con la de HsPRMT5 (Fig. 9). En dicha estructura se pueden identificar los tres dominios principales antes mencionados (Barril TIM, núcleo catalítico y brazo de dimerización) en un acomodo muy similar a la proteína de humano, soportando

la idea de que la proteína amibiana pertenece a la familia de PRMT5 y la posible presencia de una proteína que lleva a cabo las mismas funciones de MEP50.

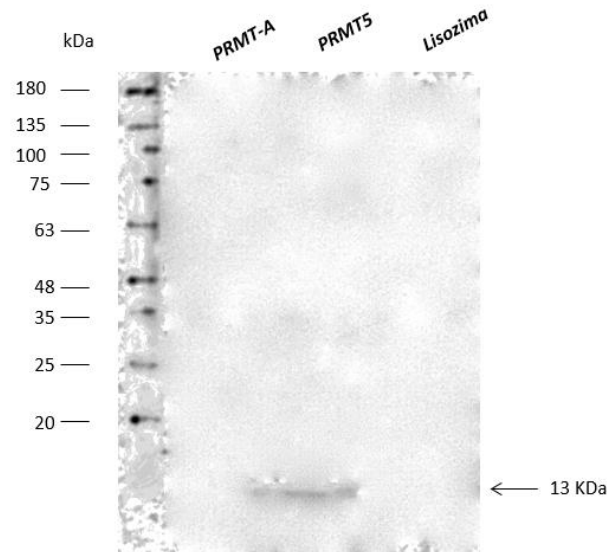


**Fig. 9. Comparación estructural de las proteínas EhPRMT5 y HsPRMT5.** Con base en la secuencia de EhPRMT5 se realizó el modelo 3D de la proteína mediante I-TASSER y éste se comparó con el cristal de la proteína PRMT5 de humano mediante chimera.

## 7.2 Ensayo de dimetilación *in vitro* de la arginina 3 de la histona H4 (H4R3)

Una de las modificaciones realizadas por PRMT5 es la dimetilación simétrica de la arginina 3 de la histona H4 (H4R3), mientras que PRMT1 cataliza la dimetilación asimétrica del mismo residuo (Fuhrmann and Thompson. 2015). Durante la caracterización de EhPRMT1a, se encontró que la proteína recombinante era capaz de realizar dicha modificación *in vitro* (Borbolla *et al.* 2015). Para determinar si las proteínas recombinantes de EhPRMTA y EhPRMT5 tenían la capacidad de dimetilar a H4R3, en el presente trabajo se hicieron ensayos de actividad *in vitro*

sobre histonas comerciales y los productos se analizaron por Western blot utilizando el anticuerpo contra la dimetilación asimétrica de H4R3. En estos experimentos se detectó la señal de reconocimiento de esta modificación en las histonas que se incubaron con la proteína EhPRMT5 (Fig. 10). Dado que el anticuerpo utilizado detecta la dimetilación asimétrica, es probable que EhPRMT5, de manera similar a la proteína de humano, catalice la dimetilación simétrica de H4R3, y que la modificación fuera reconocida por el parecido de ambas modificaciones. Por otra parte, cuando se analizaron los productos de reacción con la proteína recombinante de EhPRMTA, no se detectó señal al utilizar ese anticuerpo (Fig. 10), por lo cual confirmamos que esta PRMT no es homóloga ni en secuencia ni en función a PRMT1.



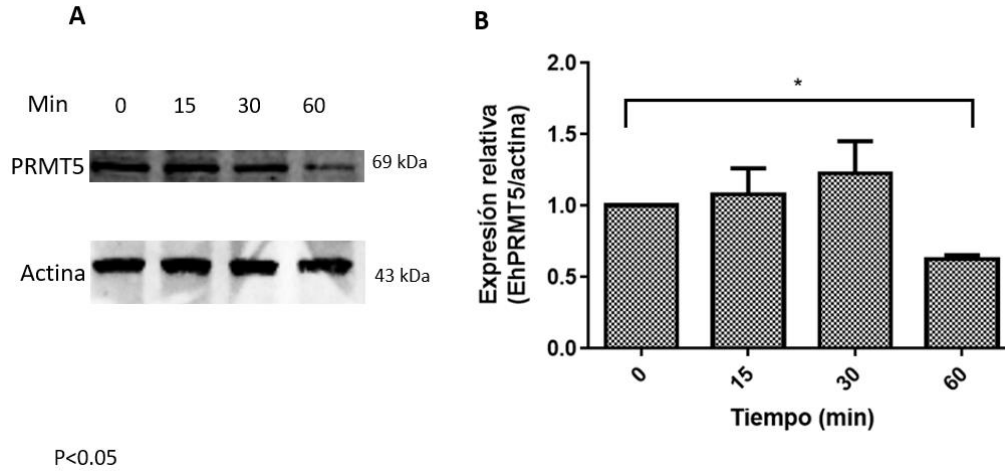
**Fig. 10. Western blot sobre ensayos de metilación en histonas comerciales con un anticuerpo contra la dimetilación de H4R3.** Histonas comerciales se incubaron con las proteínas recombinantes de EhPRMT-A y EhPRMT5 o con lisozima (control negativo) en presencia de AdoMet. Posteriormente las reacciones se sometieron a ensayos de Western blot utilizando un anticuerpo que reconoce la dimetilación de H4R3.

### 7.3 Expresión y localización subcelular de la proteína EhPRMT5 durante el choque térmico

La citoprotección puede considerarse un factor importante en parásitos como *E. histolytica*, debido a que para poder infectar a su hospedero, las células deben resistir cambios de temperatura, humedad, etc. Para investigar si EhPRMT5 está involucrada con la citoprotección de los trofozoítos se analizó su expresión en condición de choque térmico mediante western blot y densitometría. En estos ensayos se observó que la expresión de la proteína se mantiene sin cambios significativos hasta los 30 min de la cinética, pero a los 60 min disminuyó en una media de 0.6 con respecto a los trofozoítos mantenidos a 37 °C (tiempo 0) (Fig. 11).

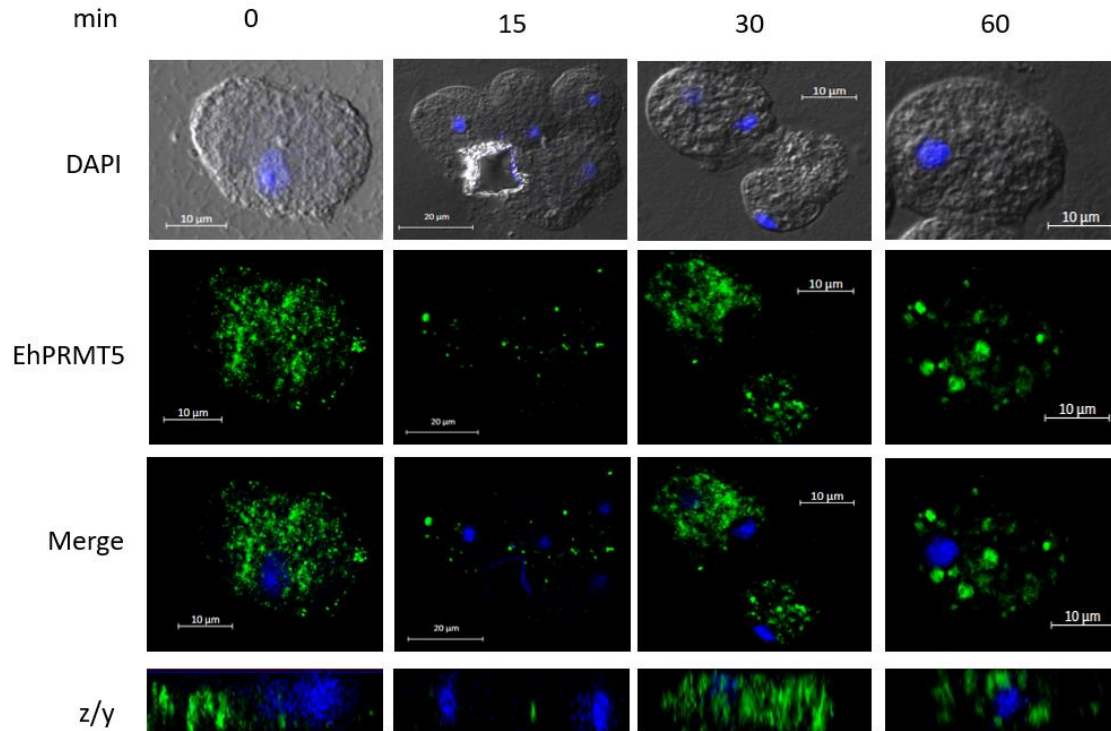
Cuando EhPRMT5 se analizó por inmunofluorescencia, se observó que en condiciones basales la proteína se encontró distribuida en el citoplasma de los trofozoítos, pero a los 15 min de choque térmico la señal disminuyó notablemente (Fig. 12), esto posiblemente debido a un cambio conformacional o por interacción con otra proteína, que podría enmascarar el reconocimiento de la metiltransferasa por parte del anticuerpo. A los 30 min la señal se recuperó y se observó que la proteína se condensó en estructuras similares a vesículas, las cuales se hicieron mucho más evidentes en el tiempo de 60 min (Fig. 12). Se realizaron cortes en zy de los núcleos con el software ZEN, pero se detectó muy poca presencia de la proteína en este organelo en todos los tiempos analizados (Fig. 12).

Debido a que las estructuras vesiculares se formaron a partir del estímulo estresor, se sugirió que éstas podrían tratarse de gránulos de estrés.



**Fig. 11. Expresión de EhPRMT5 durante el tratamiento de choque térmico. (A)** Los trofozoítos de *E. histolytica* se sometieron a choque térmico al incubarlos a 42 °C durante 15, 30 y 60 min. Posteriormente, se obtuvieron extractos totales, los cuales se analizaron por Western blot utilizando el anticuerpo contra EhPRMT5 y como control de carga se incluyó un anticuerpo contra actina. **(B)** Las bandas reconocidas por los anticuerpos se analizaron por densitometría y los datos de EhPRMT5 se normalizaron con respecto a actina. La expresión relativa en las células incubadas a 37 °C (tiempo 0) se tomó arbitrariamente como la unidad. Los datos representan la media  $\pm$  el error estándar de tres experimentos independientes por duplicado. \*p<0.05.



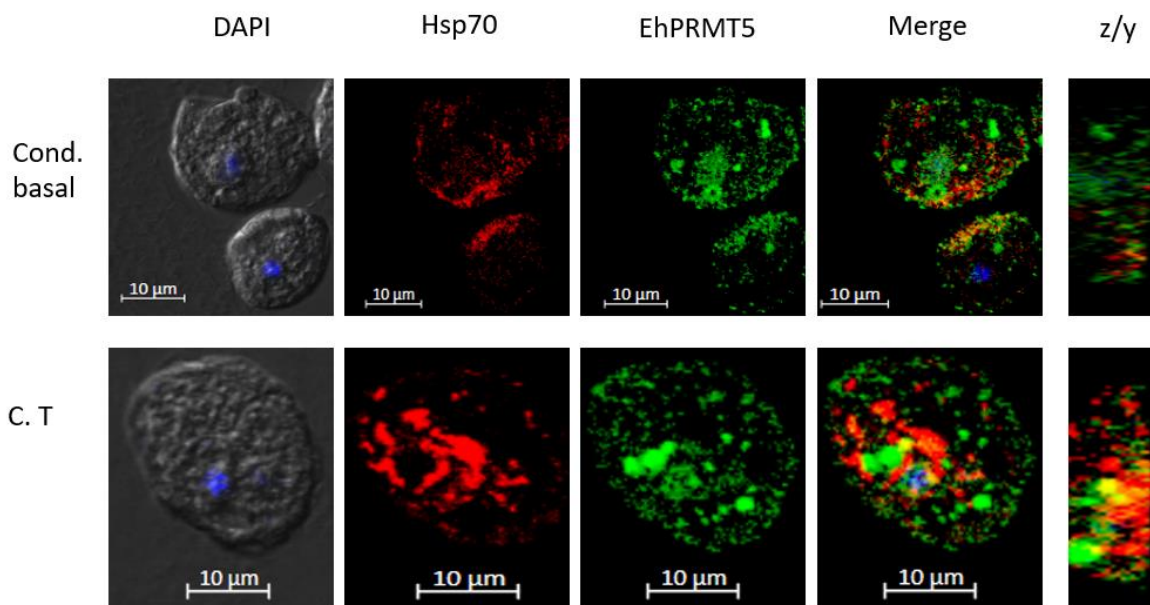


**Fig. 12. Localización de la proteína PRMT5 en trofozoítos durante el tratamiento de choque térmico.** Los trofozoítos incubados a 37 °C (tiempo 0) o a 42 °C durante 15, 30 y 60 min, se fijaron, se permeabilizaron y se incubaron con el anticuerpo anti-EhPRMT5 y un segundo anticuerpo acoplado a ALEXA 488 (verde). Posteriormente los núcleos se contra-tiñeron con DAPI (azul). z/y: corte óptico en los ejes z/y de los núcleos.

Para corroborar que las estructuras observadas fueran gránulos de estrés se empleó un anticuerpo dirigido contra el marcador de la proteína Hsp70 y se evaluó su colocalización con la proteína EhPRMT5. En la condición basal, las proteínas se detectaron sin aparente interacción (Fig. 13). Como era de esperarse, la proteína Hsp70 aumentó su expresión después de 60 min a 42 °C y ésta se acumuló en estructuras vesiculares que sugerimos son gránulos de estrés. Interesantemente, en este tiempo de choque térmico se detectó la co-localización de la proteína EhPRMT5 con Hsp70 en múltiples foci en el citoplasma de los trofozoítos (Fig. 13). La mencionada co-localización puede atribuirse a que ambas proteínas se encuentran en interacción directa durante el estímulo de choque

térmico; además, es posible que Hsp70 sea blanco de metilación por parte de EhPRMT5. Esto último se sugiere debido a que en un análisis por espectrometría de masas se encontró que EhHsp70 estaba metilada en un residuo de arginina en la secuencia resaltada en la figura 14 (Dra. Elisa Azuara, UACM, comunicación personal).

Los resultados obtenidos sugieren que EhPRMT5 participa en la respuesta durante el choque térmico, la cual se acumula en posibles gránulos de estrés y tiene como posible sustrato a la proteína Hsp70.



**Fig. 13. Inmunofluorescencia de EhPRMT5 y EhHsp70 durante el choque térmico.** Los trofozoítos incubados a 37 °C (Cond. Basal) o a 42 °C durante 60 min (C.T., choque térmico), se fijaron, se permeabilizaron y se incubaron con el anticuerpo anti-EhPRMT5 y un segundo anticuerpo acoplado a ALEXA 488 (verde). Posteriormente, se incubaron con un anticuerpo de ratón contra Hsp70 y un anticuerpo secundario acoplado a rodamina (rojo). Finalmente, los núcleos se contra-tiñeron con DAPI (azul). z/y: corte óptico en los ejes z/y.

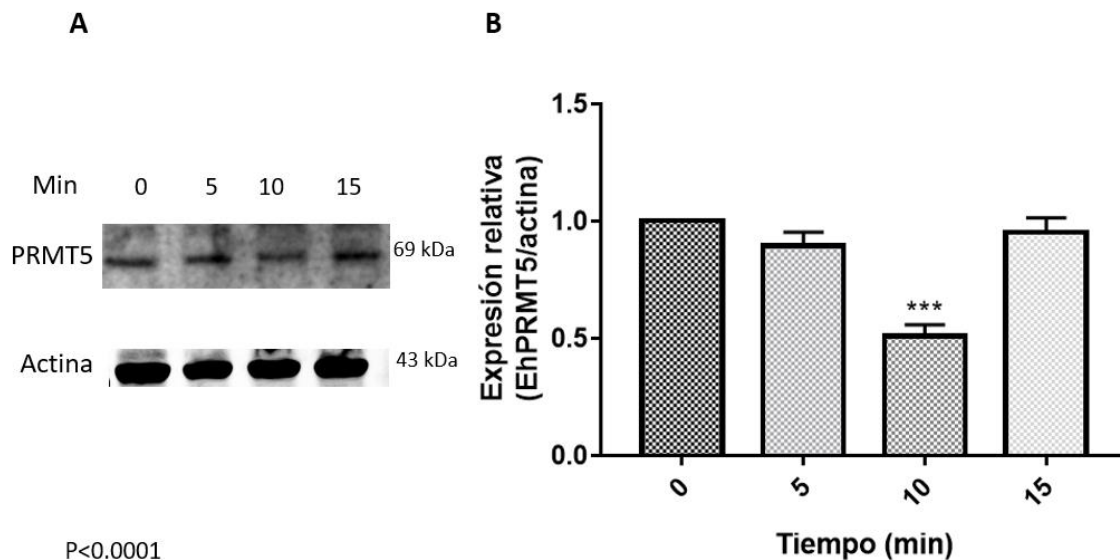
OUTPUT		
Prediction results (sequence view):		
Legend: <span style="color: red;">■</span> Low-confidence <span style="color: orange;">■</span> Medium-confidence <span style="color: green;">■</span> High-confidence <span style="color: blue;">■</span> Multiple PTM predictions		
1	MSKYTGPAVGIDLGTTYSCVGIWQNDRVEIIANDQGNRTTPSYVAFTDTERLIGDAAKRNQIAMNVKNTVF	70
71	DAKRLIGRRFSDPAIQNDMKHWSFKVIDDGHDKPLIEVEYKGEVKKFTPEEISSMVLTKMKETAESFVGK	140
141	EVKNAVITCPAYFNDSQRQATKDAGTIAGMNVMRIINEPTAAAIAYGLDKKSDREKNVLIFFDLGGGTFDV	210
211	SLLAIDDGVEVKATNGDTHLGGEDFDNRLVNHFIAEFKRKYKDISGNARAVRRLRTACERAKRTLSSA	280
281	ATANIEVDQLFDGIDFYTSITRARFEELNIDLFKSTIGPVERVLQDAKLDKGSIDVVVLIGGSTRIKPVV	350
351	QLLQDFFNGKEPNKSINPDEAVAYGAARVQAAILTGTGGKATEDVLLLDVAPLTLGIETAGGVMTALIPRN	420
421	STIPAKKSQVFSTYADNQPGVLIQVFEGEASMTNHCNLLGKFEITGIPPAPRGVPQIEVTFDIDANGILN	490
491	VSAEDKTTGKKNKIITINDKGRLSKEQIDKMVAEAEKFKAEDDKMKQRVEAKNKLENFCYSVKNTLSEQF	560
561	ADKIAAEDKTTIENIVKETLDWIDNQNASTEEYDNKMKVEVEGKQVPIFTKLYQQAGAAGGMPGGMPNGF	630
631	PGAGAAPQGNAPKSSGKGPTEIEVD	656

**Fig. 14. Metilación de arginina en Hsp70.** Secuencia de la proteína EhHsp70 de 656 aminoácidos, en donde se resalta en color naranja la secuencia donde se encontró la arginina (R) metilada (Azuara Liceaga, comunicación personal, 2019).

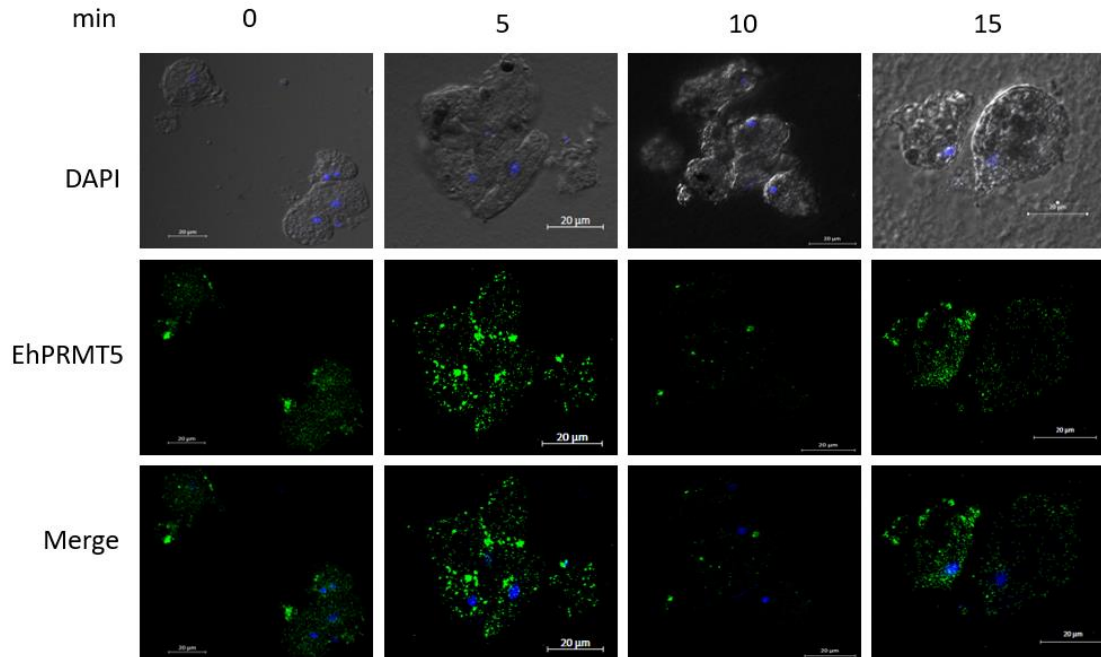
#### 7.4 Expresión y localización subcelular de la proteína EhPRMT5 durante la eritrofagocitosis

Las PRMTs regulan diversos procesos celulares y particularmente, en protozoarios parásitos se ha reportado que algunas PRMTs regulan la virulencia de estos microorganismos (Fisk y Read. 2011). Así, para investigar la posible participación de EhPRMT5 en la virulencia amibiana, se analizó la expresión de esta enzima durante la eritrofagocitosis, la cual es considerada como un factor de virulencia en *E. histolytica* (Orozco *et al.* 1983). En estos ensayos se observó una disminución significativa de la expresión de EhPRMT5 a los 10 min de eritrofagocitosis con respecto a los demás tiempos (Fig. 15). Esta disminución en la expresión podría deberse a un enmascaramiento de la proteína, debido a que el tiempo de la cinética es demasiado corto para un recambio por degradación y nuevamente síntesis en el siguiente tiempo analizado de 15 min. Cuando la proteína se analizó por inmunofluorescencia, en condición basal la proteína se encontró distribuida en el citoplasma, pero a los 5 min de eritrofagocitosis se observó una condensación de la señal de EhPRMT5 en forma punteada en el citoplasma de los trofozoítos (Fig. 16). En concordancia con los ensayos de Western blot a los 10 min se detectó una disminución de la señal, para finalmente

observarse una recuperación en la señal a 15 min en un nivel similar al encontrado en los tiempos 0 y 5 min (Fig. 16). En ningún tiempo se detectó una interacción directa de la señal correspondiente a EhPRMT5 con los eritrocitos fagocitados, resultado que indicaría que la enzima no tiene una participación significativa en este proceso de *E. histolytica*.



**Fig. 15. Expresión de EhPRMT5 durante la fagocitosis.** (A) Los trofozoítos de *E. histolytica* se incubaron a 37 °C con eritrocitos humanos durante 0, 5, 10 y 15 min. Posteriormente, a esos tiempos se obtuvieron extractos totales que se analizaron por Western blot utilizando el anticuerpo contra EhPRMT5 y como control de carga se empleó un anticuerpo contra actina. (B) Las bandas reconocidas por los anticuerpos se analizaron por densitometría y los datos de EhPRMT5 se normalizaron con el contenido de actina. La expresión relativa a tiempo 0 se tomó arbitrariamente como la unidad. Los datos representan la media  $\pm$  el error estándar de tres experimentos independientes por duplicado. \*\*\*p<0.005.



**Fig. 16. Inmunofluorescencia de PRMT5 durante la eritrofagocitosis.** Los trofozoítos incubados a 37 °C con eritrocitos humanos durante 0, 5, 10 y 15 min, se fijaron, se permeabilizaron y se incubaron con el anticuerpo anti-EhPRMT5 y un segundo anticuerpo acoplado a ALEXA 488 (verde). Posteriormente los núcleos se contra-tiñeron con DAPI (azul).

De los anteriores análisis se resume que EhPRMT5 contiene los tres dominios principales encontrados en HsPRMT5, y dentro de su secuencia destaca la conservación de varios de los aminoácidos responsables de la unión a SAM, el reconocimiento de sustrato, así como también de la interacción con el subproducto S-Adohcy. Por otro lado, se sugiere que EhPRMT5 realiza la dimetilación simétrica de H4R3 *in vitro*, además de la evidente relocalización de la proteína en choque térmico hacia estructuras que pudieran ser gránulos de estrés, ratificándose este resultado con la co-localización con Hsp70, que además indicaría que ambas proteínas interactúan en esta condición. Finalmente, se sugiere que la proteína no tiene una participación significativa en el proceso de eritrofagocitosis.

## 7.5 Análisis *in silico* de la EhPRMTA

Dado que el análisis filogenético realizado anteriormente en nuestro grupo de trabajo (Borbolla *et al.* 2015) situó a EhPRMTA lejos de PRMT1 y que nuestros resultados de actividad *in vitro* indican que esta proteína no realiza la dimetilación de H4R3, se analizó con más detalle esta proteína con el fin de tratar de determinar a qué familia de PRMTs pudiera pertenecer. En primera instancia se analizó la presencia de dominios estructurales, pero dicho análisis no arrojó más que la presencia del dominio característico de metiltransferasa dependiente de SAM (datos no mostrados). Por lo que la secuencia de la proteína se analizó mediante un alineamiento con todas las PRMT's de humano, en donde se encontró que EhPRMTA tiene un porcentaje de identidad mayor con enzimas que pertenecen al tipo I, concretamente con PRMT1, PRMT3, PRMT6 y PRMT8 (Tabla 1), por lo que de nuevo se ratificó que no tiene una alta homología con PRMT1, pero aparentemente es una enzima de tipo I.

**Tabla 1.** Identidad de EhPRMTA de *E. histolytica* con las PRMT's de *H. sapiens*

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

Con esto, el siguiente análisis consistió buscar en su secuencia motivos o aminoácidos exclusivos de enzimas de tipo I. Primeramente se analizó la

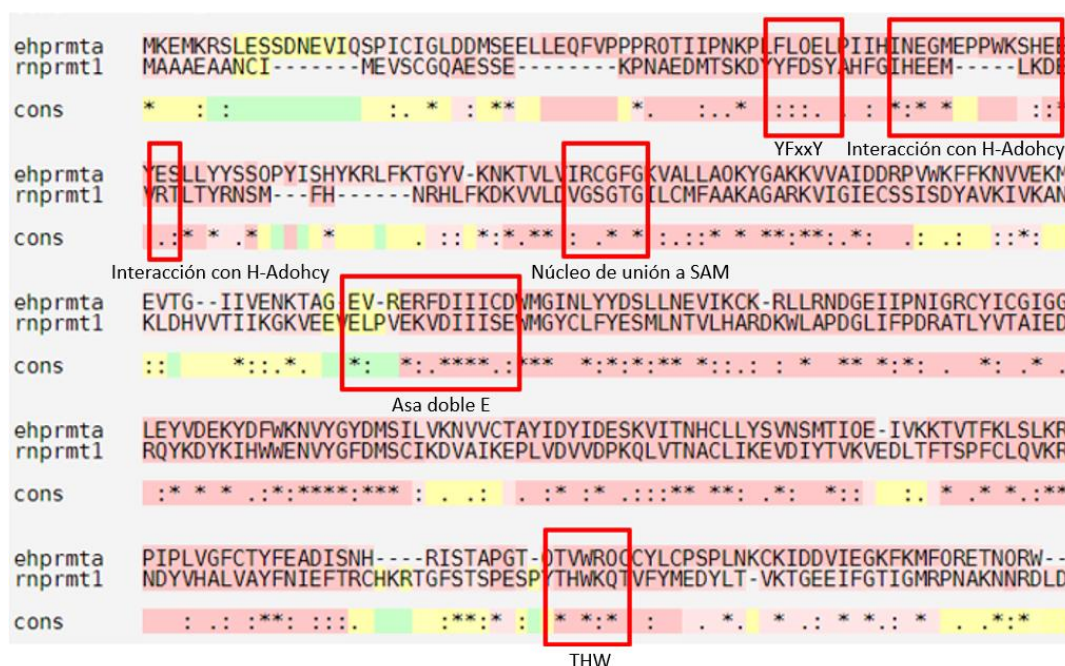


**Fig. 17. Alineamiento de las secuencias de aminoácidos de EhPRMTA, EhPRMT1a y EhPRMT5 con PRMTs humanas de tipo I.** Las secuencias de aminoácidos de EhPRMTA, EhPRMT5 y EhPRMT1a se alinearon utilizando el servidor ClustalW con PRMTs de tipo I de humano en busca de los residuos conservados Y154 y S217 (recuadros) (posición en PRMT4).

Otro de los motivos importantes y exclusivos de tipo I es la secuencia YFxxY, la cual se encuentra cercana estructuralmente al núcleo de unión a SAM, en donde tiene participación en este proceso (Tewary *et al.* 2019). Cuando se comparó la secuencia de EhPRMTA con la proteína PRMT1 de *Rattus norvegicus*, se encontró que EhPRMTA no contiene este motivo, aunque en esta proteína existe el cambio por aminoácidos del mismo tipo en casi todo este motivo (Fig. 12). Por otra parte, en el núcleo de unión a SAM, de las tres glicinas característicamente conservadas en las PRMTs, la proteína de amiba únicamente contiene dos (Fig. 18). Otros aminoácidos ausentes en EhPRMTA y que en las enzimas de tipo I son los responsables de la interacción con S-Adohcy son H, M, D y R, que en *R. norvegicus* se localizan en las posiciones 45, 48, 51 y 54 (HxxMxxDxxR) (Tewary *et al.* 2019), encontrándose que en la proteína amibiana únicamente se conserva la metionina (posición 66), la cual se ha descrito como importante para la dimetilación asimétrica (Fuhrmann y Thompson. 2015). Sin embargo, los residuos de EhPRMTA que alinean con los residuos H y D de la secuencia de PRMT1 de rata son aminoácidos que pueden ser considerados como cambios conservados (N y E), aunque entre ellos se encuentran cinco residuos extra (Fig. 18). En cuanto al loop doble E, el alineamiento evidenció que de los glutamatos conservados que flanquean la secuencia, EhPRMTA solo contiene uno, pero en el lugar del segundo se encuentra un aspartato, siendo un cambio considerado como conservado (Fig. 18). Finalmente, otra de las secuencias conservadas en proteínas de tipo I es la secuencia THW en el loop del mismo nombre; en el caso de EhPRMTA, ésta contiene una valina en lugar de la histidina característica (Fig. 18).



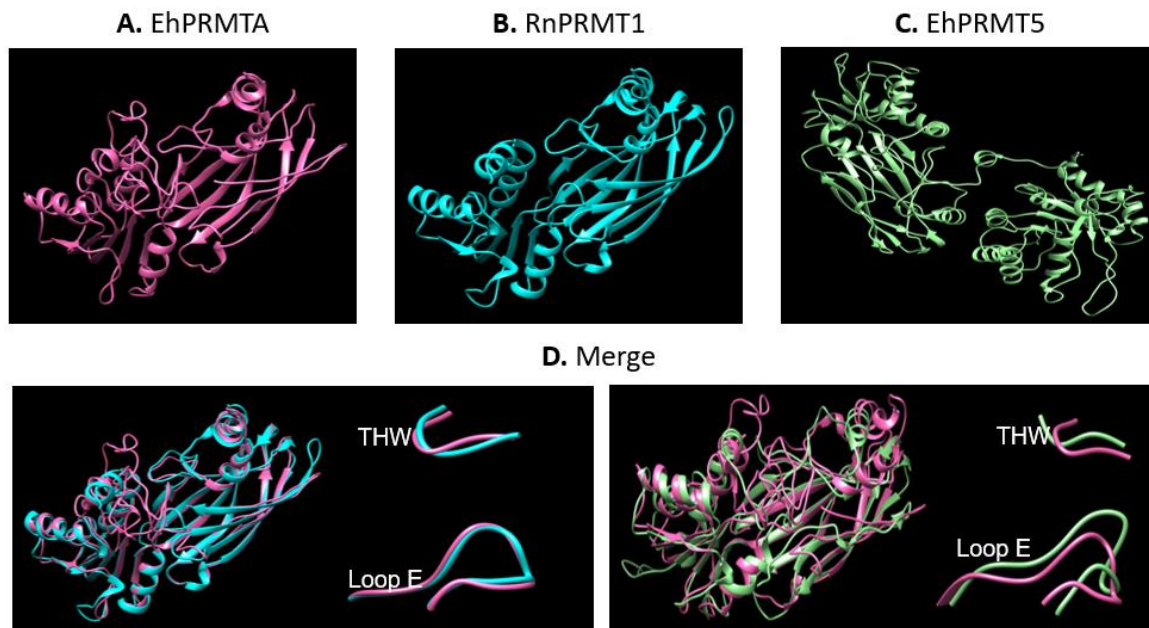
Interesantemente, EhPRMT1a si contiene la secuencia YFxxY, los cuatro aminoácidos de interacción a H-adohcy, las tres glicinas del núcleo de unión a SAM, el asa doble E casi idéntica, así como la secuencia THW sin ningún cambio (datos no mostrados), confirmando que EhPRMT1a es una enzima de tipo I y soportando la idea que EhPRMTA no es una típica PRMT. Interesantemente, con los datos de alineamiento con otras PRMTs se podría sugerir que EhPRMTA no tiene actividad catalítica; sin embargo, nuestros resultados de maestría con la proteína recombinante indican que ésta es capaz de transferir grupos metilo a histonas comerciales (Medina-Gómez, 2015).



**Fig. 18. Búsqueda de aminoácidos conservados entre EhPRMTA y RnPRMT1.** Las secuencias de aminoácidos de EhPRMTA y de PRMT1 de *R. norvegicus* se alinearon mediante ClustalW en búsqueda de los aminoácidos importantes para la actividad de enzimas del tipo 1 (en recuadros).

Por otra parte, en la estructura tridimensional las disposiciones espaciales de los motivos THW y el loop doble E forman el sitio activo (pocket) en donde se deposita la proteína que se va a metilar, formando dos subregiones, el loop doble E en la

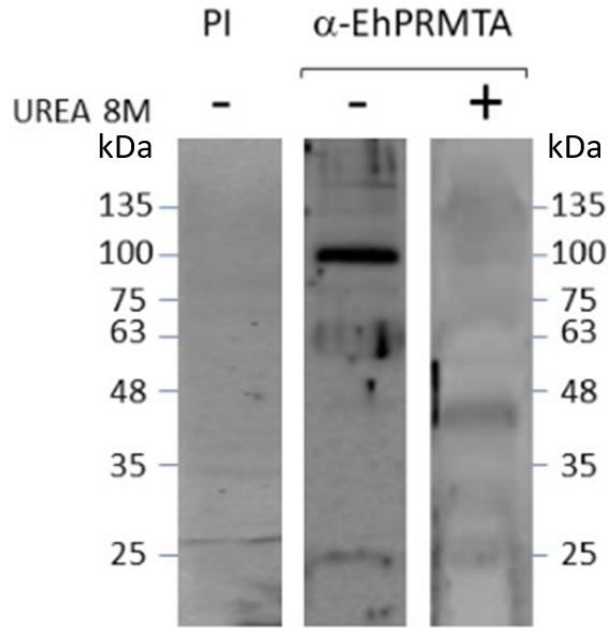
parte superior y el THW en la parte inferior. La disposición espacial de ambas subregiones dará lugar a la enzima para poder producir ADMA o SDMA, en donde una subregión superior abierta y una inferior restringida resultará en ADMA, así como una superior restringida y una inferior abierta resultará en SDMA (Jain et al. 2016). Al realizar una búsqueda del cristal depositado en PDB con mayor identidad a la estructura 3D predicha para EhPRMTA se encontró que ésta es la PRMT1 de rata, teniendo una identidad estructural de 23.78%. Al analizar la disposición espacial de las subregiones del loop doble E y THW de EhPRMTA se encontró que esta proteína tiene una disposición espacial de ambas subregiones casi idéntica a RnPRMT1 y diferente a EhPRMT5 (enzima tipo II que produciría SDMA) (Fig. 19). Así, por la mayor similitud con PRMT1, 3, 6 y 8 (Tabla 1), por su posición en el árbol filogenético al compararla con las PRMTs de otros organismos (Borbolla-Vázquez *et al.* 2015), por la conservación de algunos residuos importantes para la actividad (Fig. 18) y por la disposición espacial de los dominios doble E y THW, se sugiere que esta proteína amibiana pertenece a las enzimas de tipo I, es decir, que cataliza la dimetilación asimétrica de arginina en sus proteínas blanco.



**Fig. 19. Comparación estructural entre EhPRMTA con RnPRMT1 y EhPRMT5.** Se obtuvieron las estructuras 3D teóricas de EhPRMTA y EhPRMT5. Posteriormente, se comparó la estructura predicha de EhPRMTA con la PRMT1 de rata (tipo I) y con EhPRMT5 (tipo II). La disposición espacial de las subregiones del sitio catalítico de EhPRMTA es similar a la configuración para producir ADMA (tipo I), con clara diferencia cuando se compara a una proteína de tipo II.

### **7.6 Western blot de EhPRMTA en extractos de trofozoítos**

Al realizar los ensayos de Western blot utilizando el anticuerpo  $\alpha$ -EhPRMTA (Medina Gómez, tesis de maestría) sobre extractos de trofozoítos, se detectó la señal de la proteína en un peso molecular aproximado de 85 kDa (Fig. 20), mientras que el esperado, de acuerdo a su secuencia de aminoácidos, es de 43 kDa. Sin embargo, se conoce que las PRMT's tienden a oligomerizarse, lo que sugería que la banda observada pudiera corresponder al dímero de EhPRMTA. Para comprobar esta hipótesis se realizó un análisis de Western blot sobre extractos totales amibianos separados en geles de poliacrilamida conteniendo urea 8 M. En estas condiciones, el anticuerpo  $\alpha$ -EhPRMTA detectó la proteína en 43 kDa (Fig. 20), lo que indicó que EhPRMTA efectivamente se encontraba formando un complejo, el cual muy probablemente se trata de un dímero de la proteína.

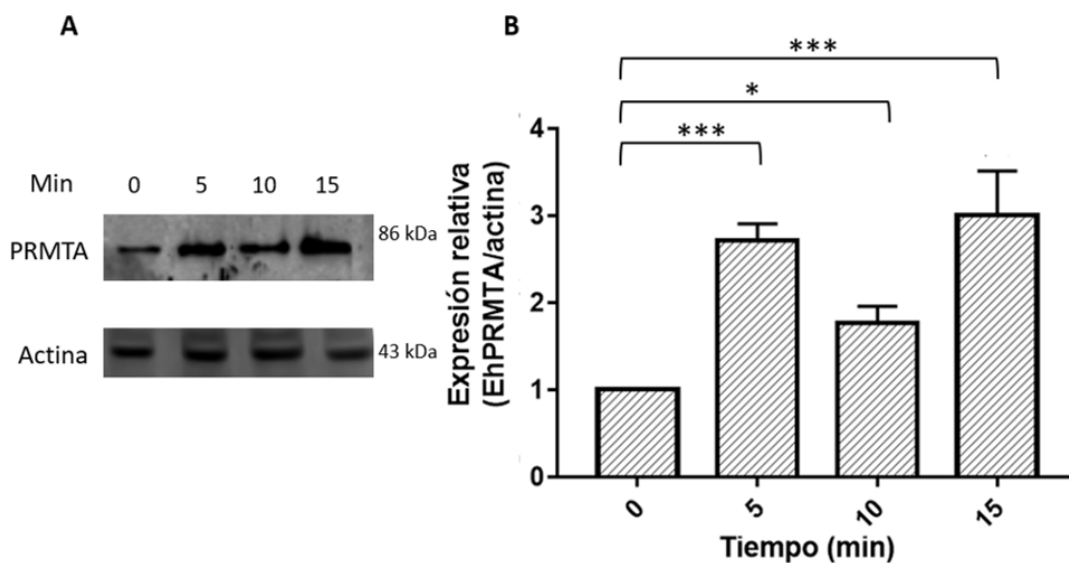


**Fig. 20. Inmunodetección de EhPRMTA.** Los extractos totales de trofozoítos se separaron en geles de poliacrilamida en ausencia o en presencia de urea 8 M y se sometieron a ensayos de Western blot utilizando el anticuerpo contra EhPRMTA. PI, control negativo utilizando el suero preinmune.

### 7.7 Expresión y localización subcelular de la proteína EhPRMTA durante la eritrofagocitosis

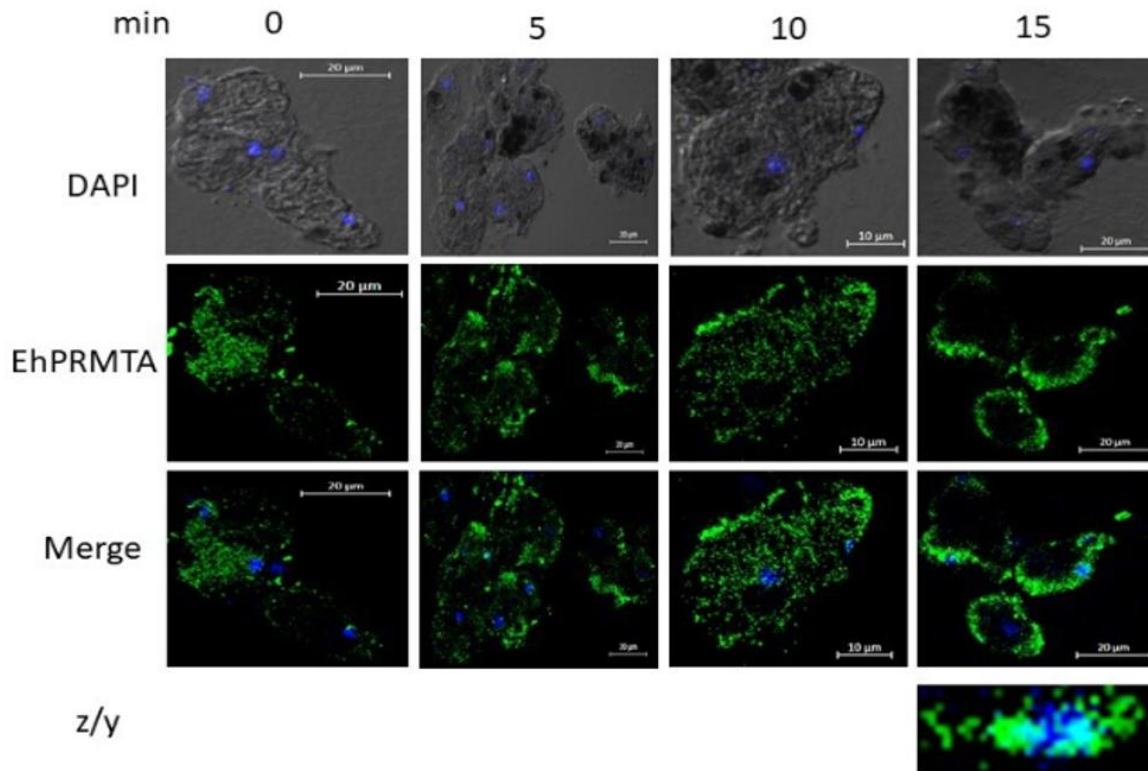
Una vez que se corroboró que la señal detectada pertenece a EhPRMTA, se realizaron los ensayos para analizar la expresión de la proteína durante la eritrofagocitosis. Los tiempos que se manejaron en la cinética son similares a los usados para EhPRMT5. Para ello se realizaron ensayos de Western blot, en donde se apreció un aumento de la expresión de la proteína desde los 5 min (Fig. 21A). El análisis por densitometría mostró que la cantidad de proteína fluctuó en todos los tiempos de la cinética, pero la expresión a los diferentes tiempos de fagocitosis siempre fue mayor a la observada para los trofozoítos en ausencia de eritrocitos (tiempo 0), encontrándose una mayor diferencia en los tiempos de 5 y 15 minutos (Fig. 21B). Posteriormente, se analizó la localización subcelular de

EhPRMTA durante la eritrofagocitosis. En la condición basal la proteína se encontró distribuida en el citoplasma, pero a partir de 5 min aumentó su expresión, a los 10 min se detectó una relocalización hacia la parte cercana a la membrana plasmática, lo que se hizo más evidente a 15 min, donde además se observó la presencia de la proteína en el núcleo de los trofozoítos, pero no se observó señal cerca de los eritrocitos ingeridos (Fig. 22). Este resultado sugiere que EhPRMTA podría participar en la regulación de este proceso de virulencia. Además, la presencia de la proteína en el núcleo conforme avanzó la cinética nos provee la idea de que EhPRMTA podría estar participando en el control epigenético durante la eritrofagocitosis, asimismo que la relocalización hacia la membrana podría tener otras funciones, como andamiaje o activando otras proteínas involucradas en el proceso, mediante su metilación.



**Fig. 21. Expresión de EhPRMTA durante la fagocitosis.** (A) Los trofozoítos de *E. histolytica* se incubaron a 37 °C con eritrocitos humanos durante 0, 5, 10 y 15 min. Posteriormente, a esos tiempos se obtuvieron extractos totales que se analizaron por Western blot utilizando el anticuerpo contra EhPRMTA y como control de carga con un anticuerpo contra actina. (B) Las bandas reconocidas por los anticuerpos se analizaron por densitometría y los datos de EhPRMTA se normalizaron con el contenido de actina. La expresión relativa a tiempo 0 se tomó arbitrariamente como la unidad. Los datos

representan la media  $\pm$  el error estándar de tres experimentos independientes por duplicado. \*  $p < 0.05$ ; \*\*\* $p < 0.005$ .

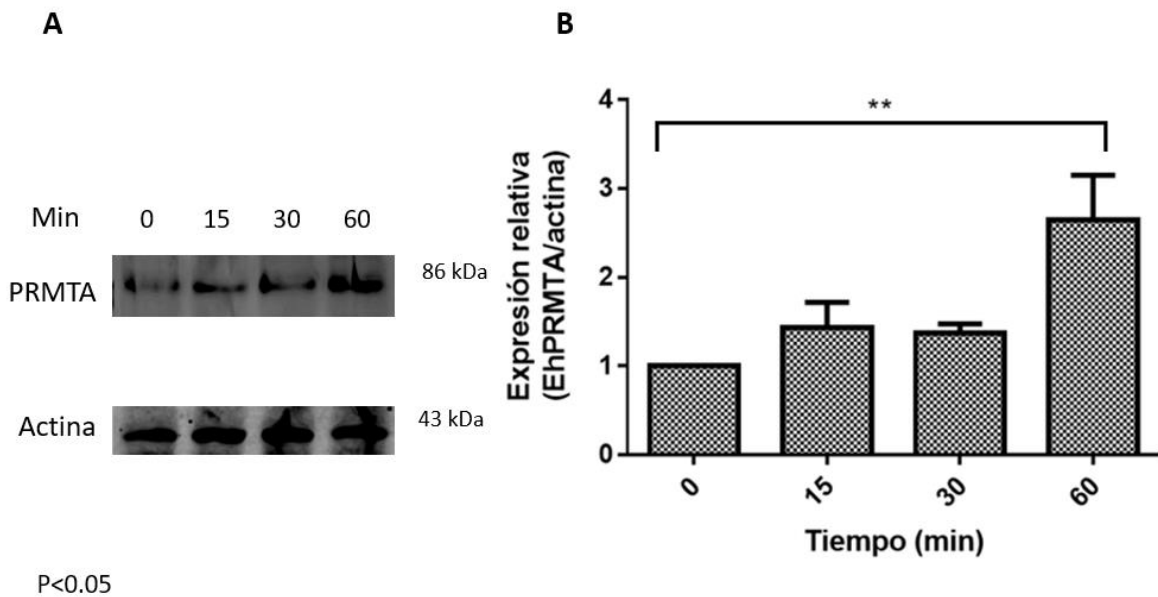


**Fig. 22. Inmunofluorescencia de EhPRMTA durante la eritrofagocitosis.** Los trofozoítos incubados a 37 °C con eritrocitos humanos durante 0, 5, 10 y 15 min, se fijaron, se permeabilizaron y se incubaron con el anticuerpo anti-EhPRMT5 y un segundo anticuerpo acoplado a ALEXA 488 (verde). Los núcleos se contra-tiñeron con DAPI (azul). z/y; corte en los ejes zy de los núcleos.

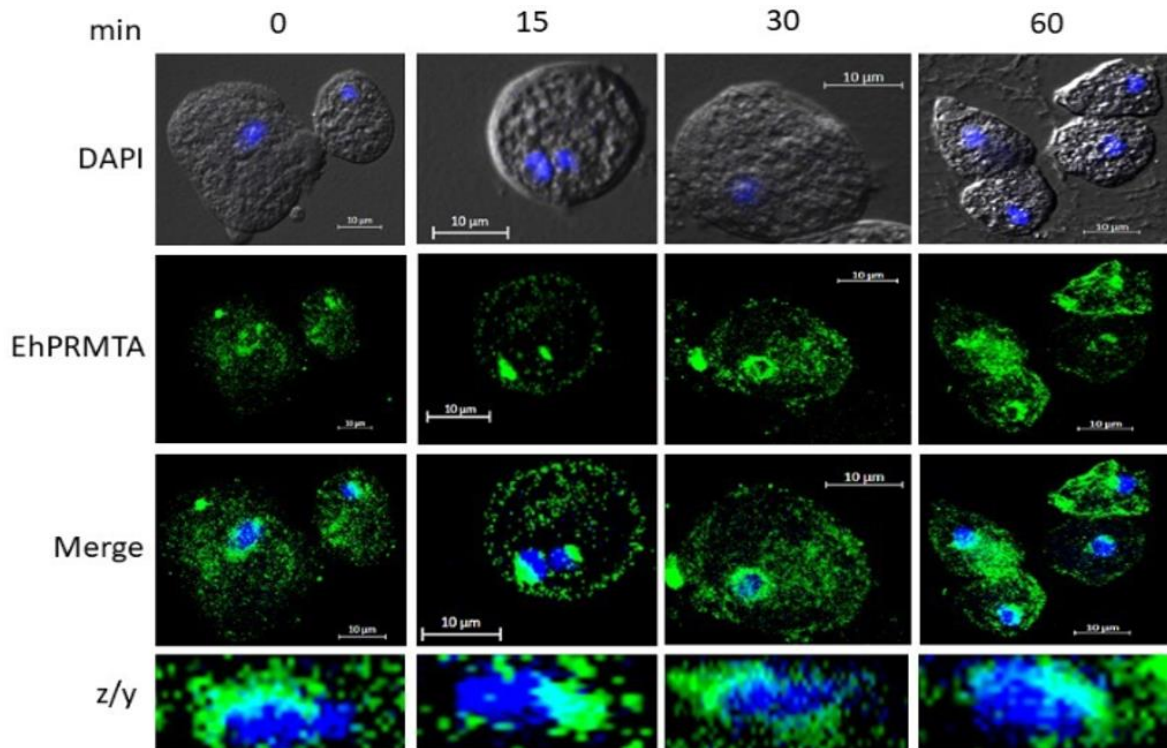
### 7.8 Expresión y localización subcelular de la proteína EhPRMTA durante el choque térmico

Posteriormente, se analizó la expresión de EhPRMTA durante el choque térmico, el cual fue realizado de la misma manera que con EhPRMT5, es decir, a 42 °C

durante 15, 30 y 60 min. Se realizaron los análisis por western blot, donde se encontró un aumento claro de la expresión a los 60 min (Fig. 23A). En el análisis por densitometría se obtuvo que la proteína aumentó ligeramente su expresión a los 15 y 30 min con respecto a la condición basal, pero sin diferencias estadísticamente significativas, pero confirmó que la cantidad de proteína se incrementó más de dos veces a los 60 min (Fig. 23B). En cuanto al análisis de la localización subcelular por inmunofluorescencia, se observó que la proteína en condiciones basales se encuentra distribuida en el citoplasma y en menor proporción en el núcleo de los trofozoítos (Fig. 24); sin embargo, la señal de EhPRMTA sufrió una relocalización hacia el perímetro del núcleo de los trofozoítos a partir de los 15 min de choque térmico, condición que aumentó a 30 min; finalmente, a los 60 min se detectó un incremento de la señal (Fig. 24), lo que concuerda con los resultados de Western blot. Además, se observó la evidente localización en la periferia y en el interior de los núcleos, sugiriendo que EhPRMTA tiene una participación epigenética en este proceso, regulando positiva o negativamente la expresión de genes y posiblemente para conferir protección al DNA.



**Fig. 23. Expresión de EhPRMTA en choque térmico. (A)** Los trofozoítos de *E. histolytica* se sometieron a choque térmico al incubarlos a 42 °C durante 15, 30 y 60 min. Posteriormente, a esos tiempos se obtuvieron extractos totales que se analizaron por western blot utilizando el anticuerpo contra EhPRMTA y como control de carga con un anticuerpo contra actina. **(B)** Las bandas reconocidas por los anticuerpos se analizaron por densitometría y los datos de EhPRMTA se normalizaron al contenido de actina. La expresión relativa en las células incubadas a 37 °C (tiempo 0) se tomó arbitrariamente como la unidad. Los datos representan la media  $\pm$  el error estándar de tres experimentos independientes por duplicado.  $**p < 0.01$ .



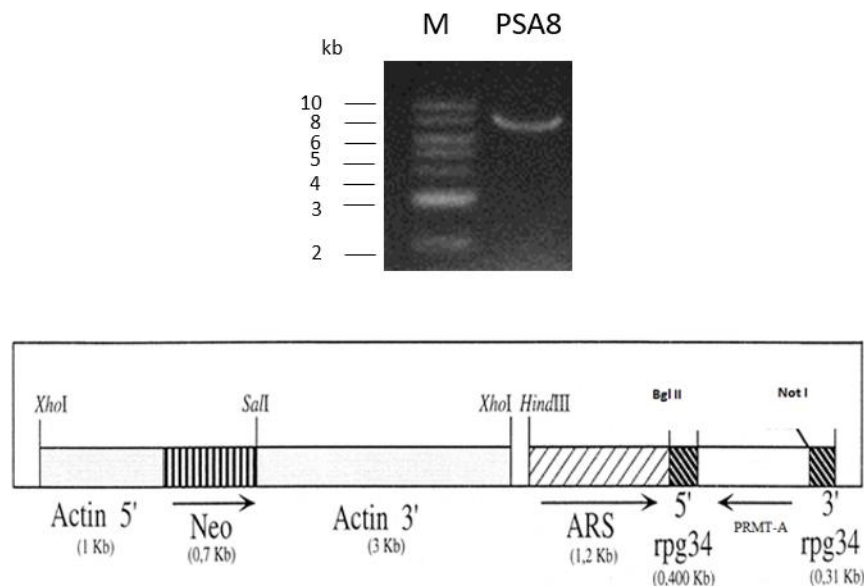
**Fig. 24. Inmunofluorescencia de EhPRMTA en choque térmico.** Los trofozoítos incubados a 37 °C (tiempo 0) o a 42 °C durante 15, 30 y 60 min, se fijaron, se permeabilizaron y se incubaron con el anticuerpo anti-EhPRMT5 y un segundo anticuerpo acoplado a ALEXA 488 (verde). Los núcleos se contra-tiñeron con DAPI (azul). z/y: corte óptico en los ejes z/y de los núcleos.



Com base en los resultados obtenidos, se sugiere que EhPRMTA es una proteína de tipo I debido a sus características estructurales y la presencia de algunos aminoácidos canónicos de este tipo de enzimas en su secuencia, aunque algunos otros están ausentes. Sin embargo, se soporta la hipótesis de que no es una proteína homóloga a PRMT1. Por otro lado, EhPRMTA incrementó su expresión durante la cinética de eritrofagocitosis y a los 60 min de choque térmico, así como también aumentó su presencia en el núcleo en ambas condiciones, lo que sugiere que esta enzima puede participar en la regulación de ambos eventos.

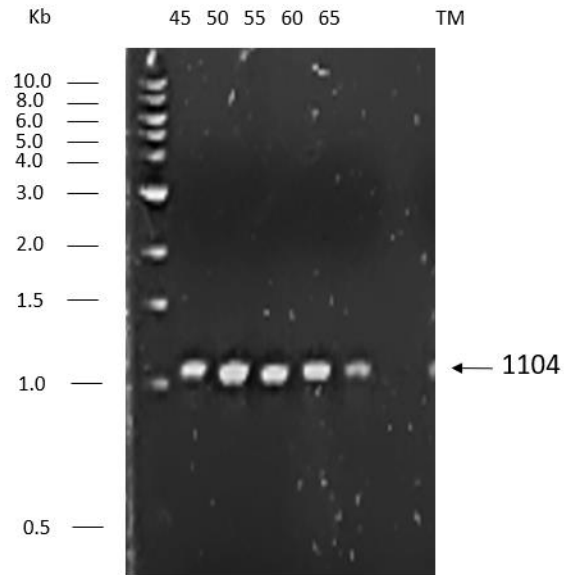
### 7.9 Efecto del silenciamiento de EhPRMTA en la virulencia *in vitro* del parásito y en choque térmico

Para obtener más evidencias de la participación de EhPRMTA en la respuesta a choque térmico y en la eritrofagocitosis, así como en otros eventos de estrés y de la virulencia *in vitro* de *E. histolytica* se decidió analizar el efecto del silenciamiento de la proteína en esos eventos. Para lograr el silenciamiento, el gen *Ehprmta* se clonó en antisentido en el vector PSA8 (Fig. 25) y la construcción se transfectó en trofozoítos de *E. histolytica*.



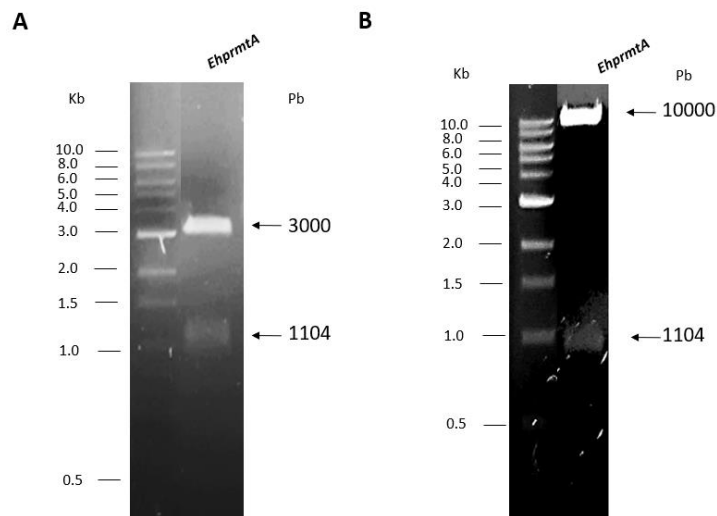
**Fig. 25. Vector de silenciamiento PSA8.** El vector tiene un tamaño de 10 Kb. En el mapa se observa el sitio de inserción en antisentido para lograr el silenciamiento (Ankri *et al.* 1998).

Así, se realizó la amplificación por PCR del gen *Ehprmta* utilizando como iniciadores los oligonucleótidos correspondientes a los extremos del gen y conteniendo los sitios de restricción necesarios para la clonación. En estos ensayos de PCR se utilizó un gradiente de temperatura de alineamiento y se logró un producto único de amplificación con el tamaño esperado en todas las temperaturas empleadas (Fig. 26). Posteriormente, se realizó la clonación en el vector de tránsito pCRII-TOPO, un vector de 3.9 Kb el cual contiene secuencias de poli-T que flanquean el sitio de inserción complementarias a los sitios poli-A agregados a los productos de PCR por la enzima Taq polimerasa (Invitrogen Life Technologies Cloning Manual). Para verificar la clonación del inserto de interés, el DNA plasmídico obtenido de una de las colonias transformadas se analizó mediante ensayos de restricción con las enzimas flanqueantes al gen *Ehprmta* y electroforesis en gels de agarosa teñidos con bromuro de etidio. En la figura 27A se muestra la liberación del inserto del tamaño esperado, el cual se envió para su secuenciación al laboratorio de biología celular de la UACM. La secuencia obtenida se comparó con la secuencia presente en la base de datos AmoebaDB y se obtuvo un 100% de identidad, confirmando que se trata del gen de interés.



**Fig. 26. Amplificación del gen *Ehprm1*.** Utilizando DNA genómico de *E. histolytica* y oligonucleótidos correspondientes a los extremos 5' y 3' del gen y conteniendo las secuencias de restricción para las enzimas *Bgl*I y *Not*I se realizó la amplificación del gen en un gradiente de temperatura de alineamiento, donde se observa el producto de PCR de 1104 pb.

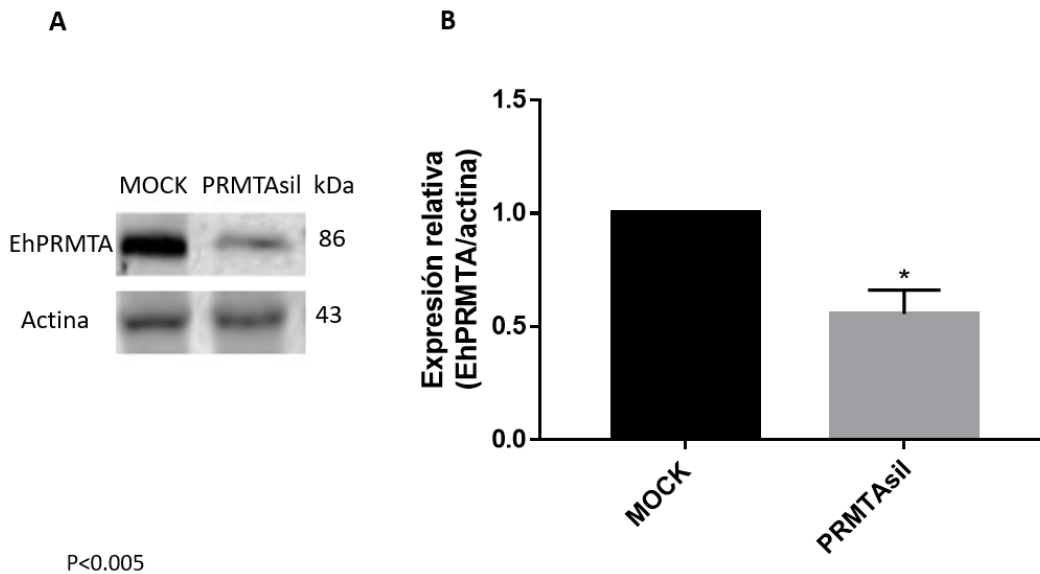
Enseguida, el producto liberado del vector pCRII-TOPO se purificó del gel de agarosa y se ligó al vector PSA8. Nuevamente se verificó la clonación mediante análisis de restricción y electroforesis en geles de agarosa teñidos con bromuro de etidio (Fig. 27B).



**Fig. 27. Clonación del gen *EhprmtA* en los vectores PCRII-TOPO y PSA8. (A)** El gen *EhprmtA* fue clonado en el vector de tránsito PCRII-TOPO, el DNA plasmídico de una de las bacterias transformada se analizó por restricción con las enzimas *Bgl*II y *Not*I y electroforesis en geles de agarosa teñidos con bromuro de etidio. **(B)** El producto liberado del vector PCRII-TPO se ligó en el vector pSA8 y el DNA plasmídico de una de las bacterias transformada se analizó por restricción con las enzimas *Bgl*II y *Not*I y electroforesis en geles de agarosa teñidos con bromuro de etidio.

Posteriormente, la construcción PSA8-*EhprmtA* se transfectó en los trofozoítos, los cuales se seleccionaron con el análogo de Neomicina G418 hasta alcanzar la concentración de 40 µg/mL de G418 para la selección de los transfectantes. Posteriormente, se corroboró el silenciamiento de EhPRMTA mediante inmunodetección. Para ello, los extractos amibianos totales de trofozoítos transfectados con el vector vacío (MOCK) y transfectados con la construcción PSA8-*EhprmtA* (EhPRMTAsil) se sometieron a ensayos de Western blot utilizando el anticuerpo contra EhPRMTA. Los resultados mostraron una disminución en el reconocimiento de la enzima en los extractos de trofozoítos EhPRMTAsil en comparación con los MOCK, mientras que el reconocimiento de actina fue similar en ambos extractos (Fig. 28A). Dichos ensayos se analizaron por densitometría,

en donde se observó aproximadamente un 50% de silenciamiento de la proteína (Fig. 28B).



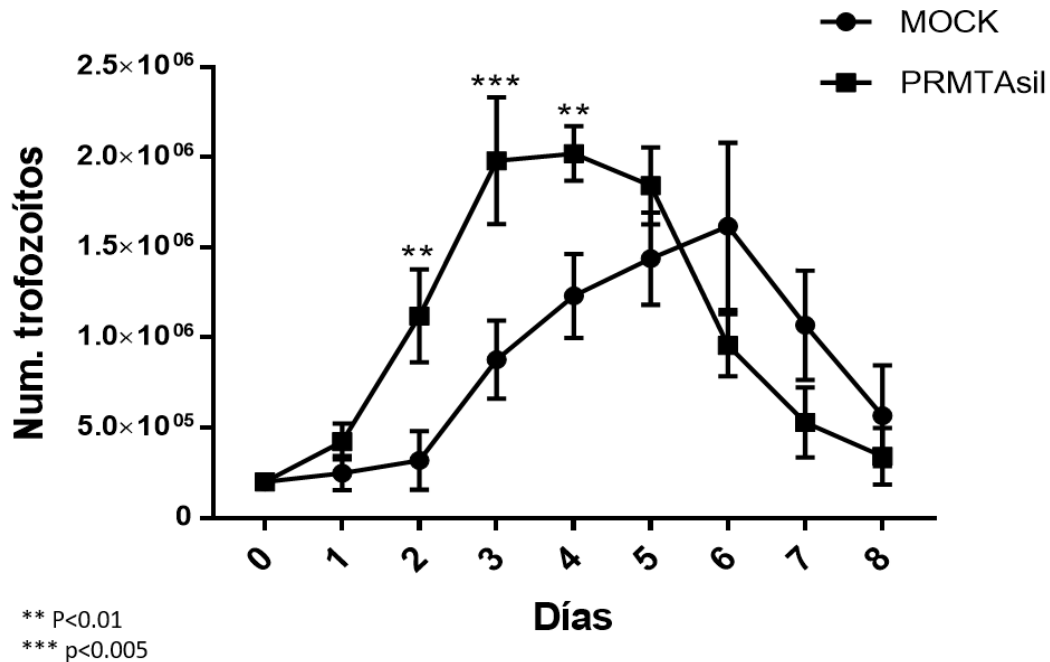
P<0.005

**Fig. 28. Silenciamiento de la proteína EhPRMTA en trofozoítos de *E. histolytica*.** (A)

Los extractos totales de trofozoítos transfectados con la construcción pSA8-EhPRMTA (PRMTAsil) y de los transfectados con el vector vacío (MOCK) se sometieron a ensayos de Western blot usando el anticuerpo contra EhPRMTA. Como control de carga, las mismas membranas se analizaron con un anticuerpo anti-actina. (B) Las bandas reconocidas por los anticuerpos se analizaron por densitometría y los datos de EhPRMTA se normalizaron al contenido de actina. La expresión relativa en los trofozoítos MOCK se tomó arbitrariamente como la unidad. Los datos están expresados como la media de tres experimentos independientes  $\pm$  el error estándar. \* $p < 0.005$

Se conoce que muchas proteínas metiltransferasas en humano tienen participación de manera importante durante procesos como la embriogénesis, así como en procesos patológicos como el cáncer, concretamente en la proliferación celular, donde influyen en la progresión del ciclo celular a diferentes niveles (Raposo y Piller. 2018). Por esa razón se analizó el efecto del silenciamiento de EhPRMTA en el crecimiento de los trofozoítos de *E. histolytica*. Cuando se comparó el crecimiento de los trofozoítos EhPRMTAsil y MOCK, se observó que

los trofozoítos EhPRMTAsil tienen un crecimiento más rápido, alcanzando el pico de crecimiento a los tres días de la cinética, mientras que los trofozoítos MOCK lo alcanzaron hasta el sexto día (Fig. 29). La disminución en la expresión de la proteína junto al fenotipo de crecimiento más rápido nos indicó que EhPRMTA funge como un regulador negativo del crecimiento, posiblemente actuando a nivel de ciclo celular.

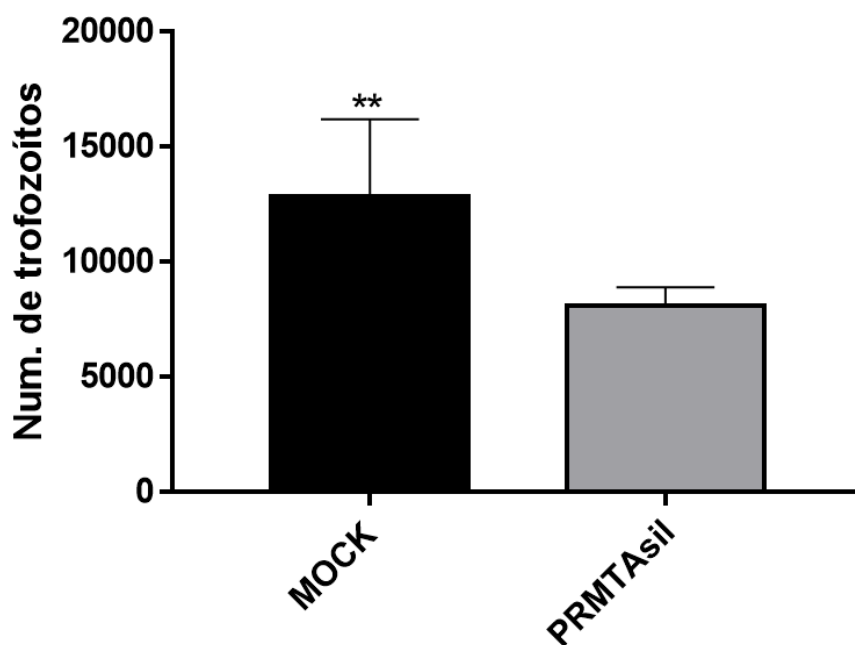


**Fig. 29. Efecto del silenciamiento de EhPRMTA en el crecimiento de *E. histolytica*.** Se analizó el crecimiento de las células viables de los cultivos EhPRMTAsil y MOCK cada 24 h durante 8 días. \*\*p<0.01; \*\*\*p<0.005.

Posteriormente, se analizó la capacidad de migración de los trofozoítos, debido a que esta característica también es importante en células de cáncer durante la metástasis, así como también es un factor de virulencia en *E. histolytica*. Los ensayos de migración se realizaron en contenedores Transwell, en donde se observó que los trofozoítos EhPRMTAsil tienen una menor capacidad de migración con respecto a los trofozoítos MOCK, dicha disminución es de aproximadamente 40% (Fig. 30). Así, la disminución en la expresión de EhPRMTA

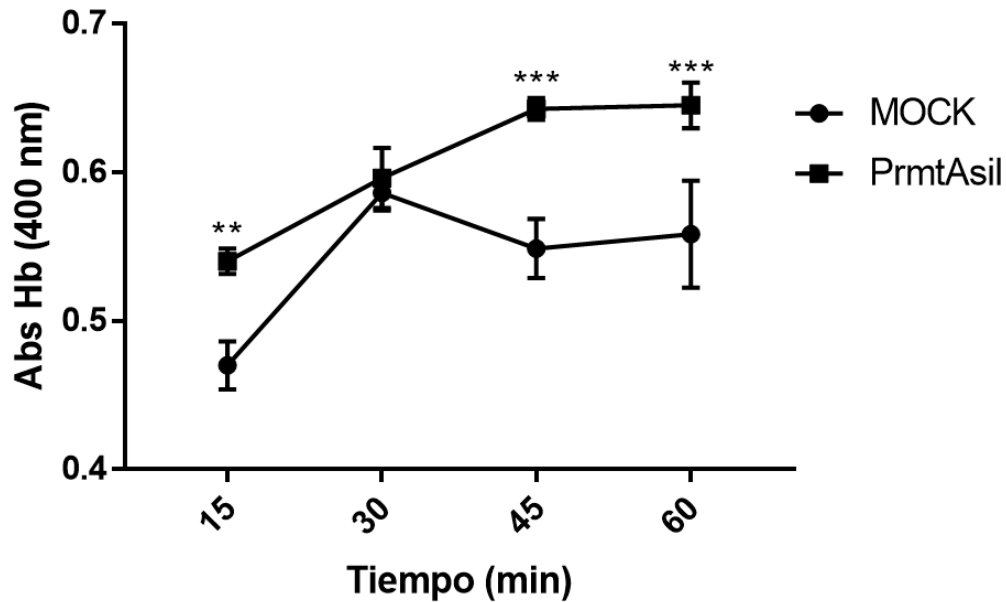
y una menor migración sugiere una regulación positiva de este evento por parte de la enzima.

El otro factor de virulencia analizado fue la eritrofagocitosis de los trofozoítos, ya que el diferente nivel de expresión de EhPRMTA, así como su relocalización durante este evento sugerían que posiblemente esta proteína tiene una función en la regulación de este evento. En la cinética de eritrofagocitosis que se llevó a cabo se encontró que los trofozoítos EhPRMTAsil tuvieron una capacidad mayor de fagocitar eritrocitos con respecto a los MOCK, existiendo diferencia significativa prácticamente en todos los tiempos analizados (15, 30, 45 y 60 min) (Fig. 31). Este fenotipo nos indicó que la proteína EhPRMTA es un regulador negativo de la fagocitosis, posiblemente actuando a nivel de enzimas metabólicas.



P<0.01

**Fig. 30. Efecto del silenciamiento de EhPRMTA en la migración de los trofozoítos.** La migración de los trofozoítos MOCK y EhPRMTAsil se analizó en cámaras Transwell, usando como quimioatrayente el medio TYI suplementado con suero de bovino adulto. Los resultados están representados como la media  $\pm$  el error estándar de tres experimentos independientes por duplicado. \*\*p<0.01.

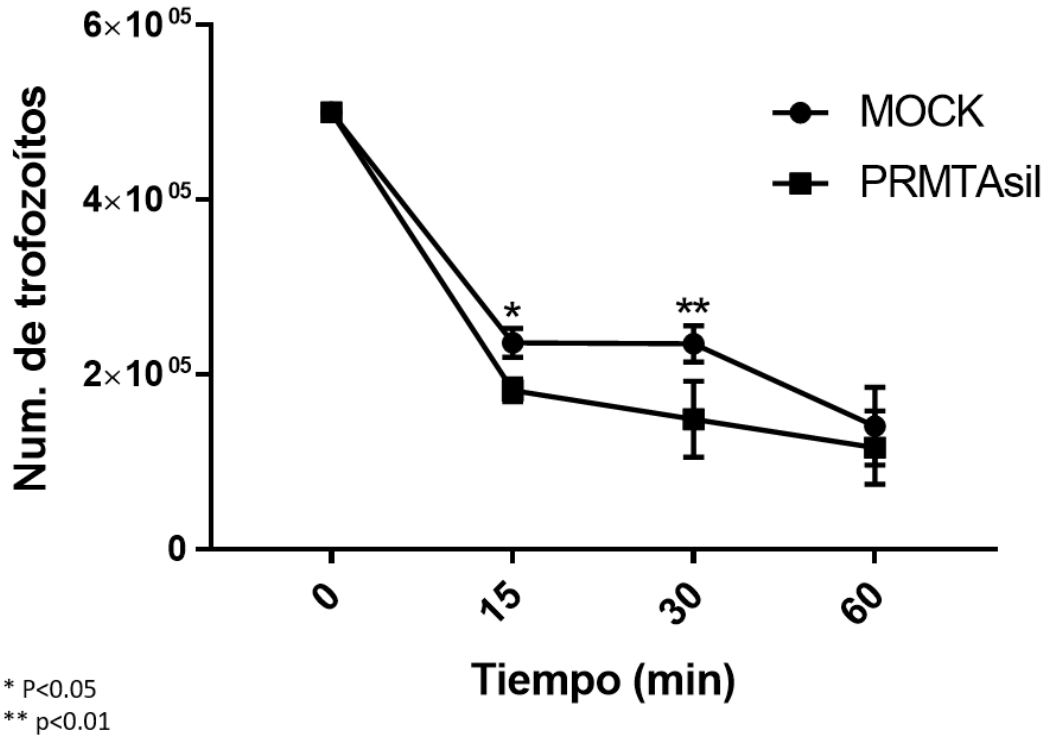


\*\* p<0.01  
 \*\*\* p<0.005

**Fig. 31. Efecto del silenciamiento de EhPRMTA en la eritrofagocitosis de *E. histolytica*.** Los trofozoítos MOCK y EhPRMTsil se incubaron a 37 °C por diferentes tiempos con eritrocitos humanos. Después de cada tiempo, los eritrocitos no ingeridos se lisaron con agua bidestilada, Después de lavados exhaustivos, los trofozoítos se lisaron con ácido fórmico y la hemoglobina liberada de los eritrocitos fagocitados se cuantificó por espectrometría a una absorbancia de 400 nm. Los datos representan la media ± el error estándar de tres experimentos independientes por duplicado. \*\*p<0.01; \*\*\*p<0.005.

Por otra parte, anteriormente observamos que la expresión de la proteína EhPRMTA se incrementó durante el choque térmico, así como una relocalización hacia el núcleo celular, lo que sugirió una participación de la proteína EhPRMTA durante esta condición de estrés. Para confirmar dicha participación se analizó el efecto de silenciamiento de EhPRMTA en la sobrevivencia de trofozoítos incubados a 42 °C. En estos ensayos se encontró que los trofozoítos EhPRMTAsil sobrevivieron menos que los MOCK a los 15 y 30 min de exposición al choque térmico (Fig. 32). Esto sugiere que EhPRMTA le confiere protección a la célula, lo que se ve reflejado en la menor cantidad de células EhPRMTAsil sobrevivientes después de la condición de estrés.





**Fig. 32. Efecto del silenciamiento de EhPRMTA en la sobrevivencia de los trofozoítos durante el choque térmico.** Los trofozoítos MOCK y EhPRMTAsil se incubaron a 42 °C durante diferentes tiempos, en los cuales se analizó la viabilidad de los parásitos. Los datos son expresados como la media  $\pm$  el error estándar de tres experimentos independientes por duplicado. \*p<0.05; \*\*p<0.01

En resumen, se logró el silenciamiento de EhPRMTA en aproximadamente un 50%. Dicho silenciamiento aumentó la velocidad del crecimiento celular en condiciones normales, por lo que podría fungir como regulador negativo de proteínas del ciclo celular. El silenciamiento de EhPRMTA también disminuyó la capacidad de migración, así como también la sobrevivencia de los trofozoítos en condición de choque térmico. Por último, la disminución de EhPRMTA también afectó la fagocitosis, en donde se vio un aumento de ésta en los trofozoítos donde la proteína se silenció, siendo posiblemente un regulador negativo de este proceso.

## 8. DISCUSIÓN

La participación de las proteínas metiltransferasas de arginina en diversos procesos celulares, además de la regulación de la expresión genética, ha cobrado un auge importante en los últimos años, debido a que dicha participación influye en gran medida en procesos patológicos, como el cáncer, incluso contemplándose como marcadores de la enfermedad y como blancos terapéuticos (Stopa *et al.* 2015). La presencia y participación de las PRMT's es de igual manera importante en la vida de organismos parásitos eucariotas unicelulares, ya que regulan factores de virulencia y genes que le permiten a estos organismos poder progresar a los diferentes estadios de sus ciclos de vida (Fisk y Read. 2011).

En nuestro grupo de trabajo se reportó de manera previa la presencia de cinco genes que codifican para PRMT's putativas en *E. histolytica*, en donde se encontró que una de las proteínas homólogas a PRMT1 (EhPRMT1a) cataliza la dimetilación asimétrica de la R3 de la histona H4 (Borbolla *et al.* 2015). Además, en nuestros estudios de maestría se comprobó la actividad enzimática de EhPRMT5 y EhPRMTA, así como su localización subcelular, la cual presenta una distribución por todo el citoplasma (EhPRMT5) y en menor medida en el núcleo (Medina Gómez, 2015). Sin embargo, no se conocen los procesos en los que estas proteínas participan y la importancia de dicha participación en la biología, virulencia y sobrevivencia de *E. histolytica* a diferentes condiciones de estrés.

En este trabajo se encontró evidencia de que ambas proteínas (EhPRMT5 y EhPRMTA) poseen un papel en la citoprotección hacia estímulos externos como el choque térmico, así como en mecanismos involucrados en la virulencia del parásito. Además, la ausencia de EhPRMTA nos brindó pruebas de su capacidad regulatoria, tanto positiva como negativa, en diversos procesos de la vida del parásito.

Mediante un análisis filogenético se encontró que EhPRMT5 es sin duda una proteína homóloga a PRMT5 de humano, esto corresponde a lo encontrado en otros parásitos, en donde siempre existe al menos una proteína de tipo II similar a

PRMT5 (Fisk y Read. 2011). Al analizar más a detalle la secuencia de EhPRMT5, se encontró que tiene los dominios estructurales principales presentes en la proteína de humano, los cuales son el dominio de barril TIM, el sitio catalítico de metiltransferasa de arginina dependiente de SAM y el brazo de dimerización, además de compartir 30.66% de identidad; así mismo, estructuralmente ambas proteínas tienen un 33.11% de identidad. El dominio de barril TIM en la proteína de humano y de *X. laevis* tiene participación en la formación de dímeros, al promover la oligomerización por interacción con el dominio catalítico, así como en el reclutamiento de la proteína MEP50, la cual incrementa tanto su actividad como la interacción con el sustrato (Stopa *et al.* 2015). Al estar presente este sitio en EhPRMT5 se sugiere la presencia de un ortólogo de MEP50 en *E. histolytica*, sin embargo, la búsqueda de esta proteína en el parásito no ha sido exitosa, por lo que posiblemente en este microorganismo exista una proteína diferente que efectúe la misma función, o que la actividad de EhPRMT5 no requiera de proteínas accesorias.

El análisis *in silico* de EhPRMT5 sugiere que esta enzima es ortóloga de HsPRMT5 y por lo tanto, podría realizar la metilación simétrica de la R3 de la histona H4 (H4R3me2s), modificación relacionada con la represión transcripcional por el reclutamiento de la metilasa de DNA DNMT3A, la cual metila islas CpG y logra dicho silenciamiento en la transcripción, el cual se complementa con el posterior reclutamiento de factores como la caseína cinasa 2 $\alpha$  y la metilasa de lisina SUV4, que a su vez deposita la marca represiva H4K20me3 (Fulton *et al.* 2018). Es muy probable que EhPRMT5 también esté relacionada con la represión de la expresión genética mediante dicha modificación, lo que se refuerza por los ensayos de actividad *in vitro* sobre histonas comerciales, donde observamos una reactividad cruzada con el anticuerpo que reconoce la metilación asimétrica de este mismo residuo. Sin embargo, EhPRMT5 se detectó débilmente en el núcleo de los trofozoítos, al menos en las condiciones probadas, por lo que la proteína sería capaz de realizar la metilación de histonas *in vivo*, pero hasta el momento falta evidencia experimental para probar esta sugerencia. Por otra parte, podría sugerirse que los trofozoítos al ser una célula muy activa, los genes regulados

negativamente por la epigenética en esta fase del ciclo de vida de *E. histolytica* son pocos y por esa razón no observamos una marca significativa en los núcleos. Si esto es cierto, la localización de EhPRMT5 en el núcleo aumentaría en el quiste, la forma quiescente e infectiva de este microorganismo. Sin embargo, hasta el momento no se ha analizado la localización de EhPRMT5 en quistes de *E. histolytica* y no existen protocolos eficientes para el enquistamiento *in vitro* para este parásito de humanos. Para el estudio de la diferenciación en el género *Entamoeba* se ha utilizado como modelo al parásito de reptiles *E. invadens*, para el cual sí se tienen metodologías eficientes para producir quistes en el laboratorio. Interesantemente, en nuestro grupo de trabajo se ha visto que durante el proceso de enquistamiento de *E. invadens* existe un aumento de la expresión de la proteína PRMT5 (EiPRMT5) así como una gradual acumulación de esta proteína durante la cinética de enquistamiento (Ortíz-Hernández *et al.*, 2020), lo que soportaría la idea de que PRMT5 podría participar en el silenciamiento masivo de genes en la fase infectiva del género *Entamoeba*.

Por otra parte, el análisis de la expresión de EhPRMT5 durante el choque térmico mostró que la proteína se concentró en estructuras vesiculares que sugerimos que se tratan de gránulos de estrés. Estos gránulos funcionan como centros de almacenaje de complejos de inicio de la traducción protegiéndolos de la degradación, para su posterior reposición cuando no haya condiciones de estrés, ya que se conoce que uno de los factores de inicio de la formación de los gránulos es la inhibición de la traducción provocada por la fosforilación de eIF1 $\alpha$  (Tsai *et al.* 2016; Haghandish *et al.* 2019). Se sabe también que las modificaciones postraduccionales pueden regular la formación de esos gránulos por medio de la alteración de interacciones específicas, siendo una de estas la metilación de secuencias RGG en algunas proteínas como FUS o EWS (Guzikowski *et al.* 2018), además de que se ha reportado la regulación tanto positiva como negativa por parte de las PRMT's en el proceso de formación de gránulos de estrés. En el caso de regulación positiva, PRMT7 es necesaria para la formación de estas estructuras, ya que su actividad sobre eIF1 $\alpha$  regula su fosforilación en Ser51, además cuando PRMT7 fue silenciada, las células MCF7 presentaron una

reducción del 50-90% en la formación de los gránulos bajo condiciones de estrés (Haghandish *et al.* 2019). Por otro lado, en otro estudio se encontró que cuando se metila G3BP1, la cual es una proteína clave en la nucleación y formación de los gránulos, en distintos residuos de arginina por PRMT1 o PRMT5, la formación de estos se reduce en células U2OS; así mismo, cuando la actividad de ambas PRMT's es suprimida, la formación de los gránulos se reestablece e incluso se incrementa, revelando que la metilación en el motivo RGG de G3BP1 es un factor de regulación negativa de la formación de los gránulos de estrés (Tsai *et al.* 2016). En este estudio se encontró que EhPRMT5 tiene un reacomodo espacial en el citoplasma de los trofozoítos al someterse a choque térmico, posiblemente formando parte estructural de los gránulos o interactuando con los factores de inicio de la formación de éstos, como lo hace HsPRMT7. Para corroborar esta posibilidad, se realizó el ensayo de colocalización de EhPRMT5 y EhHsp70, ya que se conoce que esta chaperona se expresa en condiciones de estrés, además de que se puede encontrar en gránulos de estrés con diferentes funciones (Walters *et al.* 2015). En estos ensayos encontramos la colocalización de ambas proteínas. Si bien con esto no confirmamos la participación y presencia de EhPRMT5 en la formación y composición de los gránulos de estrés, la colocalización entre ambas confirma que la proteína participa en la respuesta a choque térmico, por lo que se necesitan más experimentos para discernir la verdadera función de EhPRMT5 en este estímulo de estrés. A su vez, dada la evidencia de la metilación en arginina de EhHsp70 y su colocalización con EhPRMT5, se sugiere que la chaperona es blanco de metilación por parte de la metiltransferasa, como se ha comprobado en otros estudios, donde Hsp70 es metilada en R469 por CARM1 (Gao *et al.* 2015). Además, se ha reportado que en un modelo murino la interacción de PRMT5 y Hsp70 sirve para la poliubiquitinación y degradación de una variante de esta última (Lu *et al.* 2019).

Finalmente, para EhPRMT5 no se detectó una relación directa con la eritrofagocitosis, ya que la expresión de la proteína solo varía significativamente en uno de los tiempos y no existe relocalización evidente de la misma en ensayos

de inmunofluorescencia, por lo que se sugiere que EhPRMT5 no participa en este proceso.

Por otro lado, el análisis *in silico* de EhPRMTA reveló que la proteína tiene un porcentaje de identidad mayor con proteínas de tipo I. Si bien el análisis filogenético inicial realizado en otro estudio muestra que secuencialmente está más relacionada a PRMT1 que a otros miembros de la familia de metiltransferasas de arginina (Fisk y Read, 2011), nuestro análisis filogenético mostró que no pertenece a ningún clado de PRMT's (Borbolla *et al.* 2015). En este trabajo se encontró que EhPRMTA no contiene algunos residuos canónicos de las enzimas de tipo I, como la Y154 del motivo YFxxY y la S217, los cuales se encargan de la regulación en la actividad de la estructura de la holoenzima, sugiriendo que en EhPRMTA la unión a SAM no se regula por fosforilación de serina. Una secuencia más que no se encuentra conservada del todo en EhPRMTA es el núcleo de unión a SAM, en donde la enzima amibiana solo contiene dos de las tres glicinas conservadas en la PRMTs. Sumado a esto, EhPRMTA tampoco conserva los aminoácidos de interacción con S-Adohcy, que en enzimas de tipo I son H, M, D y R que se encuentran en RnPRMT1 en las posiciones 45, 48, 51 y 54 (Tewary *et al.* 2019). En cuanto a la otra secuencia conservada de enzimas de tipo I, el motivo THW, EhPRMTA contiene una valina en lugar de la histidina característica del motivo. Como se mencionó anteriormente, para que la enzima pueda producir ADMA, es decir, un producto dimetilado asimétricamente, se necesita que la subregión superior sea abierta mientras que la inferior, correspondiente al THW, sea restringida. El cambio de la histidina por valina conservaría el estado restringido de la subregión inferior, ya que la estructura de la valina es incluso de menor tamaño que la histidina. En el loop doble E, el cual forma la subregión superior del sitio catalítico, de los residuos de glutamato que flanquean la secuencia, EhPRMTA solo conserva el primero, mientras que el segundo se encuentra sustituido por aspartato (posición 177). Estudios de mutagénesis en TbPRMT7, enzima de tipo III (monometilación) muestran que el cambio del segundo glutamato del loop doble E (E181D) no cambió la afinidad en la unión de la enzima a argininas no metiladas, en cambio, incrementó la afinidad de unión a

MMA y cambió el tipo de producto formado por la proteína, el cual fue ADMA, sugiriendo que este cambio podría estabilizar la interacción enzima-sustrato, facilitando la dimetilación (Debler *et al.* 2016). Tomando en cuenta que el segundo residuo de glutamato está cambiado a aspartato en EhPRMTA, el cambio por valina en el motivo THW, y el análisis estructural, en donde la disposición espacial de las subregiones del sitio catalítico de EhPRMTA es muy similar a la observada en RnPRMT1, puede sugerirse que a pesar de no conservar varios de los motivos y aminoácidos canónicos de las metiltransferasas de tipo I, EhPRMTA pertenece a las enzimas de este tipo. Sin embargo, no es una proteína homóloga a PRMT1.

Se ha descrito que la sobreexpresión de algunas PRMT's, incluyendo PRMT1, está asociada con una alta proliferación celular (Yang *et al.* 2013; Shailesh *et al.* 2018). PRMT1 metila asimétricamente la histona H4 en R3, una marca que está asociada con promotores activos de transcripción; se ha identificado que una hipermetilación de H4R3me2a está relacionada con cáncer, en donde la sobreexpresión de PRMT1 promueve la transición mesenquimal a epitelial en leucemia (Cheung *et al.* 2016). PRMT4 (o CARM1) es un regulador positivo del gen de la ciclina E1, la cual aumenta su expresión hacia la transición a fase S, teniendo función pro-proliferativa, además de que es esencial para la proliferación del ciclo celular inducida por estrógeno en cáncer de mama por regulación positiva de E2F1 (Raposo y Piller. 2018). PRMT5 es esencial para la proliferación celular, en donde su actividad correlaciona con un incremento en la expresión de CDK4 y CDK6 en la fase G1 del ciclo celular, así como también PRMT6, la cual inhibe a p21 junto con p27, lo que provoca la progresión del ciclo celular a través de CDK1 y 2 (Raposo y Piller. 2018). Esto se corrobora junto con los análisis realizados al inhibir la actividad enzimática de PRMT's, en donde dicha inhibición provoca el arresto del ciclo celular (Wang *et al.* 2017; Zhang *et al.* 2017, Nakai *et al.* 2018). Sin embargo, PRMT2, contrario a las otras PRMT's, es un regulador negativo del ciclo celular. Se ha visto que esta proteína está disminuida en cáncer de mama, donde su presencia provoca la disminución en la expresión de la ciclina D1, la cual es necesaria para la transición de la fase G1 a S en el ciclo celular, correlacionando negativamente con el reclutamiento de ER $\alpha$  al promotor de

CCND1, donde PRMT2 suprime la afinidad de unión de ER $\alpha$  al sitio activador AP1 en dicho promotor (Zhong *et al.* 2014). Al mismo tiempo, en tejidos de tumor donde existe sobreexpresión de CCND1, PRMT2 no se detecta, mientras que en condición normal, la expresión de PRMT2 se detectó en el núcleo, con una baja detección de la expresión de CCND1 (Zhong *et al.* 2014; Zhong *et al.* 2017). El fenotipo observado en el silenciamiento de EhPRMTA en la cinética de crecimiento nos indicó que la proteína regula negativamente el ciclo celular, al observarse una proliferación más rápida de los trofozoítos EhPRMTAsil con respecto a los MOCK, lo que indica que, en cuanto a la regulación de la proliferación celular, EhPRMTA es funcionalmente similar a PRMT2.

El estrés por choque térmico induce cambios importantes en la expresión de genes, donde la metilación funge como reguladora de este proceso. En otros organismos, como levaduras, después de un choque térmico se observa un aumento en la producción de SDMA al mismo tiempo que un decremento en la producción de ADMA y  $\delta$ -MMA (metilación de tipo IV) (Lakowski *et al.* 2015). En *Drosophila* también existe una alteración en el patrón de metilación de proteínas, en ese caso histonas, en respuesta a choque térmico, en donde se encuentran residuos metilados que en condiciones normales se encuentran ausentes (Desrosiers y Tanguay, 1988). Así mismo, la inhibición de la actividad y silenciamiento de HsPRMT7, asociada a la metilación de variantes constitutivas e inducibles de Hsp70, impacta la tolerancia a la temperatura y el estrés proteostático de las células, específicamente la metilación de Hsp70 en R469 (Szewczyk *et al.* 2020). En cuanto a la metilación de Hsp70, ésta ha sido encontrada también en fibroblastos de embriones de pollo y en células 3T3, así como el nivel de ésta cambió después de un tratamiento con arsenito (Wang y Lazarides. 1984, Wang *et al.* 1992). Estos resultados sugieren que la metilación en arginina de proteínas histonas y no histonas se encuentra involucrada en la respuesta al choque térmico, así como en la citoprotección en respuesta a condiciones de estrés. En la condición de choque térmico, EhPRMTA sufrió una relocalización tanto hacia la periferia nuclear como al interior del núcleo de los trofozoítos, así como también se observó un incremento en la expresión de la



proteína después de 60 minutos de tratamiento. Al analizar el efecto de esta condición de estrés en los trofozoítos donde EhPRMTA se encontraba silenciada, se encontró que la sobrevivencia de células MOCK era mayor a 15 y 30 min. Estos resultados indican que EhPRMTA también participa en la respuesta a choque térmico, posiblemente en la regulación de la transcripción para una mejor respuesta a este estímulo por su relocalización al núcleo, además de que claramente dicha regulación o participación directa influye en la citoprotección.

Por otro lado, se ha reportado que algunas PRMT's regulan la virulencia de algunos parásitos. Por ejemplo, al disminuir la expresión de PRMT7 en *L. major* se incrementa su infectividad, mientras que una sobreexpresión de la proteína se ve traducida en una reducción en la progresión de las lesiones causadas por este parásito (Ferreria *et al.* 2014). En el presente trabajo se observó que durante eritrofagocitosis, un evento relacionado con la virulencia de *E. histolytica* (Orozco *et al.*, 1983), EhPRMTA sufre una relocalización evidente después de 15 minutos de interacción de los trofozoítos con los eritrocitos. Esto, aunado a la relocalización de la proteína al núcleo, nos da la pauta a pensar que EhPRMTA podría participar en la regulación de manera epigenética de genes involucrados en la fagocitosis. Esto se corroboró con los ensayos de eritrofagocitosis con EhPRMTAsil, donde los trofozoítos que tienen a la proteína silenciada mostraron un incremento en su capacidad fagocítica con respecto a los trofozoítos MOCK. La participación de PRMT's en el metabolismo se ha reportado previamente. Por ejemplo, el *knockout* de TbPRMT1 regula positivamente varias enzimas involucradas en la vía de degradación de prolina, la cual es de importancia debido a que esta vía es la principal presente en la forma procíclica, incapaz de utilizar glucosa, así como también disminuyen con la ausencia de PRMT1 proteínas de la vía glucolítica (Kafková *et al.* 2018). Otro ejemplo es la variante  $\beta$  de PRMT2 en humano, la cual suprime la autofagia y la vía glucolítica en células de cáncer de mama, concretamente regula los genes LC3-I, LC3-II y beclina-1 en el caso de autofagia, y hexocinasa 2, lactato deshidrogenasa, fosfofructocinasa y piruvato cinasa en el caso de la glucólisis, resultado de una activación menor de Akt en las células donde se sobreexpresó PRMT2 $\beta$ ; así mismo, se observó una disminución

en los niveles intracelulares de ATP, consumo de glucosa y producción de lactato (Chen et al. 2019). De acuerdo a lo observado en este trabajo, EhPRMTA se dirige al núcleo de los trofozoítos y regula negativamente proteínas relacionadas con la fagocitosis, lo que indicaría nuevamente un parecido funcional con PRMT2.

Por otra parte, la migración de los trofozoítos EhPRMTA<sup>sil</sup> fue menor que la presentada por las células MOCK. Este comportamiento también se observa en células Huh7 (carcinoma hepatocelular) y MCF-7 (cáncer de mama) células HuH7, donde el silenciamiento de provoca una reducción en su capacidad de migración, analizadas por ensayos de cierre de herida (Jiang et al. 2017; Oh et al. 2014), lo que indica nuevamente una relación funcional de EhPRMTA con PRMT2.

En conclusión, por el análisis llevado a cabo en este trabajo se sugiere que EhPRMT5 no participa en la fagocitosis de *E. histolytica*, sin embargo, ésta si pudiera participar en la respuesta al choque térmico, proceso durante el cual se localiza en aparentes gránulos de estrés y donde además Hsp70 podría ser blanco de metilación por parte de esta enzima. Además, se encontró que EhPRMT5 metila simétricamente H4 en R3, lo cual sugiere que podría tener funciones similares a la proteína ortóloga de humano. Por otro lado, se sugiere que EhPRMTA es una proteína de tipo I, pero de naturaleza atípica dadas sus características de secuencia y estructurales, además de que participa en el control epigenético durante la fagocitosis y en la respuesta a choque térmico. Así mismo, el silenciamiento de EhPRMTA indica que la proteína regula negativamente el crecimiento celular y la fagocitosis, y positivamente la migración y la respuesta a choque térmico. Finalmente, se sugiere que EhPRMTA es funcionalmente similar a HsPRMT2, sin embargo, no se nombró como tal debido a que el análisis filogenético no la sitúa en el mismo clado, y por las diferencias en cuanto a la conservación de algunos dominios presentes en HsPRMT2.

## 9. CONCLUSIÓN

Los resultados obtenidos en el presente trabajo sugieren que EhPRMT5 y EhPRMTA participan en la respuesta al choque térmico y que EhPRMTA también participa en la eritrofagocitosis. Además, se sugiere que EhPRMTA está funcionalmente relacionada con PRMT2 de organismos superiores.

## 10. PERSPECTIVAS

1. Identificar los sustratos de las proteínas EhPRMT5 y EhPRMTA.
2. Confirmar el papel de estas PRMTs en la regulación epigenética.
3. Identificar las vías de señalización en las que participan.
4. Evaluar el efecto del silenciamiento de EhPRMTA en otras condiciones de estrés y en la virulencia *in vivo*.
5. Realizar el silenciamiento de EhPRMT5 y analizar su efecto en la respuesta a diferentes condiciones de estrés y en la virulencia *in vitro* e *in vivo*.

## 11. BIBLIOGRAFÍA

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

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

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

Antonyamy S., Bonday Z., Campbell R. M., Doyle B., Druzina Z., Gheyi T., Han B., Jungheim L. N., Qian Y., Rauch C., Russell M., Sauder J. M., Wasserman S. R., Weichert K., Willard F. S., Zhang A., Emtage S. (2012). Crystal structure of the human PRMT5:MEP50 complex. *Proc Natl Acad Sci USA*. 109(44). 17960-5.

Arroyo R., Orozco E. (1987). Localization and identification of an *Entamoeba histolytica* adhesin. *Mol Biochem Parasitol*. 23:151-158.

Bachand Francois. (2007). Protein Arginine Methyltransferases: from Unicellular Eukaryotes to Humans. *Eukaryotic Cell*. 6(6):889-898.

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

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

Biggar K. K., Li S. (2015). Non-histone protein methylation as a regulator of cellular signalling and function. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 16(1). 5-17.

Biswas S. and Rao C. M. (2018). Epigenetic tools (the writers, the readers and the erasers) and their implications in cancer therapy. *European Journal of Pharmacology*. 837: 8-24.

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

Borbolla-Vazquez, J., Orozco, E., Betanzos, A. and Rodriguez, M.A. (2015). *Entamoeba histolytica*: protein arginine transferase 1a methylates arginine residues and potentially modify the H4 histone. *Parasites & Vectors*. 8. 219.

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

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

Chen, Y., Dai, X., Yao, Y., Wang, J., Yang, X., Zhang, Y., et al. (2019). PRMT2beta suppresses autophagy and glycolysis pathway in human breast cancer MCF-7 cell lines. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*. 51. 335-337.

Cheung N., Fung T. K., Zeisig B. B., Holmes K., Rane J. K., Mowen K. A., Finn M. G., Lenhard B., Chan L. C. and So C. W. E. (2016). Targetting aberrant epigenetic networks mediated by PRMT1 and KDM4C in acute myeloid leukemia. *Cancer Cell*. 29(1). 32-48

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

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

Debler, E.W., Jain, K., Warmack, R.A., Feng, Y., Clarke, S.G., Blobel, G. and Stavropoulos, P. (2016). A glutamate/aspartate switch controls product specificity in a protein arginine methyltransferase. *PNAS USA*. 113. 2068-2073.

Desrosiers, R., and Tanguay, R.M. (1988) Methylation of *Drosophila* histones at proline, lysine and arginineresidues during heat shock. *J Biol Chem.* 263. 4686-46992.

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

Espinoza Cantellano Martha, Martínez Palomo Adolfo. (2000). Pathogenesis of Intestinal Amebiasis: From Molecules to Disease. *Clinical Microbiology Reviews.* 13(2). 318-331.

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

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

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

Ferreira, T.R., Alves-Ferreira, E.V., Defina, T.P., Walrad, P., Papadopoulou, B. and Cruz, A.K. (2014). Altered expression of an RBP-associated arginine methyltransferase 7 in *Leishmania major* affects parasite infection. *Molecular microbiology.* 94. 1085-1102.

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

Fisk J., Sayegh J., Zurita-López C., Menon S., Presnyak V., Clarke S. G., Read L. K. (2009). A type III protein arginine methyltransferase from the protozoan parasite *Trypanosoma brucei*. *J Biol Chem.* 284(17). 11590-600.

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

Fuhrmann, J., Clancy, K.W. and Thompson, P.R. (2015). Chemical biology of protein arginine modifications in epigenetic regulation. *Chem Rev*. 115. 5413-5461.

Fulton M. D., Brown T. and Zheng Y. G. (2018). Mechanisms and inhibitors of histone arginine methylation. *The Chemical Record*. 18. 1792-1807.

Gao W., Xiao R., Peng B., Xu H., Shen H., Huang M., Shi T., Yi J., Zhang W., Wu X., Gao X., Lin X., Dorrestein P. C., Rosenfeld M. G. and Liu W. (2015). Arginine methylation of HSP70 regulates retinoid acid-mediated RAR $\beta$ 2 gene activation. *PNAS*. 112(26). 3327-3336.

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

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

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

Guzikowski A. R., Chen Y. S. and Zid B. M. (2018). Stress-induced mRNP granules: Form and function of processing bodies and stress granules. *WIREs RNA*. 10(3). 1-17.

Haghandish N., Baldwin R. M., Morettin A., Dawit H. T., Adhikary H., Masson J. Y., Mazroui R., Trinkle-Mulcahy L and Côté J. (2019). PRMT7 methylates eukaryotic translation initiation factor 2 $\alpha$  and regulates its role in stress granule formation. *Mol Biol Cell*. 30(6). 778-793.

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

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

Jain, K., Warmack, R.A., Debler, E.W., Hadjikyriacou, A., Stavropoulos, P. and Clarke, S.G. (2016). Protein Arginine Methyltransferase Product Specificity Is Mediated by Distinct Active-site Architectures. *The Journal of biological chemistry*. 291. 18299-18308.

Jiang H., Zhou Z., Jin S., Xu K., Zhang H., Xu J., Sun Q., Wang J. and Xu J. (2017). PRMT9 promotes hepatocellular carcinoma invasion and metastasis via activating PI3K/Akt/GSK-3 $\beta$ /Snail signaling. *Cancer Science*. 109. 1414-1427.

Kafkova, L., Tu, C., Pazzo, K.L., Smith, K.P., Debler, E.W., Paul, K.S., et al. (2018). Trypanosoma brucei PRMT1 Is a Nucleic Acid Binding Protein with a Role in Energy Metabolism and the Starvation Stress Response. *mBio*. 9.

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

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

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

Lakowski, T.M., Pak, M.L., Szeitz, A., Thomas, D., Vhuiyan, M.I., Clement. B., et al. (2015) Arginine methylation in yeast proteins during stationary-phase growth and heat shock. *Amino Acids*. 47. 2561-2571.

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



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

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

Lorenzi HA, Puiu D, Miller JR, Brinkac LM, Amedeo P, Hall N, et al. (2010) New Assembly, Reannotation and Analysis of the *Entamoeba histolytica* Genome Reveal New Genomic Features and Protein Content Information. *PLoS Negl Trop Dis* 4(6): e716.

Lu W., Kim J. D., Tabara S., Kwon C., Mizukami H., Kimura K. and Fukamizu A. (2019). The N-terminal sequence of murine PRMT5 variant 2 is required for Hsp70 interaction and CHIP ligase-mediated degradation. *Bioch and Bioph Res Com*. 514(2019). 1185-1191.

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

Marion S., Laurent C., Guillén N. (2005). Signalization and cytoskeleton activity through myosin IB during the early steps of phagocytosis in *Entamoeba histolytica*: a proteomic approach. *Cellular Microbiology*. 7(10):1504-1518.

Martínez-Palomo A., González-Robles A., Chávez B., Orozco E., Fernández-Castelo S., Cervantes A. (1985). Structural bases of the cytolytic mechanisms of *Entamoeba histolytica*. *J Protozool.* 32(1). 166-75.

Medina Gómez C. (2015). Caracterización de las proteínas metiltransferasas de arginina PRMT5 y PRMTA de *Entamoeba histolytica*. Tesis de maestría. Departamento de Infectómica y Patogénesis Molecular, CINVESTAV.

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

Morales Y., Cáceres T., May K., Hevel J. (2016). Biochemistry and regulation of the protein arginina methyltransferases (PRMTs). *Archives of Biochemistry and Biophysics.* 590:138-152.

Nakai, K., Xia, W., Liao, H.W., Saito, M., Hung, M.C. and Yamaguchi, H. (2018). The role of PRMT1 in EGFR methylation and signaling in MDA-MB-468 triple-negative breast cancer cells. *Breast Cancer.* 25. 74-80.

Ocádiz- R. Ruiz, Fonseca W., Linford A. S., Yoshino T. P., Orozco E. and Rodríguez M. A. (2016). The knockdown of each component of the cysteine proteinase-adhesin complex of *Entamoeba histolytica* (EhCPADH) affects the expression of the other complex element as well as the in vitro and in vivo virulence. *Parasitology.* 143(1). 50-9.

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

Ocádiz-Ruiz R., Fonseca W., Martínez M. B., Ocádiz-Quintanar R., Orozco E. and Rodríguez M. A. (2013). Effect of the silencing of the Ehcp112 gene on the in vitro virulence of *Entamoeba histolytica*. *Parasites & Vectors.* 6:248. 1-9.

Oh, T.G., Bailey, P., Dray, E., Smith, A.G., Goode, J., Eriksson, N., et al. (2014). PRMT2 and RORgamma expression are associated with breast cancer survival outcomes. *Molecular Endocrinology*. 28. 1166-1185.

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

Orozco E., Martínez-Palomo A., Sánchez T. (1983). *Entamoeba histolytica*. Phagocytosis as a virulence factor. *J Exp Med*. 158(5). 1511-21.

Ortíz-Hernández R., Munguía-Robledo S., Bolaños-Rebolledo j., Medina-Gómez C. and Rodríguez-Rodríguez M. A. (2020). Identification and expression of Protein Arginine Methyltransferases during the encystation of *Entamoeba invadens*. *Microbial Pathogenesis*. (En revisión).

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

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

Pérez-Sala D. (2012). Modificaciones postraduccionales de proteínas: mecanismos clave en el control de su actividad. Centro de Investigaciones Biológicas, CSIC.

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

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

Que X., Brinen L. S., Perkins P., Herdman S., Hirataa K., Torian B. E. (2000). Cysteine proteinases from distinct cellular compartments are recruited to phagocytic vesicles by *Entamoeba histolytica*. *Mol Biochem Parasitol.* 119:23-32.

Ralston Katherine S., Petri William A. (2011). Tissue destruction and invasion by *Entamoeba histolytica*. *Trends Parasitol.* 27(6). 254-63.

Raposo A. E., Piller S. C. (2018). Protein arginine methylation: an emerging regulator of the cell cycle. *Cell Division.* 13(3).

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

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

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

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

Szewczyk M., Ishikawa Y., Organ S., Sakai N., Li F., Halabelian L., Ackloo S., Couzens A. L., Eram M., Dilworth D., Fukushi H., Harding R., de la Seña C. C., Sugo T., Hayashi K., McLeod D., Zepeda C., Aman A., Sánchez-Ozuna M., Bonneil E., Takagi S., Al-Awar R., Tyers M., Richard S., Takizawa M., Gingras A., Arrowsmith C. H., Vedadi M., Brown P. J., Nara H. and Barsyte-Lovejoy D. (2020). Pharmacological inhibition of PRMT7 links arginine monomethylation to the cellular stress response. *Nature.* 11. 2396.

Shailesh, H., Zakaria, Z.Z., Baiocchi, R. and Sif, S. (2018). Protein arginine methyltransferase 5 (PRMT5) dysregulation in cancer. *Oncotarget.* 9. 36705-36718.

Stanley Samuel L., Reed. Sharon L. (2001). Microbes and microbial toxins: paradigms of microbial-mucosal interactions, VI. *Entamoeba histolytica*: parasite-host interactions. *Am J Gastrointest Liver Physiol.* 288. 1049-1054.

Stopa N., Krebs J. E., Shechter D. (2015). The PRMT5 arginine methyltransferase: many roles in development, cancer and beyond. *Cell Mol Life Sci.* 72(11). 2041-2059.

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

Talamás-Lara D., Chávez-Munguía B., González-Robles A., Talamás-Rohana P., Salazar-Villatoro L., Durán-Díaz Á., Martínez-Palomo. (2014). Erythrophagocytosis in *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar*. A comparative study. *Biomed Research International.* 2014:1-10.

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

Tewary S. K., Zheng Y. G., Ho M. C. (2019). Protein arginine methyltransferases: insights into the enzyme structure and mechanism at the atomic level. *Cellular and Molecular Life Sciences.* 76(15). 2917-2932.

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

Tsai W. C., Gayatri S., Reineke L. C., Sbardella G., Bedford M. T. and Lloyd R. E. (2016). Arginine demethylation of G3BP1 promotes stress granule assembly. *Journal of Biological Chemistry.* 291(43). 22671-22685.

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

Walters R. W. Muhlrad D., Garcia J. and Parker R. (2015). Differential effects of Ydj1 and Sis1 on Hsp70-mediated clearance of stress granules in *Saccharomyces cerevisiae*. *RNA Journal*. 21. 1600-1671.

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

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

Wang Yi Chun, Li Chuan. (2012). Evolutionarily conserved protein arginine methyltransferases in non-mammalian animal systems. *The FEBS Journal*. 279. 932-945.

Wang, C., and Lazarides, E. (1984). Arsenite-induced changes in methylation of the 70,000 dalton heat shock proteins in chicken embryo fibroblast. *Biochem Biophys Res Commun*. 119. 735-743.

Wang, C., Jiang, H., Jin, J., Xie, Y., Chen, Z., Zhang, H., et al. (2017). Development of Potent Type I Protein Arginine Methyltransferase (PRMT) Inhibitors of Leukemia Cell Proliferation. *J Med Chem*. 60. 8888-8905.

Wang, C., Lin. J.M., and Lazarides, E. (1992). Methylations of 70,000-Da heat shock proteins in 3T3 cells: Alterations by arsenite treatment, by different stages of growth and by virus transformation. *Arch Biochem Biophys*. 297. 169-175.

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

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

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

Yakubu R. R., Silmon de Monerri N. C., Nieves E., Kim K. and Weiss L. M. (2017). Comparative monomethylarginine proteomics suggests that protein arginine methyltransferase 1 (PRMT1) is a significant contributor to arginine monomethylation in *Toxoplasma gondii*. *Molecular and Cellular Proteomics*. 16(4):567-580.

Yang, Y. and Bedford, M.T. (2013). Protein arginine methyltransferases and cancer. *Nature reviews. Cancer*. 13, 37-50.

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

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

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

Zhang, B., Zhang, S., Zhu, L., Chen, X., Zhao, Y., Chao, L., et al. (2017). Arginine methyltransferase inhibitor 1 inhibits gastric cancer by downregulating eIF4E and targeting PRMT5. *Toxicol Appl Pharmacol*. 336. 1-7.

Zhong J., Cao R. X., Liu J. H., Liu Y. B., Wang J., Liu L. P., Chen Y. J., Zhang Q. H., Wu Y., Ding W. J., Hong T., Xiao X. H., Zu X. Y. and Wen G. B. (2014). Nuclear loss of protein arginine N-methyltransferase 2 in breast carcinoma is associated with tumor grade and overexpression of cyclin D1 protein. *Oncogene*. 33. 5546-5558.

Zhong, J., Chen, Y.J., Chen, L., Shen, Y.Y., Zhang, Q.H., Yang, J., et al. (2017). PRMT2beta, a C-terminal splice variant of PRMT2, inhibits the growth of breast cancer cells. *Oncol Rep*. 38. 1303-1311.

## 12. APÉNDICE

The atypical protein arginine methyltransferase of *Entamoeba histolytica* (EhPRMTA) is involved in cell proliferation, heat shock response and *in vitro* virulence

Running title: Functional characterization of EhPRMTA

Christian Medina-Gómez, Jeni Bolaños, Jessica Borbolla-Vázquez<sup>a</sup>, Susana Munguía-Robledo, Esther Orozco, and Mario A. Rodríguez\*.

<sup>1</sup>Departamento de Infectómica y Patogénesis Molecular. CINVESTAV-IPN. Ciudad de México. México.

<sup>a</sup>Present address: Departamento de Ingeniería en Biotecnología, Universidad Politécnica de Quintana Roo, Cancún, Quintana Roo, México.

\*Correspondence: Dr. Mario A. Rodríguez. Departamento de Infectómica y Patogénesis Molecular. CINVESTAV-IPN. AP. 14-740, Ciudad de México. México. TEL.:(52)(55) 5747-3800 Ext. 5653. Fax: (52)(55)5747-3800 Ext. 5672. E-mail: [marodri@cinvestav.mx](mailto:marodri@cinvestav.mx)



## **ABSTRACT**

Protein arginine methylation regulates several cellular events, including epigenetics, splicing, translation, and stress response, among others. This posttranslational modification is catalyzed by protein arginine methyltransferases (PRMTs), which according to their products are classified from type I to type IV. The type I produces monomethyl arginine and asymmetric dimethyl arginine; in mammalian there are six families of this PRMT type (PRMT1, 2, 3, 4, 6, and 8). The protozoa parasite *Entamoeba histolytica* has four PRMTs related to type I; three of them are similar to PRMT1, but the other one does not show significant homology to be grouped in any known PRMT family, thus we called it as atypical PRMT (EhPRMTA). Here, we showed that EhPRMTA does not contain several of the canonical amino acid residues of type I PRMTs, confirming that it is an atypical PRMT. A specific antibody against EhPRMTA localized this protein in cytoplasm. The recombinant EhPRMTA displayed catalytic activity on commercial histones and the native enzyme modified its expression level during heat shock and erythrophagocytosis. Besides, the knockdown of EhPRMTA produced an increment in cell growth, and phagocytosis, but decreases cell migration and the survival of trophozoites submitted to heat shock, suggesting that this protein is involved in regulate negatively or positively these events, respectively. Thus, results suggest that this methyltransferase regulates some cellular functions related to virulence and cell surviving.

**Key words:** *Entamoeba histolytica*, arginine methylation, PRMTs, heat shock response, *in vitro* virulence.

## 1. INTRODUCTION

Protein arginine methylation is a posttranslational modification that regulates several cellular events such as epigenetics, splicing, DNA damage, mRNA translation, and stress response, among others (Blanc and Richerd, 2017). The addition of methyl groups to the guanidino nitrogen atoms of arginine residues is catalyzed by enzymes called protein arginine methyltransferases (PRMTs). According with their activity, there are four types of PRMTs: type I adds one and two methyl moieties to one of the  $\omega$ -guanidino groups of arginine, leading to monomethyl arginine (MMA) and asymmetric dimethyl arginine (ADMA); type II also produces MMA, but attaches a second methyl moiety to the other  $\omega$ -guanidino group of arginine, creating the symmetric dimethyl arginine (SDMA); type III catalyzes only the formation of MMA in the  $\omega$ -guanidino atom; and type IV, reported only in yeast, monomethylates the  $\delta$ -guanidino of arginine (Bedford and Clarke, 2009).

Nine PRMTs have been characterized in mammals (PRMT1 to PRMT9), PRMT1, 2, 3, 4 (also known as CARM1), 6 and 8 are type I enzymes; PRMT5 and 9 are type II, and PRMT7 is type III (Cook *et al.*, 2006, Pahlich *et al.*, 2006, Wang *et al.*, 2012). PRMTs have been also identified in non-mammalian animals, yeasts, plants and parasite protozoa (Fisk and Read, 2011, Ahmad and Cao, 2012, Calixto-Galvez *et al.*, 2012, Wang *et al.*, 2012, Borbolla-Vazquez *et al.*, 2015). PRMT1, 3 and 5 have been found to be conserved during the evolution of eukaryotes, whereas other PRMTs, such as PRMT2 and PRMT8, are less conserved and it has been suggested that they might have evolved in the multicellular organisms as a requirement for tissue-specific functions (Bachand, 2007). Interestingly, no canonical PRMTs have been found in *Giardia intestinalis* (Fisk and Read, 2011), making this microorganism as the only known eukaryote lacking PRMTs. Other

protozoan parasites contain at least one PRMT with homology to PRMT1 and one with homology to PRMT5 (Fisk and Read, 2011). Outside this generalization, there are vast differences in the number and potential types of PRMTs in each parasitic group (Bachand, 2007, Fisk and Read, 2011, Calixto-Galvez *et al.*, 2012).

*Entamoeba histolytica* is the protozoa parasite that infects up to 50 million people worldwide each year, causing 40,000 to 100,000 deaths annually (Ximenez *et al.*, 2009). This parasite has five PRMTs (EhPRMTs) (Fisk and Read, 2011, Calixto-Galvez *et al.*, 2012, Borbolla-Vazquez *et al.*, 2015). Initially, four of these proteins were classified as PRMT1 (Fisk and Read, 2011). However, our phylogenetic analysis suggested that one of them does not show significant homology to establish its classification in any PRMT family, therefore we named it as PRMTA (atypical PRMT) (Borbolla-Vazquez *et al.*, 2015).

An antibody against the human PRMT1 detected the orthologue proteins of *E. histolytica* (EhPRMT1a-EhPRMT1c) in nucleus and cytoplasm of trophozoites, and the recombinant protein of one of them (EhPRMT1a), like mammalian PRMT1, displayed methyltransferase activity on arginine 3 of histone H4 (H4R3) on a pool of commercial histones (Borbolla-Vazquez *et al.*, 2015). Thus, this parasite contains at least one protein with structural and functional homology to PRMT1. However, the other EhPRMTs have not been characterized yet.

Here, we showed that although EhPRMTA exhibited a higher homology to PRMT1, it does not contain most of the canonical residues of type I enzymes. The recombinant protein of EhPRMTA displayed methyltransferase activity on commercial histones and a specific antibody against this enzyme demonstrated that it is mainly localized in cytoplasm. The expression level of EhPRMTA changed during heat shock and erythrophagocytosis. In

addition, the knockdown of the EhPRMTA led to an increase of cell proliferation and erythrophagocytosis, but also a diminishing of cell migration and in the survival of trophozoites submitted to heat shock.

## 2. MATERIALS AND METHODS

### 2.1 *Entamoeba histolytica* cultures

Trophozoites of the HM1:IMSS strain were axenically cultured in TYI-S-33 medium and harvested during the logarithmic growth phase as previously described (Diamond et al. 1978). Trophozoites transfected with the pSA8 vector (Ankri *et al.*, 1998) without insert or containing the *Ehprmta* gene in antisense were maintained in TYI-S-33 medium supplemented with 40 µg/ml of G418.

### 2.2 *In silico* characterization of EhPRMTA

The amino acid sequence of EhPRMTA (accession number EHI\_159180) was *in silico* characterized using the software deposited in AmoebaDB (<http://amoebadb.org>), the ExPASy Bioinformatics Resource Portal (<http://expasy.org>) and the NCBI Home Page (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). It also was compared by ClustalW with sequences of several PRMTs of type I.

### 2.3 Methyltransferase activity

The recombinant EhPRMTA containing the GST-tag (EhPRMTA/GST) (Cazares-Apatiga *et al.*, 2017) was IPTG-induced in *Escherichia coli*, BL21(DE3) strain, and purified from bacteria lysates by affinity chromatography using immobilized glutathione (Amersham Biosciences). Then, the recombinant protein (1 µg) was incubated for 45 min at 30 °C with

4 µg of a histone pool from calf thymus (Roche) and 1 µCi of [<sup>3</sup>H]AdoMet (PerkinElmer Life Sciences), used as methyl donor, in HMT buffer (50 mM Tris–HCl pH8.0, 5% glycerol, 0.1 mM EDTA, 50 mM KCl, 1 mM DTT, 10 mM sodium butyrate) in a reaction volume of 10 µl. Control reactions containing a non-related enzyme served as background control for [<sup>3</sup>H] incorporation. Reaction was spotted onto P81 filter circles (Whatman) and allowed to air dry. Filters were washed three times with trichloroacetic acid for 15 min, rinsed in ethanol and allowed to air dry. Finally, radioactivity in filters was counted in 4 ml of scintillation fluid (Ready Safe, Beckman Coulter) in a scintillation counter (Beckman LS 6500). These assays were performed in three independent experiments by duplicate.

## **2.4 Western blot assays**

The recombinant proteins of EhPRMTA (Cazares-Apatiga *et al.*, 2017), EhPRMT1a (Borbolla-Vazquez *et al.*, 2015) and EhPRMT5 (unpublished results) as well as total extracts of *E. histolytica* trophozoites, obtained in the presence of protease inhibitors (Complete Mini, Roche-Mannheim), were separated by 10% SDS-PAGE, transferred to nitrocellulose membranes and incubated overnight at 4°C with the α-EhPRMTA antibody (Cazares-Apatiga *et al.*, 2017) (dilution 1: 2000). Afterwards, filters were incubated with a peroxidase-coupled secondary antibody (1: 10,000) (ZYMED). Finally, the antibody recognition was developed by chemiluminescence (ECL Plus GE-Healthcare). In some experiments, to eliminate possible dimers of EhPRMTA, the total extracts of *E. histolytica* were suspended in sample Laemmli buffer containing urea 6 M and separated by SDS-PAGE containing urea 8 M before to perform the western blot assays.

To evaluate the expression level of EhPRMTA under heat shock, trophozoites were incubated at 42 °C for 15, 30 and 60 min. The EhPRMTA expression was also investigated during phagocytosis by incubation of trophozoites with fresh human red blood cells (RBCs) (ratio 1:25) for 5, 10 and 15 min at 37 °C. After that, the non- ingested trophozoites were hypotonically lysed; then, total extracts of trophozoites were obtained and submitted to western blot using the anti-EhPRMTA antibody. As an internal control of loading, membranes were exposed to an  $\alpha$ -actin antibody (1: 20,000). For semi-quantitative comparisons, the bands recognized by the antibodies were analyzed by scanning densitometry and the data of EhPRMTA were normalized to the actin content. The relative expression of EhPRMTA in trophozoites under basal conditions (time 0) was arbitrary taken as 1.

## **2.5 Immunofluorescence and confocal microscopy**

Trophozoites grown on coverslides were fixed and permeabilized with cold methanol for 10 min. Non-specific binding sites were blocked with 10% FBS in PBS, and trophozoites were incubated overnight at 4 °C with the  $\alpha$ -EhPRMTA antibody (dilution 1:100). Afterwards, samples were incubated with an Alexa 488-conjugated secondary antibody (Zymed) (1:400) and the nuclei were counterstained with 4',6-diamidino-2-Phenylindole (DAPI). Finally, samples were observed through a confocal microscope (Carl Zeiss LSM 700). To analyze the subcellular localization of EhPRMTA during heat shock and phagocytosis, trophozoites grown on coverslides were submitted to the different stimuli before to perform the immunofluorescence assays.

## **2.6 Knockdown of EhPRMTA**

The full-length *Ehprmta* gene was amplified by PCR using specific oligonucleotide primers (5'- GCGGCCGCATGAAAGAAAT-3'; 5'- AGATCTTTAAAATTCAT-3', where the underlined sequences correspond to the *NotI* and *BglII* recognition sites) and the *Ehprmta/GST* construct (Cazares-Apatiga *et al.*, 2017) as template. PCR reaction was performed in a 50 µl volume reaction containing 1µM of each primer, dNTPs 0.2 mM, MgCl<sub>2</sub> 1 mM, and 1 U of Taq polymerase (Invitrogen). Amplification cycles comprised: (i) 3 min of denaturing step at 94 °C; (ii) 35 cycles of 1 min of denaturing step at 94 °C, 1.5 min of annealing step at 55 °C; and 3 min of elongation step at 72 °C; and (iii) 10 min of elongation step at 72 °C. The amplified product was analyzed by electrophoresis in 1% agarose gels. Next, the amplicon was digested with *NotI* and *BglII* and inserted (in antisense) into the corresponding sites of the pSA8 vector (Ankri *et al.*, 1998). Transfection of trophozoites was performed as described (Valle-Solis *et al.* 2018) and transfectants were selected with 10 µg/ml of G418. For a higher knockdown, trophozoites were maintained in medium supplemented with 40 µg/ml of G418.

The knockdown of EhPRMTA was analyzed by western blot as described. The relative expression of EhPRMTA in trophozoites transfected with the empty vector (MOCK) was arbitrary taken as 1.

## **2.7 Erythrophagocytosis**

Trophozoites were incubated with human RBCs (1:100 ratio) in serum-free medium at 37 °C for different times and non-ingested erythrocytes were lysed with distilled water. Samples were exhaustively washed with PBS and trophozoites with internalized RBCs were lysed with 1 ml of concentrated formic acid (J.T. Baker). Phagocytosis was

determined by measuring the hemoglobin released by the ingested RBCs (absorbance at 405 nm using a Beckman Coulter DU800 spectrophotometer).

## **2.8 Migration assays**

Trophozoites were incubated during 3 h in TYI medium without serum. Then, cell viability was analyzed by trypan blue-exclusion and  $7.5 \times 10^4$  viable parasites, maintained in the serum-free medium, were placed in the upper chamber of transwell inserts (5  $\mu$ m pore size, 24 well, Costar) and TYI medium containing 10% of bovine adult serum was added to the lower chamber. Then, samples were incubated for 3 h at 37 °C and migration was determined by counting the number of trophozoites at the lower chamber of the well.

## **2.9 Statistical analysis**

Values of all assays were expressed as the mean  $\pm$  standard error of three independent experiments by duplicate. Statistical analyzes were carried out using the GraphPad Prism V5.01 software by two-way ANOVA and Student's t-test.

# **3. RESULTS**

## **3.1 Sequence analysis and enzymatic activity of EhPRMTA**

PRMTs contain a preserved catalytic core region of approximately 310 amino acids that includes three conserved motifs and two loops (Fuhrmann *et al.*, 2015). The comparison of the amino acid sequence of EhPRMTA (367 amino acids) with human PRMT1 and CARM1 (PRMT4) showed that this *E. histolytica* protein contains all these motives and loops (Supplementary Fig. 1A), supporting the idea that it belongs to the protein arginine methyltransferases family.

Previous studies have been suggested that some specific residues are implicated in the structure and/or activity of the different PRMT types (Feng *et al.*, 2009, Sun *et al.*, 2011,



Fuhrmann *et al.*, 2015, Jain *et al.*, 2016). For example, the N-terminal region of type I enzymes contains a strictly conserved methionine residue (M66 in PRMT1), which is implicated in the asymmetric dimethylation, whereas a phenylalanine residue is in the corresponding site (F327) of PRMT5 (type II), which leads to symmetric dimethylation (Sun *et al.*, 2011). The alignment of EhPRMTA with type I PRMTs showed that the *E. histolytica* protein has a leucine residue (L76) instead of the conserved methionine at the corresponding position (Fig. 1A).

On the other hand, the serine 217 of CARM1 forms a hydrogen bond with the tyrosine 154, but the phosphorylation of S217 disrupts this bond, abolishing the AdoMet binding and therefore, the methyltransferase activity (Feng *et al.*, 2009). Both residues are strictly conserved in type I PRMTs (S120 and Y57 in PRMT1), but they are absent in type II enzymes, suggesting that these residues play a role in the maintaining of the structure of the holoenzymes in type I PRMTs (Feng *et al.*, 2009). The alignment of the amino acid sequence of EhPRMTA with type I PRMTs showed that the *E. histolytica* protein has tryptophan and arginine residues in the corresponding regions (W67 and R130) (Fig. 1A), suggesting that in EhPRMTA the AdoMet binding is not regulated by serine phosphorylation, which is the case for canonical type I PRMTs. In addition, the tyrosine-histidine-tryptophan sequence into the THW loop is also strictly conserved in type I enzymes (residues 310 to 312 in PRMT1). EhPRMTA contains a valine residue (position 310) rather than the conserved histidine of type I PRMTs (Fig. 1A). Moreover, the conserved glutamate residue at the end of the double E loop in most PRMTs (E162 in PRMT1) is replaced by an aspartate residue in EhPRMTA (D177) (Fig. 1 A).

To analyze whether despite the amino acid changes into regions related to the enzymatic activity, EhPRMTA performs the transfer of methyl groups to target proteins, we incubated

the purified recombinant enzyme with commercial histones in the presence of [<sup>3</sup>H]AdoMet. These assays demonstrated that EhPRMTA performs methyltransferase activity, but this activity was not displayed by a non-related enzyme (Fig. 1B). These results showed that although this *E. histolytica* protein contains distinct amino acid residues to those conserved in type I PRMTs, it is an active enzyme.

### **3.2 Subcellular localization of EhPRMTA**

To determine the subcellular localization of EhPRMTA in the trophozoites we carried out immunofluorescence assays using an antibody against the recombinant protein (Cazares-Apatiga *et al.*, 2017). First, to analyze the specificity of the antibody we performed western blot assays on recombinant proteins of EhPRMTA (68 kDa), EhPRMT1a (63 kDa) and EhPRMT5 (94 kDa). Results showed that the anti-EhPRMTA antibody recognized the recombinant EhPRMTA, but it did not detect the other recombinant EhPRMTs (Fig. 2A). In western blot assays on total extracts of trophozoites the antibody detected a single band of approximately 85 kDa, whereas the pre-immune serum did not recognize any band (Fig. 2B). The expected molecular weight for EhPRMTA is 43 kDa; however, it has been reported that PRMTs form homo-oligomers to achieve its catalytic activity (Li *et al.*, 2015, Toma-Fukai *et al.*, 2016); thus, we suggested that the 85 kDa band could correspond to a dimer of EhPRMTA. To corroborate this assumption we performed western blot assays on SDS-PAGE containing urea 8 M. Under these conditions the antibody recognized a band with the expected molecular weight of 43 kDa (Fig. 2B), supporting the hypothesis that the 85 kDa band detected in SDS-PAGE without urea is a dimer of EhPRMTA.

Immunofluorescence and confocal microscopy analysis using the anti-EhPRMTA antibody detected the protein in small dots mainly in the cytoplasm and around of the nucleus, whereas no fluorescent signal was detected in assays using the pre-immune serum (Fig.

2C). This results and the EhPRMTA activity on histones suggested that EhPRMTA could methylate both, cytoplasmic and nuclear proteins.

### **3.3 Putative interactome of EhPRMTA**

To search possible client proteins of EhPRMTA we examined its putative network of interrelating proteins in the STRING analysis available in AmoebaDB, which suggest that this enzyme interacts with several putative proteins, including: i) proteins involved in ribosome biogenesis like fibrillarin (EHI\_118840), the S2 ribosomal protein (EHI\_020280), and a protein involved in the ribosomal large subunit assembly (EHI\_098810); ii) RNA methyltransferases (EHI\_013870 and EHI\_047740); iii) a SnoRNA binding protein (EHI\_183900); iv) a protein with zinc finger domains (EHI\_176800); v) a peptidase (EHI\_175020); and vi) the proliferating-cell nucleolar antigen p120. Therefore, this analysis suggested that EhPRMTA could regulate several molecular events like ribosome biogenesis, RNA stability and splicing, transcription, protein degradation, and replication.

### **3.4 Expression level and subcellular localization of EhPRMTA under heat shock**

Stress response is one of the cellular events controlled by protein arginine methylation (Fuhrmann *et al.*, 2015). In protozoa parasites the activities of some PRMTs have also been implicated in regulate the stress response (Ferreira *et al.*, 2014, Kafkova *et al.*, 2018). To initiate the study about the role of EhPRMTA in the biology of *E. histolytica*, we analyzed the expression and subcellular localization of this PRMT in trophozoites exposed to heat shock. The expression level of EhPRMTA in trophozoites submitted to heat shock during 15 and 30 min was similar to that of parasites grown at 37 °C (time 0), but after 60 min at 42 °C its expression increased about 2.5-fold (Fig. 3). Immunofluorescence assays showed that this protein had a similar localization than in trophozoites grown at 37 °C (Fig. 4A), but its expression increase was also detected at 60 min of heat shock (Fig. 4B). These

results suggest that EhPRMTA could methylates cytoplasmic proteins that may be involved in regulate the heat shock response.

### **3.4 Expression and localization of EhPRMTA during phagocytosis.**

It has been reported that PRMTs of other parasites also participate in their pathogenic mechanisms (Ferreira *et al.*, 2014, Li *et al.*, 2017, Bauer *et al.*, 2019). To examine whether EhPRMTA could be involved in the virulence of *E. histolytica* we evaluated its expression level and localization during phagocytosis, a virulence-related event (Orozco *et al.*, 1983). In trophozoites incubated with human red blood cells (RBCs) during 5, 10 and 15 min the amount of EhPRMTA increased up to 3-fold in comparison with trophozoites without RBCs (time 0) (Fig. 5). By immunofluorescence the enzyme did not show association with ingested erythrocytes (Fig. 6, arrows and circles), but it displayed a higher localization towards the cell periphery during all times of phagocytosis (Fig. 6). Thus, the increase in protein amount as well as its mobilization to the cell periphery during phagocytosis suggest that arginine methylation performed by EhPRMTA could also have a role in the control this process.

### **3.5 Effect of EhPRMTA knockdown on cellular proliferation**

To confirm that EhPRMTA has a role in the biology of *E. histolytica* we carried out its knockdown by the transfection of trophozoites with the pSA8 vector expressing the *Ehprmta* gene in antisense. The transfectants (EhPRMTA<sup>[AS]</sup>) expressed approximately 50% of the EhPRMTA protein compared with trophozoites transfected with the empty vector (MOCK) (Fig. 7A). Interestingly, the EhPRMTA<sup>[AS]</sup> population showed a faster cell growth than MOCK cells (Fig. 7B), suggesting that EhPRMTA negatively regulates the proliferation of trophozoites.

### **3.6 Effect of EhPRMTA knockdown on trophozoites submitted to heat shock**

To confirm that EhPRMTA participates in the heat shock response, the EhPRMTA<sup>[AS]</sup> trophozoites were incubated at 42 °C and their viability was analyzed at different times. In these assays we observed that the cell survival of EhPRMTA<sup>[AS]</sup> at 15 and 30 min of heat shock was lower than MOCK trophozoites, although after 60 min the viability of both populations was similar (Fig. 8A). These results support the hypothesis that EhPRMTA could participate in the response to heat shock, at least temporarily.

### **3.7 Effect of the EhPRMTA on the *in vitro* virulence**

Next, to confirm that EhPRMTA has a role in the pathogenic mechanisms of *E. histolytica*, we evaluated the effect of its knockdown on erythrophagocytosis. Results showed that the EhPRMTA<sup>[AS]</sup> population displayed higher rates of phagocytosis than MOCK trophozoites (Fig. 8B). However, the EhPRMTA<sup>[AS]</sup> cells showed a diminishing of about 33% in cell migration respect to MOCK parasites (Fig. 8C). These results suggest that distinct virulence mechanisms of this parasite may be negatively or positively regulated by arginine methylation mediated by EhPRMTA.

## **4. DISCUSSION**

Arginine methylation in the N-terminus of histones is involved in epigenetics (Blanc and Richard, 2017). In addition, this posttranslational modification also plays important roles in other biological processes, among them, mRNA stability and splicing and protein translation (Blanc and Richard, 2017). Due to the presence of five PRMTs in *E. histolytica* (Fisk and Read, 2011; Borbolla-Vazquez et al., 2015), is expected that arginine methylation also participates in molecular events that may regulate the survival, development and pathogenicity of this microorganism.

This posttranslational modification is carried out by different PRMTs that can produce MMA, ADMA or SDMA. The diverse methyl marks are recognized by different “reader” proteins guiding to distinct downstream outcomes. For example, asymmetric dimethylation of H4R3 leads to gene activation, whereas its symmetric dimethylation directs to gene repression (Fuhrmann et al., 2015). Although the amino acid sequences of *E. histolytica* histones diverge from typical histones, they contain several arginine residues that may be modified by methylation. Indeed, it has been demonstrated the presence mono- and di-methylated H4R3 in this parasite (Borbolla-Vazquez et al., 2015; Lozano-Amado et al., 2016). However, the function of arginine methylation in histones and non-histones has not been documented in *Entamoeba* sp.

An initial study showed that the amino acid sequence of EhPRMTA is more related to PRMT1 than to other PRMT members (Fisk and Read, 2011); however, our phylogenetic analysis showed that, although it is into the type I PRMTs, this enzyme does not belong to any known PRMT clade (Borbolla-Vazquez *et al.*, 2015). In addition, EhPRMTA does not contain the distinguished features of other type I enzymes such as the Src homology 3 (SH3) domain of PRMT2, the Zinc finger domain of PRMT3 or the N-terminal myristoylation signal of PRMT8. Moreover, in this study we showed that the EhPRMTA protein neither possesses some of the canonical residues of type I enzymes, as those involved in the maintaining of the holoenzyme structure (Fig. 1A), suggesting that in EhPRMTA the AdoMet binding is not regulated by serine phosphorylation. Moreover, the invariant histidine of the THW loop in type I PRMTs is changed in this *E. histolytica* enzyme by a valine residue (Fig. 1A). In PRMT5 and PRMT9 (type II enzymes) the bulky histidine is replaced by serine and cysteine, respectively, and it has been suggested that the smaller side chains of these residues could allow the proper accommodation of a

symmetrically dimethylated guanidinium group in the active site pocket (Fuhrmann *et al.*, 2015). Concordantly, the change of cysteine for histidine in the THW loop of PRMT9 (C431H) modifies the product from SDMA to MMA (Jain *et al.*, 2016). The effect on the methylated product related to the substitution of the conserved histidine by valine in the THW loop of EhPRMTA remains to be investigated.

On the other hand, mutagenesis studies on the PRMT7 of *Trypanosoma brucei* showed that the change of the second glutamate residue in the double E loop by aspartate (E181D) does not change the binding affinity of the enzyme by unmethylated arginine, but increases the binding affinity by MMA, suggesting that this change could stabilize the MMA substrate-enzyme interaction facilitating dimethylation (Debler *et al.*, 2016). Interestingly, at the end of the double E loop of EhPRMTA is an aspartate residue (D177) (Fig. 1A), suggesting that it could also increase the affinity of this enzyme by MMA and therefore, promoting the dimethylation. Thus, the valine residue into the THW loop and the aspartate residue at the end of the double E loop in EhPRMTA could provide some specific properties for its enzymatic activity.

Like other PRMTs, EhPRMTA may control transcription by its ability to methylate histones (Fig. 1B); however until now we do not know the epigenetic mark catalyzed by this enzyme. Additionally, it could also regulate transcription by its possible interaction with a putative protein containing zinc finger domains. Although we did not observe an evident localization of EhPRMTA in nucleus, it could be possibly that a low amount of this enzyme may be required to perform the transcription regulation. Moreover, it is possibly that it accumulates in nucleus and may control transcription under conditions not analyzed in this study.

The supposed interactome of EhPRMTA also suggest that this methyl transferase could regulate the activity of a dimethyladenosine transferase and a RNA methyl transferase, which may play crucial roles in RNA fate and metabolism (Fu et al., 2014). On the other hand, due to its possible interaction with fibrillarin, the ribosomal protein S2 and a protein involved in the ribosomal large subunit assembly, EhPRMTA could control the ribosome biosynthesis as it has been demonstrated for human PRMT5 and for the yeast orthologue of PRMT3 (Bachand and Silver, 2004; Ren *et al.*, 2010). In addition, the putative interaction with a SnoRNA binding protein suggest that this methyltransferase could also regulate the RNA splicing, event in which play an important role the mammalian PRMTs (Fong et al., 2019). The probable role of EhPRMTA in all these molecular events could explain its detection in dots, which possibly correspond to the sites where these activities take place. Heat shock induces major changes in gene expression, which are regulated in part by arginine methylation. In yeast, after heat shock there is an increase of SDMA with a decrease of ADMA and  $\omega$ - and  $\delta$ -MMA (Lakowski *et al.*, 2015). In addition, in *Drosophila* there is a shift in the methylation pattern of core histones in response to heat shock, among others, the appearance of methylated arginines absent before the heat shock (Desrosiers and Tanguay, 1988). Furthermore, mono- and di-methyl arginines were found in Hsp70 proteins of chicken embryo fibroblast and 3T3 cells and their levels changed after arsenite treatment (Wang and Lazarides, 1984; Wang *et al.*, 1992). Furthermore, it has been demonstrated that mammalian cells exposed to heat shock augmented the monomethylation of HSP70 catalyzed by PRMT7, resulting in cytoprotection (Szewczyk et al., 2020). All these results indicate that arginine methylation of histones and non-histone proteins is involved in the heat shock response. Here, we showed that the EhPRMTA level



increases after 60 min of heat shock (Fig. 3). Moreover, the survival of trophozoites was lower in EhPRMTA<sup>[AS]</sup> than in MOCK at 15 and 30 min of heat shock (Fig. 8A), suggesting that this enzyme could be involved in regulate the heat shock response, possibly by the methylation of histones, producing epigenetic marks that regulate the transcription of genes participating in stress response, and/or by the methylation of proteins directly implicated in cytoprotection, such as HSP70.

On the other hand, arginine methylation controls cellular processes that affect proliferation. It has been described that the overexpression of some PRMTs, including PRMT1, is associated with higher cellular proliferation (Yang and Bedford, 2013, Shailesh *et al.*, 2018). Moreover, inhibitors of activity or the knockdown of these PRMTs arrest the cancer cells growth (Zhang *et al.*, 2015, Li *et al.*, 2016, Wang *et al.*, 2017, Zhang *et al.*, 2017, Nakai *et al.*, 2018). Similarly, several PRMTs of protozoan parasites positively regulate the cell growth, because the knockout or knockdown of their genes lead to growth defects (Subramaniam *et al.*, 2006, Fisk *et al.*, 2010, El Bissati *et al.*, 2016). On the contrary, the knockdown of EhPRMTA produced a faster proliferation of *E. histolytica* trophozoites (Fig. 7B), suggesting that this PRMT negatively regulates the cell growth. This result correlates with the function of mammalian PRMT2, which expression in breast cancer is lower than in normal breast tissue (Oh *et al.*, 2014). Besides, in breast cancer cell lines the PRMT2 overexpression suppresses cell proliferation and dowregulates the cyclin D1 and, accordingly, its depletion increased p21 and decreased cyclin D1 expression (Oh *et al.*, 2014, Zhong *et al.*, 2017). Thus, is probably that, similar to PRMT2, EhPRMTA negatively controls the expression of cyclin D and other proteins involved in cell cycle regulation. Interestingly, the interactome of EhPRMTA suggested that it could interact with the putative proliferating cell nucleolar antigen p120. We hypothesize that arginine methylation

by EhPRMTA could also downregulate the p120 activity. Additionally, as arginine methylation participates in ribosome biogenesis (Bachand and Silver, 2004; Ren et al., 2010), which in turn is involved in cell proliferation, putative methylation of fibrillarin and ribosomal proteins by EhPRMTA could influence the trophozoite growth.

On the other hand, it has been reported that certain PRMTs regulate the virulence of some protozoan parasites. For example, the lack of PRMT7 in *Leishmania major* increases the parasite infectivity, whereas its overexpression reduced the lesion progression (Ferreira *et al.*, 2014). Here, we showed that during phagocytosis EhPRMTA increased its amount and it moved towards cell periphery (Fig. 5, 6), suggesting that this enzyme could regulate some signal pathway involved in cell ingestion. However, we do not know if the localization change is caused by phagocytosis or simply by the interaction with RBCs. We suggest that cytoskeleton proteins or regulators of its structuration could be targets of EhPRMTA. In this way, it has been reported that PRMT8 is involved in the dendritic spine maturation in hippocampus, because its depletion generates an abundance of filopodia, increases cofilin phosphorylation and slows actin turnover due to the hyperactivity of Rac1 and PAK1 (Lo et al., 2020). Remarkably, the EhPRMTA knockdown increased phagocytosis of trophozoites (Fig. 8B), suggesting that this PRMT negatively regulates this virulence-related process.

Conversely, cell migration, other virulence-related property, was lower in EhPRMTA<sup>[AS]</sup> than in MOCK cells (Fig. 8C), suggesting that this event is positively regulated by EhPRMTA. Interestingly, the knockdown of PRMT2 also provokes a reduction of cell migration in breast cancer (Oh *et al.*, 2014). However, we showed that the knockdown of this enzyme decreased cell viability under heat shock and possibly other stress conditions, such as starvation, also affect viability of EhPRMTA<sup>[AS]</sup>; thus, although cell viability after 3

h of serum starvation was higher than 95%, we cannot discard that the low migration displayed by the knockdowned trophozoites may be a reflection to the stress caused by serum starvation.

Remarkably, the EhPRMTA knockdown showed opposite effects on two virulence-related effects: augmented phagocytosis, but reduced cell migration (Fig. 8B, C). However, a single PRMT could have contradictory outcomes on certain cellular events; for instance, the role of PRMT2 in cancer cells is divergent, because it regulates the co-activator function of several estrogen receptors, such as the estrogen receptor alpha ( $ER\alpha$ ), progesterone receptor (PR), androgen receptor (AR), peroxisome proliferator-activated receptor gamma ( $PPAR\gamma$ ) and the retinoic acid receptor alpha ( $RAR\alpha$ ) (Qi *et al.*, 2002). Activation of  $ER\alpha$ , PR and AR leads to tumor cell growth, while activation of  $PPAR\gamma$  and  $RAR\alpha$  directs to growth arrest and apoptosis (Baldwin *et al.*, 2014). Thus, the role of EhPRMTA in parasite virulence seems to be divergent and until now the effect of the blockage of its activity on general pathogenicity is unknown. However, our results also showed that the knockdown of this enzyme reduced the trophozoite survival under a stress condition (Fig. 7A). In addition, our recent studies on *Entamoeba invadens*, the model for differentiation in the *Entamoeba* genus, suggested that the homologue enzyme (EiPRMTA) could regulate encystation (unpublished results), an essential event for amebiasis spreading. Thus, is possible suggest that this PRMT could be a putative target for drug design against amebiasis, although more experiments are needed to confirm this hypothesis.

## 5. CONCLUSIONS

Although the amino acid sequence of EhPRMTA is more related to PRMT1, it has different residues into its functional domains with respect to typical PRMTs. This fact and its role as

regulator of cell migration and survival under heat shock as well as its possible participation in encystation, we suggest that EhPRMTA could be an attractive target for the development of new therapeutic strategies against amebiasis, although more research about the EhPRMTA function is required to sustain this possibility.

## ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT, Mexico) (Grant 237762), CMG is a recipient of a CONACyT fellowship (Grant 558449). We are also grateful to Carlos Vázquez-Calzada for his excellent technical assistance.

## CONFLICT OF INTERESTS

The authors declare that they have no conflicts of interests.

## REFERENCES

- Ahmad, A. and Cao, X. (2012). Plant PRMTs broaden the scope of arginine methylation. *J Genet Genomics* **39**, 195-208. [https:// doi.org/10.1016/j.jgg.2012.04.001](https://doi.org/10.1016/j.jgg.2012.04.001)
- Ankri, S., Stolarsky, T. and Mirelman, D. (1998). Antisense inhibition of expression of cysteine proteinases does not affect *Entamoeba histolytica* cytopathic or haemolytic activity but inhibits phagocytosis. *Mol Microbiol* **28**, 777-785. [https:// doi.org/10.1046/j.1365-2958.1998.00837.x](https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1998.00837.x)
- Bachand, F. (2007). Protein arginine methyltransferases: from unicellular eukaryotes to humans. *Eukaryot cell* **6**, 889-898. [https:// doi.org/10.1128/EC.00099-07](https://doi.org/10.1128/EC.00099-07)

Bachand, F., Silver, P.A. (2004). PRMT3 is a ribosomal protein methyltransferase that affects the cellular levels of ribosomal subunits. *EMBO J.* **23**, 2641-2650.  
<https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600265>

[Baldwin, R.M., Morettin, A., Cote, J. \(2014\).](#) Role of PRMTs in cancer: could minor isoforms be leaving a mark? *World J Biol Chem.* **5**:115-29.  
<https://doi.org/10.4331/wjbc.v5.i2.115>.

Bauer, I., Lechner, L., Pidroni, A., Petrone, A.M., Merschak, P., Lindner, H., *et al.* (2019). Type I and II PRMTs regulate catabolic as well as detoxifying processes in *Aspergillus nidulans*. *Fungal Genet Biol* **129**, 86-100 .  
<https://doi.org/10.1016/j.fgb.2019.05.006>

Bedford, M.T., Clarke, S.G. (2009). Protein arginine methylation in mammals: who, what, and why. *Mol Cell* **33**, 1-13. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2008.12.013>

Blanc, R.S. Richard, S. (2017). Arginine Methylation: The Coming of Age. *Molecular cell* **65**, 8-24. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2016.11.003>

Borbolla-Vazquez, J., Orozco, E., Betanzos, A. and Rodriguez, M.A. (2015). *Entamoeba histolytica*: protein arginine transferase 1a methylates arginine residues and potentially modify the H4 histone. *Parasit Vectors* **8**, 219.  
<https://doi.org/10.1186/s13071-015-0820-7>

Calixto-Galvez, M., Cazares-Apatiga, G.J., Borbolla-Vazquez, J., Hernandez-Alejandro, M., Pais-Morales, J., Salas-Casas, A., *et al.* (2012). Histone-modifying proteins and DNA-methyltransferases in the epigenetic regulation of protozoa parasites. *Curr Trends Microbiol* **8**, 37-49.

- Cazares-Apatiga, J., Medina-Gomez, C., Chavez-Munguia, B., Calixto-Galvez, M., Orozco, E., Vazquez-Calzada, C., *et al.* (2017). The Tudor Staphylococcal Nuclease Protein of *Entamoeba histolytica* Participates in Transcription Regulation and Stress Response. *Front Cell Infect Microbiol* **7**, 52.  
[https:// doi.org/10.3389/fcimb.2017.00052](https://doi.org/10.3389/fcimb.2017.00052)
- Cook, J.R., Lee, J.H., Yang, Z.H., Krause, C.D., Herth, N., Hoffmann, R. *et al.* (2006). FBXO11/PRMT9, a new protein arginine methyltransferase, symmetrically dimethylates arginine residues. *Biochem Biophys Res Commun* **342**, 472-481.  
[https:// doi.org/ 10.1016/j.bbrc.2006.01.167](https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2006.01.167)
- Debler, E.W., Jain, K., Warmack, R.A., Feng, Y., Clarke, S.G., Blobel, G. and Stavropoulos, P. (2016). A glutamate/aspartate switch controls product specificity in a protein arginine methyltransferase. *Proc Nat Acad Sci USA* **113**, 2068-2073.  
[https:// doi.org/10.1073/pnas.1525783113](https://doi.org/10.1073/pnas.1525783113)
- Desrosiers, R., and Tanguay, R.M. (1988) Methylation of Drosophila histones at proline, lysine and arginine residues during heat shock. *J Biol Chem* **263**, 4686-4692.
- Diamond, L.S., Harlow, D.R., and Cunnick, C.C. (1978). A new medium for axenic cultivation of *Entamoeba histolytica* and other *Entamoeba*. *Trans R Soc Trop Med Hyg* **72**, 431-432.
- El Bissati, K., Suvorova, E.S., Xiao, H., Lucas, O., Upadhyaya, R., Ma, Y., *et al.* (2016). *Toxoplasma gondii* Arginine Methyltransferase 1 (PRMT1) Is Necessary for Centrosome Dynamics during Tachyzoite Cell Division. *mBio* **7**, e02094-02015.  
[https:// doi.org/10.1128/mBio.02094-15](https://doi.org/10.1128/mBio.02094-15)

- Feng, Q., He, B., Jung, S.Y., Song, Y., Qin, J., Tsai, S.Y., *et al.* (2009). Biochemical control of CARM1 enzymatic activity by phosphorylation. *J Biol Chem* **284**, 36167-36174. [https:// doi.org/10.1074/jbc.M109.065524](https://doi.org/10.1074/jbc.M109.065524)
- Ferreira, T.R., Alves-Ferreira, E.V., Defina, T.P., Walrad, P., Papadopoulou, B. and Cruz, A.K. (2014). Altered expression of an RBP-associated arginine methyltransferase 7 in *Leishmania major* affects parasite infection. *Mol Microbiol* **94**, 1085-1102. [https:// doi.org/10.1111/mmi.12819](https://doi.org/10.1111/mmi.12819)
- Fisk, J.C. and Read, L.K. (2011). Protein arginine methylation in parasitic protozoa. *Eukaryot cell* **10**, 1013-1022. [https:// doi.org/10.1128/EC.05103-11](https://doi.org/10.1128/EC.05103-11)
- Fisk, J.C., Zurita-Lopez, C., Sayegh, J., Tomasello, D.L., Clarke, S.G. and Read, L.K. (2010). TbPRMT6 is a type I protein arginine methyltransferase that contributes to cytokinesis in *Trypanosoma brucei*. *Eukaryot cell* **9**, 866-877. [https:// doi.org/10.1128/EC.00018-10](https://doi.org/10.1128/EC.00018-10)
- Fong, J. Y., Pignata, L., Goy, P. A., Kawabata, K. C., Lee, S. C., Koh, *et al.* (2019). Therapeutic targeting of RNA splicing catalysis through inhibition of protein arginine methylation. *Cancer cell* **36**, 194–209. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2019.07.003>
- Fu, Y., Dominissini, D., Rechavi, G., He, C. (2014). Gene expression regulation mediated through reversible m<sup>6</sup>A RNA methylation. *Nat Rev Genet* **15**, 293-306. <https://doi.org/10.1038/nrg3724>
- Fuhrmann, J., Clancy, K.W. and Thompson, P.R. (2015). Chemical biology of protein arginine modifications in epigenetic regulation. *Chem Rev* **115**, 5413-5461. [https:// doi.org/10.1021/acs.chemrev.5b00003](https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.5b00003)

- Jain, K., Warmack, R.A., Debler, E.W., Hadjikyriacou, A., Stavropoulos, P. and Clarke, S.G. (2016). Protein Arginine Methyltransferase Product Specificity Is Mediated by Distinct Active-site Architectures. *J Biol Chem* **291**, 18299-18308.  
[https:// doi.org/10.1074/jbc.M116.740399](https://doi.org/10.1074/jbc.M116.740399)
- Kafkova, L., Tu, C., Pazzo, K.L., Smith, K.P., Debler, E.W., Paul, K.S., *et al.* (2018). *Trypanosoma brucei* PRMT1 Is a Nucleic Acid Binding Protein with a Role in Energy Metabolism and the Starvation Stress Response. *mBio* **9**.  
[https:// doi.org/10.1128/mBio.02430-18](https://doi.org/10.1128/mBio.02430-18)
- Lakowski, T.M., Pak, M.L., Szeitz, A., Thomas, D., Vhuiyan, M.I., Clement. B., *et al.* (2015) Arginine methylation in yeast proteins during stationary-phase growth and heat shock. *Amino Acids* **47**, 2561-2571. [https:// doi.org/10.1007/s00726-015-2047-5](https://doi.org/10.1007/s00726-015-2047-5)
- Li, H.T., Gong, T., Zhou, Z., Liu, Y.T., Cao, X., He, Y., *et al.* (2015). Yeast Hmt1 catalyses asymmetric dimethylation of histone H3 arginine 2 in vitro. *Biochem J* **467**, 507-515. [https:// doi.org/10.1042/BJ20141437](https://doi.org/10.1042/BJ20141437)
- Li, L., Zhang, Z., Ma, T. and Huo, R. (2016). PRMT1 regulates tumor growth and metastasis of human melanoma via targeting ALCAM. *Mol Med Rep* **14**, 521-528.  
[https:// doi.org/10.3892/mmr.2016.5273](https://doi.org/10.3892/mmr.2016.5273)
- Li, Y., He, Y., Li, X., Fasoyin, O.E., Hu, Y., Liu, Y., *et al.* (2017). Histone Methyltransferase aflrmtA gene is involved in the morphogenesis, mycotoxin biosynthesis, and pathogenicity of *Aspergillus flavus*. *Toxicon* **127**, 112-121.  
[https:// doi.org/10.1016/j.toxicon.2017.01.013](https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2017.01.013)



Lo, L. H-G., Dong, R., Lyu, Q. Lai, K-O. (2020). The protein arginine methyltransferase PRMT8 and substrate G3BP1 control Rac1-PAK1 signaling and actin cytoskeleton for Dendritic Spine Maturation. *Cell Rep* **31**, 107744. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2020.107744>.

Lozano-Amado, D., Herrera-Solorio, A. M., Valdés, J., Alemán-Lazarini, L., Almaraz-Barrera, M., Luna-Rivera, *et al.* (2016). Identification of repressive and active epigenetic marks and nuclear bodies in *Entamoeba histolytica*. *Parasit Vect* **9**, **19**. <https://doi.org/10.1186/s13071-016-1298-7>

Nakai, K., Xia, W., Liao, H.W., Saito, M., Hung, M.C. and Yamaguchi, H. (2018). The role of PRMT1 in EGFR methylation and signaling in MDA-MB-468 triple-negative breast cancer cells. *Breast Cancer* **25**, 74-80. <https://doi.org/10.1007/s12282-017-0790-z>

Oh, T.G., Bailey, P., Dray, E., Smith, A.G., Goode, J., Eriksson, N., *et al.* (2014). PRMT2 and RORgamma expression are associated with breast cancer survival outcomes. *Mol Endocrinol* **28**, 1166-1185. <https://doi.org/10.1210/me.2013-1403>

Orozco, E., Guarneros, G., Martinez-Palomo, A. and Sanchez, T. (1983). *Entamoeba histolytica*. Phagocytosis as a virulence factor. *J ExpMed* **158**, 1511-1521. <https://doi.org/10.1084/jem.158.5.1511>

- Pahlich, S., Zakaryan, R.P. and Gehring, H. (2006). Protein arginine methylation: Cellular functions and methods of analysis. *Biochim Biophys Acta* **1764**, 1890-1903.  
[https:// doi.org/10.1016/j.bbapap.2006.08.008](https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2006.08.008)
- Qi, C., Chang, J., Zhu, Y., Yeldandi, A.V., Rao, S.M., Zhu, Y.J. (2002). Identification of protein arginine methyltransferase 2 as a coactivator for estrogen receptor alpha. *J Biol Chem* **277**:28624–28630. [https://doi.org/ 10.1074/jbc.M201053200](https://doi.org/10.1074/jbc.M201053200)
- Ren, J., Wang, Y., Liang, Y., Zhang, Y., Bao, S., Xu, Z. (2010). Methylation of ribosomal protein S10 by protein-arginine methyltransferase 5 regulates ribosome biogenesis. *J Biol Chem* **285**, 12695-12705.  
<https://doi.org/10.1074/jbc.M110.103911>
- Shailesh, H., Zakaria, Z.Z., Baiocchi, R. and Sif, S. (2018). Protein arginine methyltransferase 5 (PRMT5) dysregulation in cancer. *Oncotarget* **9**, 36705-36718.  
[https:// doi.org/10.18632/oncotarget.26404](https://doi.org/10.18632/oncotarget.26404)
- Subramaniam, C., Veazey, P., Redmond, S., Hayes-Sinclair, J., Chambers, E., Carrington, M., *et al.* (2006). Chromosome-wide analysis of gene function by RNA interference in the african trypanosome. *Eukaryot cell* **5**, 1539-1549.  
[https:// doi.org/10.1128/EC.00141-06](https://doi.org/10.1128/EC.00141-06)
- Sun, L., Wang, M., Lv, Z., Yang, N., Liu, Y., Bao, S., *et al.* (2011). Structural insights into protein arginine symmetric dimethylation by PRMT5. *Proc Nat Acad Sci USA* **108**, 20538-20543. [https:// doi.org/10.1073/pnas.1106946108](https://doi.org/10.1073/pnas.1106946108)

- Szewczyk, M. M., Ishikawa, Y., Organ, S., Sakai, N., Li, F., Halabelian, L., *et al.* (2020). Pharmacological inhibition of PRMT7 links arginine monomethylation to the cellular stress response. *Nature Commun.* **11**, 2396. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-16271-z>
- Toma-Fukai, S., Kim, J.D., Park, K.E., Kuwabara, N., Shimizu, N., Krayukhina, E., *et al.* (2016). Novel helical assembly in arginine methyltransferase 8. *J Mol Biol* **428**, 1197-1208. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2016.02.007>
- Valle-Solis, M., Bolaños, J., Orozco, E., Huerta, M., Garcia-Rivera, G., Salas-Casas, A. *et al.* (2018). A calcium/cation exchanger participates in the programmed cell death and *in vitro* virulence of *Entamoeba histolytica*. *Front Cell Infect Microbiol* **8**, 432. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2018.00342>
- Wang, C., and Lazarides, E. (1984). Arsenite-induced changes in methylation of the 70,000 dalton heat shock proteins in chicken embryo fibroblast. *Biochem Biophys Res Commun* **119**, 735-743. [https://doi.org/10.1016/s0006-291x\(84\)80312-5](https://doi.org/10.1016/s0006-291x(84)80312-5)
- Wang, C., Lin, J.M., and Lazarides, E. (1992). Methylations of 70,000-Da heat shock proteins in 3T3 cells: Alterations by arsenite treatment, by different stages of growth and by virus transformation. *Arch Biochem Biophys* **297**, 169-175. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(92\)90656-h](https://doi.org/10.1016/0003-9861(92)90656-h)
- Wang, C., Jiang, H., Jin, J., Xie, Y., Chen, Z., Zhang, H., *et al.* (2017). Development of Potent Type I Protein Arginine Methyltransferase (PRMT) Inhibitors of Leukemia Cell Proliferation. *J Med Chem* **60**, 8888-8905. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.7b01134>

- Wang, Y.C. and Li, C. (2012). Evolutionarily conserved protein arginine methyltransferases in non-mammalian animal systems. *FEBS J* **279**, 932-945.  
[https:// doi.org/10.1111/j.1742-4658.2012.08490.x](https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2012.08490.x)
- Ximenez, C., Moran, P., Rojas, L., Valadez, A. and Gomez, A. (2009). Reassessment of the epidemiology of amebiasis: state of the art. *Infect Genet Evol* **9**, 1023-1032.  
[https:// doi.org/10.1016/j.meegid.2009.06.008](https://doi.org/10.1016/j.meegid.2009.06.008)
- Yang, Y. and Bedford, M.T. (2013). Protein arginine methyltransferases and cancer. *Nat Rev Cancer* **13**, 37-50. [https:// doi.org/10.1038/nrc3409](https://doi.org/10.1038/nrc3409)
- Zhang, B., Dong, S., Li, Z., Lu, L., Zhang, S., Chen, X., *et al.* (2015). Targeting protein arginine methyltransferase 5 inhibits human hepatocellular carcinoma growth via the downregulation of beta-catenin. *J Transl Med* **13**, 349.  
[https:// doi.org/10.1186/s12967-015-0721-8](https://doi.org/10.1186/s12967-015-0721-8)
- Zhang, B., Zhang, S., Zhu, L., Chen, X., Zhao, Y., Chao, L., *et al.* (2017). Arginine methyltransferase inhibitor 1 inhibits gastric cancer by downregulating eIF4E and targeting PRMT5. *Toxicol Appl Pharmacol* **336**, 1-7.  
[https:// doi.org/10.1016/j.taap.2017.10.002](https://doi.org/10.1016/j.taap.2017.10.002)
- Zhong, J., Chen, Y.J., Chen, L., Shen, Y.Y., Zhang, Q.H., Yang, J., *et al.* (2017). PRMT2beta, a C-terminal splice variant of PRMT2, inhibits the growth of breast cancer cells. *Oncol Rep* **38**, 1303-1311. [https:// doi.org/10.3892/or.2017.5786](https://doi.org/10.3892/or.2017.5786)

## FIGURE LEGENDS

**Figure 1. EhPRMTA: Comparison of amino acid strictly conserved in type I PRMTs and enzymatic activity.** (A) The amino acid sequences of EhPRMTA (EHI\_159180), human PRMT1 (HsPRMT1, accession number: Q99873), PRMT2 (HsPRMT2, accession number: P55345-3) and CARM1 (HsCARM1, accession number: [Q86X55](#)) were compared by Clustal W. Conserved regions in type I enzymes are shown. The amino acid numbering of each protein is showing in superscript. Arrows indicate the invariant amino acid residues in type I PRMTs that are changed in EhPRMTA and numbers correspond to positions in PRMT1. (B) The recombinant EhPRMTA or lysozyme (negative control) were incubated with commercial histones in the presence of [<sup>3</sup>H]AdoMet. Finally, radioactivity incorporated to histones was counted. Assays were performed in three independent experiments by duplicate. \*\*\*p<0.001.

**Figure 2. Immunolocalization of EhPRMTA.** (A) Recombinant proteins of EhPRMT1a, EhPRMT5 and EhPRMTA were separated by SDS-PAGE and stained with Coomassie blue (CB) or submitted to western blot using the  $\alpha$ -EhPRMTA antibody. (B) Total extracts of *E. histolytica* trophozoites were separated by SDS-PAGE in the absence (-) or in the presence (+) of urea 8M and stained with Coomassie blue (CB) or submitted to western blot using the  $\alpha$ -EhPRMTA antibody or the pre-immune serum (PI). (C) Confocal immunofluorescence assays on *E. histolytica* trophozoites using the  $\alpha$ -PRMTA antibody or the pre-immune serum (PI) and subsequently an ALEXA 488-labeled secondary antibody (green). Nuclei were stained with DAPI (blue).

**Figure 3. Expression of EhPRMTA during heat shock.** (A) Total extracts of trophozoites cultured at 37 °C (0 min) or incubated at 42 °C during 15, 30 and 60 min were submitted to western blot using the  $\alpha$ -EhPRMTA antibody. As a loading control, same membranes were probed with an  $\alpha$ -actin antibody. (B) The band detected by the  $\alpha$ -EhPRMTA antibody was analyzed by densitometry and the data were normalized to the actin content. The relative expression at time 0 was taken as 1. Data are expressed as the mean  $\pm$  standard error of three independent experiments. \* $p < 0.05$

**Figure 4. Immunolocalization of EhPRMTA during heat shock.** (A) Confocal immunofluorescence assays on *trophozoites submitted* to different times of heat shock using the  $\alpha$ -EhPRMTA antibody and subsequently an ALEXA 488-labeled secondary antibody (green). Nuclei were stained with DAPI (blue). (B) A quantitative analysis of fluorescence from individual trophozoites was performed using the Zen software; the program determined the mean fluorescence intensity and the averages of at least ten cells of three independent experiments at each time were plotted as a histogram. \*\*\* $p < 0.001$

**Figure 5. Expression of EhPRMTA during phagocytosis.** (A) Total extracts of trophozoites in the absence of RBCs (0 min) or incubated at 37 °C with human RBCs for 5, 10 and 15 min were submitted to western blot using the  $\alpha$ -EhPRMTA antibody. As a loading control, same membranes were probed with an  $\alpha$ -actin antibody. (B) The band detected by the  $\alpha$ -EhPRMTA antibody was analyzed by densitometry and the data were normalized to the actin content. The relative expression at time 0 was taken as 1. Data are

expressed as the mean  $\pm$  standard error of three independent experiments. \* $p < 0.05$ ,  
\*\*\* $p < 0.001$

**Figure 6. Immunolocalization of EhPRMTA during phagocytosis.** Confocal immunofluorescence assays on *trophozoites submitted* to different times of phagocytosis using the  $\alpha$ -EhPRMTA antibody and subsequently an ALEXA 488-labeled secondary antibody (green). Nuclei were stained with DAPI (blue). Arrows indicate certain phagocytic vacuoles containing a single erythrocyte, whereas some clusters of ingested erythrocytes are circled.

**Figure 7. EhPRMTA knockdown and its effect on cell proliferation.** The *Ehprmta* gene was cloned in antisense into the pSA8 vector and trophozoites were transfected with this construct (EhPRMTA<sup>[AS]</sup> population). Trophozoites transfected with the empty vector (MOCK) were used as a control. (A) Western blot using the  $\alpha$ -EhPRMTA antibody. As an internal control the membranes were probed with an  $\alpha$ -actin antibody. (B) The band detected by the  $\alpha$ -EhPRMTA antibody was analyzed by densitometry and the data were normalized to the actin content. The relative expression in MOCK trophozoites was taken as 1. Data are expressed as the mean  $\pm$  standard error of three independent experiments. \*\* $p < 0.005$ . (C) Cell proliferation of EhPRMTA<sup>[AS]</sup> and MOCK populations. Data are expressed as the mean  $\pm$  standard error of three independent experiments by duplicate. \*\* $p < 0.005$ , \*\*\* $p < 0.001$

**Figure 8. Effect of EhPRMTA knockdown on heat shock, erythrophagocytosis and cell migration.** (A) EhPRMTA<sup>[AS]</sup> and MOCK trophozoites were incubated at 42 °C and their viability was determined at 15, 30 and 60 min. \*p<0.05, \*\*p<0.005. (B) Trophozoites were incubated with human RBCs at different times. At each time the non-phagocytosed RBCs were hypotonically lysed and after exhaustive washes, trophozoites were lysed and the hemoglobin released by ingested RBCs was determined at 400 nm. \*\*p<0.005, \*\*\*p<0.001. (C) Serum-starved trophozoites were placed in the upper chamber of transwell inserts, whereas medium containing 10% of bovine adult serum was added to the lower chamber. Finally, after 3 h of incubation at 37 °C the number of trophozoites at the lower chamber was counted. Data are expressed as the mean ± standard error of three independent experiments by duplicate. \*\*p<0.005.

**Supplementary Fig. 1. Alignment of EhPRMTA with human PRMTs of type I.** The amino acid sequence of EhPRMTA (EHI\_159180) was aligned by Clustal W with human PRMT1 (HsPRMT1, accession number: Q99873) and CARM1 (HsCARM1, accession number: [Q86X55](#)). Squares indicate the three domains (D I, D II and D III) and two loops (Double E and THW) conserved in PRMTs. Bold inside the squares showed the identical residues of EhPRMTA with at least one of the human PRMTs. Numbers indicate the residue positions.