

UACM

Universidad Autónoma
de la Ciudad de México

Nada humano me es ajeno

COLEGIO DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA

DOCTORADO EN CIENCIAS GENÓMICAS

**El factor de transcripción EhPC4 altera la replicación del DNA
y promueve fallas en citocinesis generando multinucleación
y la formación de policariontes en el parásito humano
*Entamoeba histolytica***

TESIS PARA OBTENER EL GRADO
DE DOCTORA EN CIENCIAS GENÓMICAS

PRESENTA

OLGA NOHEMÍ HERNÁNDEZ DE LA CRUZ

Director de tesis

Dr. Mario César López Camarillo

Ciudad de México, a febrero de 2016.

SISTEMA BIBLIOTECARIO DE INFORMACIÓN Y DOCUMENTACIÓN



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE LA CIUDAD DE MÉXICO COORDINACIÓN ACADÉMICA

RESTRICCIONES DE USO PARA LAS TESIS DIGITALES

DERECHOS RESERVADOS[©]

La presente obra y cada uno de sus elementos está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor; por la Ley de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México, así como lo dispuesto por el Estatuto General Orgánico de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México; del mismo modo por lo establecido en el Acuerdo por el cual se aprueba la Norma mediante la que se Modifican, Adicionan y Derogan Diversas Disposiciones del Estatuto Orgánico de la Universidad de la Ciudad de México, aprobado por el Consejo de Gobierno el 29 de enero de 2002, con el objeto de definir las atribuciones de las diferentes unidades que forman la estructura de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México como organismo público autónomo y lo establecido en el Reglamento de Titulación de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México.

Por lo que el uso de su contenido, así como cada una de las partes que lo integran y que están bajo la tutela de la Ley Federal de Derecho de Autor, obliga a quien haga uso de la presente obra a considerar que solo lo realizará si es para fines educativos, académicos, de investigación o informativos y se compromete a citar esta fuente, así como a su autor ó autores. Por lo tanto, queda prohibida su reproducción total o parcial y cualquier uso diferente a los ya mencionados, los cuales serán reclamados por el titular de los derechos y sancionados conforme a la legislación aplicable.

COMITÉ TUTORIAL

DIRECTOR: Dr. Mario César López Camarillo

Profesor Investigador. Posgrado en Ciencias Genómicas,

Universidad Autónoma de la Ciudad de México

CO-DIRECTORA: Dra. Laurence Annie Marchat Marchau

Profesora Titular. Programa Institucional en Biomedicina Molecular

Escuela Nacional de Medicina y Homeopatía-I.P.N

ASESORES

Dr. Arturo Rojo Domínguez. Profesor-Investigador de la División de Ciencias Naturales e Ingeniería. Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Cuajimalpa.

Dra. Elisa Irene Azuara Liceaga. Profesora-Investigadora del Posgrado en Ciencias Genómicas. Universidad Autónoma de la Ciudad de México.

Dr. José de Jesús Olivares Trejo. Profesor-Investigador del Posgrado en Ciencias Genómicas. Universidad Autónoma de la Ciudad de México.

El presente proyecto de investigación fue realizado gracias al apoyo académico y económico que me otorgó la Universidad Autónoma de la Ciudad de México, a la cual agradezco infinitamente.

La mayor parte de este trabajo se realizó en el Laboratorio 2 del Posgrado en Ciencias Genómicas de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México, bajo la dirección del Dr. Mario César López Camarillo. Y fue desarrollado con el valioso apoyo de la Dra. Laurence Annie Marchat, del Departamento de Biomedicina Molecular de la ENMyH-IPN; de la Dra. Esther Orozco Orozco, del Departamento de Infectómica y Patogénesis Molecular del CINVESTAV-IPN; y de la Dra. Nancy Guillen, de la *Unité Biologie Cellulaire du Parasitisme* del Instituto Pasteur, París-Francia.

Este trabajo fue apoyado por el Acuerdo México-Francia para la formación y capacitación Científica y Tecnológica, a través de la Convocatoria SEP-CONACyT-ANUIES-ECOS Nord 2008, mediante el proyecto M08-S02 "El papel de las proteínas EhPC4 y EhCstF-64 en la virulencia de *Entamoeba histolytica*". Así mismo, fue financiado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) a través del proyecto número 59481 "Caracterización funcional del factor de transcripción y poliadenilación EhPC4, y evaluación *in vivo* de su participación en la virulencia, mediante el análisis genómico con microarreglos de DNA en *E. histolytica*".

ÍNDICE	Págs.
LISTA DE ABREVIATURAS	I
LISTA DE FIGURAS	IV
LISTA DE TABLAS	VI
ABSTACT	VII
RESUMEN	IX
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Regulación de la expresión génica en eucariontes	1
1.1.1 Transcripción	2
1.1.2 Procesamiento de pre-mRNAs	3
1.2 El papel de de la proteína PC4 en la regulación de la expresión génica	4
1.3 Otras funciones de la proteína PC4	7
2. ESTADO DEL ARTE	9
2.1 Generalidades de <i>Entamoeba histolytica</i>	9
2.1.1 Epidemiología de la amibiasis	9
2.1.2 Ciclo de vida de <i>E. histolytica</i>	11
2.1.3 Taxonomía y filogenia de <i>E. histolytica</i>	12
2.2 El Genoma de <i>E. histolytica</i>	13
2.3 Regulación de la expresión génica en <i>E. histolytica</i>	14

3. ANTECEDENTES PARTICULARES DEL PROYECTO	16
3.1 La proteína EhPC4 de <i>Entamoeba histolytica</i>	16
4. JUSTIFICACIÓN	19
5. OBJETIVOS	20
5.1 Objetivo general	20
5.2 Objetivos específicos	20
6. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	21
7. MATERIALES Y MÉTODOS	22
7.1 Análisis bioinformáticos.	22
7.2 Cultivos celulares.	22
7.3 Obtención de DNA genómico de <i>E. histolytica</i> .	23
7.4 Construcción de plásmidos.	23
7.5 Amplificación y purificación de plásmidos.	24
7.6 Obtención de bacterias ultracompetentes por el método de cloruro de rubidio.	25
7.7 Transformación de bacterias.	26
7.8 Expresión y purificación de las proteínas recombinantes.	26
7.9 Ensayos de retardamiento de la movilidad electroforética.	27
7.10 Extracción, cuantificación y análisis de la calidad de los extractos proteicos totales, nucleares y citoplásmicos de <i>E. histolytica</i> .	28

7.11 Cuantificación de la proteínas por el método de Bradford.	29
7.12 Inmunolocalización de EhPC4, 3-Myc EhPC4 y 3-Myc EhNUDC en <i>E. histolytica</i> .	30
7.13 Coinmunolocalización de EhPC4 con laminina B1.	30
7.14 Transfección de trofozoítos de <i>E. histolytica</i> .	31
7.15 Análisis proteómico de trofozoítos que sobreexpresan EhPC4 mediante geles de poliacrilamida en dos dimensiones (2D-PAGE).	31
7.16 Extracción, cuantificación y análisis de la calidad del RNA de <i>E. histolytica</i> .	32
7.17 Validación de los datos de proteómica por RT-PCR.	33
7.18 Ensayo citopático.	34
7.19 Ensayo de migración celular.	35
7.20 Silenciamiento del gen <i>Eharp16</i> mediante RNA de interferencia.	35
7.21 Inmunodetección de F-actina.	36
7.22 Análisis transcriptómico de trofozoítos que sobreexpresan EhPC4 mediante microarreglos de expresión.	36
7.23 Análisis de proliferación, viabilidad y tamaño celular de <i>E. histolytica</i> .	36
7.24 Ensayo de replicación del DNA.	37
7.25 Determinación del contenido de DNA por citometría de flujo.	37
7.26 Determinación del número de núcleos por trofozoíto de <i>E. histolytica</i> .	37
7.27 Imagenología de células vivas en tiempo real.	38

7.28 Ensayos de inmunoprecipitación de la cromatina.	38
8. RESULTADOS.	40
8.1 <i>EhPC4</i> es una proteína altamente conservada a través de la escala evolutiva.	40
8.2 <i>EhPC4</i> requiere del residuo K ₁₂₇ para la unión al DNA.	45
8.3 <i>EhPC4</i> es una proteína nuclear distribuida en <i>foci</i> alrededor de la membrana nuclear externa.	54
8.4 Expresión de la proteína de fusión Myc- <i>EhPC4</i> en trofozoítos de <i>E. histolytica</i> .	57
8.5 La sobreexpresión de <i>EhPC4</i> modifica el perfil proteómico de los trofozoítos.	60
8.6 La sobreexpresión de <i>EhPC4</i> induce la formación de estructuras de F-actina, migración celular y destrucción de células SW480 de colon humano.	61
8.7 La sobreexpresión de <i>EhPC4</i> incrementa la migración celular de <i>E. histolytica</i> a través de la sobreexpresión de <i>EhABP16</i> .	67
8.8 La sobreexpresión de <i>EhPC4</i> incrementa la proliferación celular y la replicación del DNA en trofozoítos de <i>E. histolytica</i> .	69
8.9 La expresión incrementada de <i>EhPC4</i> resulta en multinucleación y defectos en la citocinesis.	72
8.10 <i>EhPC4</i> modula genes involucrados en el metabolismo de carbohidratos, de ácidos nucleicos, replicación del DNA y segregación de cromosomas.	74
8.11 La sobreexpresión de <i>EhNUDC</i> , promovida por la sobreexpresión de <i>EhPC4</i> ,	

recapitula los defectos en la citocinesis y el fenómeno de multinucleación en <i>E. histolytica</i> .	76
9. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES	82
10. BIBLIOGRAFÍA	88
11. APÉNDICES	101
Apéndice A. Lista de genes sobreexpresados en las células Myc-EhPC4.	101
Apéndice B. Lista de genes subexpresados en las células Myc-EhPC4.	106
Apéndice C. Artículo 1. Proteomic profiling reveals that EhPC4 transcription factor induces cell migration through up-regulation of the 16-kDa actin-binding protein EhABP16 in <i>Entamoeba histolytica</i> .	
Apéndice D. Artículo 2: Multinucleation and Polykaryon Formation is Promoted by the EhPC4 Transcription Factor in <i>Entamoeba histolytica</i> .	

LISTA DE ABREVIATURAS

3' UTR	Región 3' no traducida
5' UTR	Región 5' no traducida
6xHis	Etiqueta de 6 histidinas
α -6xHis	Anticuerpo anti-etiqueta de 6 histidinas
aa	Aminoácido
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
cDNA	Acido desoxirribonucleico complementario
CTD	Dominio carboxilo terminal
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTP's	Desoxinucleótidos trifosfatados
D.O.	Densidad óptica
ds174	Fragmento de DNA de doble cadena de 174 pares de bases
dsDNA	Ácido desoxirribonucleótido de doble cadena
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etilendiamino tetra-acético
EhPC4	Proteína coactivadora Positiva 4 de <i>E. histolytica</i>
EC	Extracto citoplasmático
EMSA	Ensayo de retardamiento de la movilidad electroforética
EN	Extracto nuclear
ESI-MS/MS	Espectrometría de masas en tándem con ionización por electrospray
h	Horas
IPG	Gradiente de pH inmovilizado
kb	Kilobases

kDa	Kilodaltones
LB	Medio de cultivo Luria-Bertani
L	Litros
mA	Miliamperios
Mb	Megabases
min	Minuto
ml	Mililitros
MOPS	Ácido 3-[N-morfolino] propano sulfónico
mRNA	RNA mensajero
nm	Nanómetro
nt	Nucleótidos
PAGE	Electroforésis en gel de poliacrilamida
pb	Pares de bases
PBS	Solución amortiguadora de fosfatos
PC4	Proteína coactivadora 4 de <i>H. sapiens</i>
PC4-CTD	Dominio carboxilo terminal de PC4
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PIC	Complejo de preinicio de la transcripción
pre-mRNA	RNA mensajero precursor
pRSET- <i>Ehpc4</i>	Plásmido pRSET con el gen <i>EhPC4</i> clonado
rEhPC4	Proteína recombinante PC4 de <i>E. histolytica</i>
RNA	Ácido ribonucleico
RNA pol II	Polimerasa de RNA tipo II
rpm	Revoluciones por minuto
RT	Transcripción reversa

s	Segundo
SDS	Dodecil sulfato de amonio
ssDNA	Ácido desoxirribonucleótido de cadena sencilla
TAFs	Factores asociados a TBP
TA	Temperatura ambiente
μl	Microlitros
μm	Micrometro
U	Unidades
v	Volts

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Complejo de preinicio de la transcripción.

Figura 2. Funciones de la proteína PC4.

Figura 3. Comparación de las características de la secuencia primaria de *HsPC4* (*Homo sapiens*) y *EhPC4* (*E. histolytica*).

Figura 4. Estrategia experimental.

Figura 5. Alineamiento múltiple del dominio de unión al DNA de *EhPC4* y sus proteínas ortólogas.

Figura 6. Weblogo del alineamiento múltiple entre la secuencia *EhPC4*-CTD y los dominios C-terminales de sus proteínas ortólogas.

Figura 7. Árbol sin raíz de *EhPC4* con sus proteínas ortólogas.

Figura 8. Alineamiento estructural del *HsPC4*-CTD con *EhPC4*-CTD.

Figura 9. Análisis *in silico* de la interacción de *EhPC4* con el DNA.

Figura 10. Expresión y purificación de la proteína *EhPC4*.

Figura 11. Análisis de la interacción de la proteína r*EhPC4* con el DNA mediante ensayos de retardamiento.

Figura 12. Clonación del gen mutante *ehpc4-k127a* en el vector pRSET-A.

Figura 13. Análisis de la secuenciación del plásmido pRSET-*ehpc4-k127a*.

Figura 14. Expresión de la proteína r*EhPC4*-K127A en *E. coli* y análisis de su interacción con el DNA mediante ensayos de retardamiento.

Figura 15. Inmuloalización de *EhPC4* en trofozoítos de *E. histolytica*.

Figura 16. Colocalización de EhPC4 con laminina B1 en trofozoítos de *E. histolytica*.

Figura 17. Clonación del *ehpc4* en el vector pKT3M.

Figura 18. Expresión de la proteína de fusión Myc-EhPC4 en trofozoítos de *E. histolytica*.

Figura 19. Comparación de los perfiles proteómicos de trofozoítos de *E. histolytica* transfectados con los plásmidos pKT-3M y pKT-3M-EhPC4.

Figura 20. Análisis densitométrico de las proteínas identificadas como moduladas en las células Myc-EhPC4.

Figura 21. Análisis por RT-PCR de los genes que codifican a las proteínas identificadas como moduladas en células Myc-EhPC4.

Figura 22. Efecto de la sobreexpresión de EhPC4 sobre la formación de estructuras de F-actina, migración celular y capacidad de destrucción de células de colon humano en trofozoítos de *E. histolytica*.

Figura 23. Efecto del silenciamiento de EhABP16 en trofozoítos de *E. histolytica*.

Figura 24. Efecto de la sobreexpresión de EhPC4 en la tasa de crecimiento, viabilidad, tamaño celular e incorporación de BrdU de trofozoítos de *E. histolytica*.

Figura 25. Análisis del contenido de DNA y multinucleación de células Myc-EhPC4.

Figura 26. Análisis de la citocinesis de células Myc-EhPC4.

Figura 27. Clasificación GO de los genes sobreexpresados en las células Myc-EhPC4 en categorías funcionales (a) y análisis de la interacción de EhPC4 a los promotores de algunos de los genes implicados en división, ciclo celular y segregación de cromosomas (b) mediante inmunoprecipitación de la cromatina.

Figura 28. Enzimas del metabolismo de carbohidratos sobreexpresadas en las células Myc-EhPC4.

Figura 29. Enzimas del metabolismo de nucleótidos sobreexpresadas en las células Myc-EhPC4.

Figura 30. a) Comparación de la estructura molecular de NUDC de humano (hNUDC) y *EhNUDC*. Análisis de la expresión de la proteína Myc-*EhNUDC* mediante inmunodetección usando un anticuerpo α -Myc (b) e inmunofluorescencia empleando un α -myc de ratón y un α -ratón acoplado a FITC (c) en células Myc-*EhNUDC*. (d) Comparación del número de núcleos por célula a 96h post-sincronización.

LISTA DE TABLAS

Tabla I. Proteínas sobreexpresadas en los trofozoítos myc-EhPC4.

Tabla II. Proteínas subexpresadas en los trofozoítos myc-EhPC4.

ABSTRACT

The human parasite *Entamoeba histolytica* infects around 50 million people worldwide, resulting in 40,000-100,000 deaths annually. In *E. histolytica* the mechanisms involved in transcriptional control of gene expression are poorly understood. In human, the Positive Coactivator 4 (PC4) is involved in the regulation of gene transcription and 3'-end pre-mRNA polyadenylation. Previously, we identified a PC4 homologous gene in *E. histolytica*, which we refer to as EhPC4. In this work, we investigated the effects of EhPC4 ectopic overexpression on *E. histolytica* biological processes.

By biochemical analysis using EMSA assays, we found that EhPC4 binds to DNA, and that a substitution from alanine to lysine (A₁₂₇K) induces a drastic reduction in its ability to form complexes with DNA *in vitro*. By Western blot, immunofluorescence and confocal microscopy assays, we observed that EhPC4 exhibits a nuclear localization, distributed in a punctuated manner, next to the nuclear membrane.

To identify potential protein targets of EhPC4, we employed differential in gel two-dimensional electrophoresis assays and evaluated changes in protein expression levels in EhPC4-overexpressing trophozoites. We detected 33 proteins modulated differentially in EhPC4-overexpressing cells. By electrospray ionization tandem mass spectrometry (ESI-MS/MS) analysis, 16 of these proteins were identified. Interestingly, four up-regulated proteins (EhABP16, Ehactin, EhLimA, and EhMAEBL) are involved in cytoskeleton organization and cell migration. Consistently with these data, we observed a significant increase in cell migration and destruction of human SW480 colon cells in trophozoites that overexpress EhPC4. Moreover, silencing of gene expression by RNA interference of EhABP16 (16-kDa actin-binding protein), a putative member of the cofilin/tropomyosin family involved in actin polymerization, significantly impairs cell migration. These changes in migration were associated to alterations in the morphology and organization of actin cytoskeleton, and suppression of uropods-like structures formation in EhABP16-deficient trophozoites.

Aiming to complement the proteomic data and explain the phenotypic associated with overexpression of EhPC4, we evaluate by DNA microarrays the genome-wide profiling of EhPC4 overexpressing trophozoites. Consistently, we observed the up-regulation of a set of

genes that participate in the regulation of actin cytoskeleton organization. Also, genes implicated in carbohydrate and nucleic acids metabolism, supporting the enhanced cell proliferation and DNA replication. In addition, modulated genes involved in cell cycle, chromosome segregation and cytokinesis were identified, such as *EhNUDC*, *EhCDC48*, *EhCwf12*, *EhSkip1*, *EhSGT1*, and *EhSMC*. By chromatin immunoprecipitation assays, we confirmed that *EhPC4* binds to promoter regions of these genes *in vivo*.

Besides, serendipity found that PC4 is involved in cellular processes related to the proper control of cell division and polyploidy. Conditional overexpression of *EhPC4* significantly increased the cell proliferation and DNA replication rates of trophozoites. Interestingly, we observed an increase in cells size and the formation of giant multinucleated trophozoites of *EhPC4*-overexpressing cells in culture. At 96 hours post-synchronization by serum starvation of cell cycle this phenotype is most evident.

Forced overexpression of a target gene of *EhPC4* in *E. histolytica* trophozoites, *EhNUDC* (nuclear migration protein), also leads to cytokinesis alterations and recapitulated partially the multinucleation phenotype observed in *EhPC4*-overexpressing cells. Using digital time-lapse video of live cells we suggested that multinucleation resulted from cytokinesis failure as consequence of abortion in ongoing cell division.

Taken all together, these results reveals for the first time that *EhPC4*, highly conserved evolutionarily, is involved in the activation of an unexpected genetic program leading to increased cell growth, DNA replication and multinucleation. This findings undercover novel data about the molecular mechanisms that contributes to DNA heterogeneity and polyploidy in the primitive parasite *E. histolytica*. Moreover, cell motility is a complex trait that is critical for parasite adaptation, spread and invasion processes into host tissues. In this study we demonstrated that *EhPC4* induces also changes in the expression of actin cytoskeleton proteins, promoting a significant increase in cell motility and destruction of intestinal human cells. These data contribute to the understanding of molecular mechanisms that regulate virulence properties in this neglected protozoan parasite. The identification of proteins involved in these cellular processes may be useful for the ongoing search of novel targets for intervening growth, survival and proliferation in *E. histolytica*.

RESUMEN.

El parásito humano *Entamoeba histolytica* infecta alrededor de 50 millones de personas en todo el mundo, provocando entre 40,000-100,000 muertes anualmente. En *E. histolytica* los mecanismos involucrados en el control de la expresión de genes siguen siendo poco comprendidos. En humano, el Coactivador Positivo 4 (PC4) está involucrado en la regulación de la transcripción de genes y en la poliadenilación de los extremos 3' de los pre-RNAs mensajeros. Previamente, identificamos un gen homólogo de PC4 en *E. histolytica*, que denominamos EhPC4. En este trabajo, investigamos los efectos de la sobreexpresión ectópica de EhPC4 sobre diversos procesos biológicos de *E. histolytica*.

Mediante análisis bioquímicos a través de ensayos de retardamiento de la movilidad electroforética (EMSA) encontramos que EhPC4 se une al DNA, y que una sustitución de una alanina a una lisina (A₁₂₇K) induce una drástica reducción de su habilidad para formar complejos con el DNA *in vitro*. Mediante ensayos Western blot, inmunofluorescencia y microscopia confocal, observamos que EhPC4 exhibe una localización nuclear, distribuida de una manera puntuada, próxima a la membrana nuclear.

Para identificar blancos proteicos potenciales de EhPC4, realizamos geles de electroforesis bidimensional y evaluamos los cambios en el nivel de expresión de proteínas asociados a la sobreexpresión de EhPC4 en trofozoítos de *E. histolytica*. Detectamos 33 proteínas que se modularon diferencialmente en las células que sobreexpresan EhPC4. Mediante espectrometría de masas en tándem con ionización por electrospray (ESI-MS/MS), identificamos 16 de estas proteínas. Interesantemente, cuatro proteínas que se sobreexpresaron (EhABP16, Ehactin, EhLimA y EhMAEBL) están involucradas en la organización del citoesqueleto y migración celular. Consistentemente con estos datos, nosotros observamos que los trofozoítos que sobreexpresan EhPC4 incrementan también su migración y su capacidad de destrucción de células de colon humano SW480. Además, el silenciamiento por RNA de interferencia de EhABP16 (proteína de unión a actina de 16 kDa), un miembro hipotético de la familia cofilina/tropomiosina involucrada en la polimerización de actina, significativamente reduce la migración celular. Estos cambios en migración se asociaron a alteraciones en la morfología y organización del citoesqueleto de actina, y a la

supresión de la formación de estructuras similares a uropodos en los trofozoítos deficientes de EhABP16.

Con el objetivo de complementar los datos proteómicos y explicar el fenotipo asociado con la sobreexpresión de EhPC4, evaluamos mediante microarreglos de ADN el perfil genómico de trofozoítos que sobreexpresan EhPC4. Consistentemente, se observó la sobreexpresión de un grupo de genes que participan en la regulación de la organización del citoesqueleto de actina. También se sobreexpresaron genes implicados en el metabolismo de carbohidratos y ácidos nucleicos, que puede estar sustentando un incremento en la proliferación celular y replicación del ADN. Además se identificaron genes implicados en el ciclo celular, citocinesis y segregación de cromosomas, tales como EhNUDC, EhCDC48, EhCwf12, EhSkip1, EhSGT1, y EhSMC. Mediante ensayos de inmunoprecipitación de la cromatina, confirmamos que EhPC4 se une a las regiones promotoras de estos genes *in vivo*.

De manera inesperada encontramos que EhPC4 está implicado en procesos celulares relacionados con el control de la división celular y poliploidia. La sobreexpresión condicional de EhPC4 aumentó significativamente las tasas de proliferación celular y la replicación del ADN de los trofozoítos. Interesantemente, observamos que las células que sobreexpresan EhPC4 presentan un incremento en el tamaño celular y forman trofozoítos gigantes multinucleados. A las 96 horas de crecimiento post-sincronización por ausencia de suero este fenotipo es más evidente.

La sobreexpresión forzada de un gen blanco de EhPC4 en trofozoítos de *E. histolytica*, EhNUDC (proteína de migración nuclear), también produce alteraciones en citocinesis y recapitula parcialmente el fenotipo de multinucleación observado en las células que sobreexpresan EhPC4. Con ayuda de videos de células vivas, se observó que la multinucleación puede ser resultado de fallas en la citocinesis, como una consecuencia del aborto en la división celular.

Estos resultados en su conjunto muestran por primera vez que el factor EhPC4, altamente conservado evolutivamente, está implicado inesperadamente en la activación de un programa genético que conduce a un aumento en el crecimiento celular, replicación del ADN y multinucleación. Estos hallazgos arrojan nuevos datos sobre los mecanismos moleculares que

contribuyen a la heterogeneidad del ADN y a la poliploidía en el parásito primitivo *E. histolytica*. Por otra parte, la motilidad celular es un rasgo complejo que es fundamental para la adaptación del parásito, diseminación e invasión de los tejidos del huésped. En este estudio demostramos también que EhPC4 induce cambios en la expresión de proteínas del citoesqueleto de actina, promueve un aumento significativo en la motilidad celular y en la capacidad de destrucción de las células intestinales humanas. Estos datos contribuyen a la comprensión de los mecanismos moleculares que regulan las propiedades de virulencia de este parásito protozoario. La identificación de proteínas involucradas en estos procesos celulares puede ser usado para la búsqueda de nuevos blancos terapéuticos que inhiban el crecimiento, la sobrevivencia y la proliferación en *E. histolytica*.

1. INTRODUCCIÓN.

1.1 Regulación de la expresión génica en eucariontes.

Los genomas eucariontes varían ampliamente en tamaño entre las diferentes especies, van desde unos 12 Mb como es el caso del hongo *Saccharomyces cerevisiae* hasta más de 100,000 Mb como los encontrados en muchas plantas con flores como *Paris japonica*. A pesar de las enormes diferencias en tamaño entre los genomas eucariontes, lo que resulta menos variable es el número de genes que contienen. Debido a que el DNA es el portador de la información genética, aquella que determina en gran medida los rasgos portados por un organismo, mucho tiempo se pensó que los organismos entre más evolucionados y complejos debían de tener genomas más grandes, sin embargo, hoy se sabe que no siempre existe una relación directa entre el estado evolutivo de un organismo y el tamaño de su genoma. El protista *Amoeba dubia* es considerado como la especie que porta el genoma más grande reportado hasta la fecha, cuenta con 670,000 Mb, 230 veces más grande que el genoma humano. En eucariontes superiores con genomas muy grandes se ha observado que sólo una pequeña porción de esos genomas presentan genes, la mayor parte del DNA es no codificante, sin embargo es indispensable en la regulación de la expresión de los genes ^[1].

La enorme complejidad de los genomas eucariontes hace necesaria una amplia diversidad de mecanismos que permitan regular la expresión de sus genes de manera precisa, los cuales son requeridos para obtener un producto génico activo y que pueda ser empleado para el mantenimiento y homeostasis celular. En células eucariontes la regulación de la expresión de la información genética se regula a diferentes niveles, de manera general los principales niveles de regulación de la expresión génica pueden clasificarse de la siguiente manera: nivel transcripcional, co-transcripcional, post-transcripcional, traduccional y post-traduccional. A pesar de que todos estos niveles de regulación de la expresión génica son muy importantes, se puede decir que uno de los más importantes es el transcripcional, el cual está sujeto a una enorme regulación, donde están implicadas una gran cantidad de proteínas y elementos dentro del DNA. El proceso de transcripción es responsable de determinar qué genes se van a expresar en un momento dado y en qué proporción. Para muchos genes existe una correlación directa entre los niveles de mRNAs y los niveles de proteínas.

1.1.1 Transcripción

La transcripción de los genes se lleva a cabo en el interior del núcleo de las células eucariontes y permite que la información genética que se encuentra almacenada en el DNA se transfiera a una secuencia de RNA. El resultado de este proceso es una molécula de RNA de cadena sencilla complementaria a la secuencia codificante del DNA. Dicha molécula, que actúa como portadora de la información genética, cuando se está sintetizando se denomina RNA mensajero precursor (pre-mRNA) o naciente, después de ser procesada se convierte en una molécula conocida como RNA mensajero (mRNA), que es la encargada de llevar la información que inicialmente se encontraba codificada en el DNA al citoplasma, para que sea empleada durante la síntesis de proteínas. La importancia del proceso de transcripción es enorme, puesto que representa el inicio del flujo de la información genética dentro de la célula. La transcripción es un proceso complejo que presenta múltiples pasos y por convención se ha dividido en tres etapas: inicio, alargamiento y terminación.

El inicio de la transcripción comienza con la formación de un complejo multiproteico, que en conjunto se conoce como "Complejo de Preinicio de la Transcripción" (por sus siglas en inglés, PIC), el cual reconoce e interacciona con las regiones promotoras, que son secuencias específicas de cada gen ubicadas río arriba del sitio de inicio de la transcripción del gen. El PIC está formado por proteínas altamente conservadas a lo largo de la evolución, las cuales actúan como intermediarias de la activación génica. Dichas proteínas son de diferentes tipos: 1) Factores basales o generales de la transcripción (GTFs), que se caracterizan por reconocer los promotores de muchos genes diferentes; 2) proteínas activadoras y coactivadoras que actúan en *trans*; y 3) la enzima RNA polimerasa II (RNA pol II) que sintetiza la cadena de RNA. El PIC tiene la función de proporcionar una plataforma para que la RNA pol II reconozca y se una a la región promotora de los genes que se deben de transcribir. La RNA polimerasa es la proteína encargada de sintetizar el pre-mRNA. Durante el inicio de la formación del PIC, un complejo proteico denominado TFIID reconoce aproximadamente unos 20 pb de la región promotora de los genes y se une a la caja TATA, en los promotores que contienen esta secuencia a través de una de sus subunidades denominada TBP (proteína de unión a la caja TATA). TFIID está compuesto por TBP y por aproximadamente otras 13 proteínas más denominadas TAFs (factores asociados a TBP). En el promotor TFIID interactúa con

proteínas activadoras de la transcripción, que a su vez facilitan su interacción con otros factores generales de la transcripción como es TFIIB. Esta es una proteína que interacciona con TBP y con secuencias del promotor ubicadas río arriba de la caja TATA. Una vez que están reclutados estos factores en el PIC, TFIIA, la RNA pol II y otros factores adicionales como TFIIIF, TFIIIE, TFIIJ y TFIIH se incorporan, completando de ésta manera el PIC, y es entonces cuando la RNA pol II inicia la transcripción del gen adyacente (Figura 1) ^[1].

Los factores generales de la transcripción forman una plataforma de unión de la RNA pol II al promotor y estimulan la transcripción de los genes a un nivel basal. Las proteínas activadoras y represoras actúan como factores que incrementan o reprimen la transcripción, respectivamente, determinando el sitio, el momento y la tasa de expresión de los genes. Así mismo, durante la formación del PIC se reclutan proteínas que posteriormente van a ser empleadas para el procesamiento del pre-mRNA, como son los factores de corte y poliadenilación del extremo 3' UTR. La RNA pol II se desplaza a lo largo de las cadenas de DNA y cuando encuentra las regiones promotoras de los genes que se van a transcribir, debido a la presencia de los componentes del PIC, interacciona con ellos. Sin embargo, para que la RNA pol II inicie la transcripción necesita ser modificada post-traduccionalmente. Se sabe que el último componente en ser reclutado al PIC es la proteína TFIIH, la cual tiene actividad de cinasa y es capaz de fosforilar el CTD de la RNA pol II y de ésta manera activarla, dando paso al inicio de la transcripción. Durante el alargamiento del pre-mRNA, se lleva a cabo la polimerización de la molécula de RNA, la cual prosigue en dirección del extremo 5' al 3', mediante la inserción de ribonucleótidos complementarios, formando un duplex de DNA-RNA temporal (Figura 1) ^[1].

1.1.2 Procesamiento de pre-mRNAs.

Mientras el pre-mRNA se está sintetizando, la molécula se va modificando mediante una serie de eventos que en su conjunto se han denominado "mecanismos de procesamiento del pre-mRNA". Estos mecanismos comprenden: 1) la adición de una estructura química denominada "cap" en su extremo 5' UTR durante el proceso conocido en inglés como *capping*; 2) la eliminación de los intrones, que son fragmentos de DNA no codificante de tamaño variable dentro de la secuencia codificante del pre-mRNA, mediante el proceso conocido en inglés como "*splicing*"; y 3) el corte y adición de una cola de poli(A) en su extremo 3' UTR mediante el proceso denominado corte y poliadenilación.

Dichos mecanismos de procesamiento son necesarios para generar una molécula de mRNA madura, capaz de ser transportada del núcleo al citoplasma y ser reconocida por los ribosomas, que en última instancia, van a descifrar la información contenida en la molécula mensajera para dirigir la síntesis de proteínas ^[1]. Aunque cada una de las reacciones de procesamiento del pre-mRNA pueden realizarse de manera independiente *in vitro* en el laboratorio, en los últimos años se han recopilado evidencias que indican que en las células dichas modificaciones se llevan a cabo de manera simultánea, están altamente coordinadas, e incluso se estimulan unas a otras ^[2]. Mediante ensayos de inmunoprecipitación de la cromatina, se ha visto que ciertos factores de poliadenilación pueden asociarse al CTD de la RNA pol II durante el inicio, alargamiento y la terminación de la transcripción, facilitando la terminación de la transcripción, así como el procesamiento del extremo 3' UTR del pre-mRNA (Figura 1) ^[3]. El acoplamiento entre maquinarias permite resolver muchos de los problemas inherentes de las vías de la expresión génica, como por ejemplo, el acoplamiento de la transcripción con el *capping* permite que el mRNA naciente sea protegido de la degradación enseguida de ser sintetizado. Así mismo, el acoplamiento de la transcripción y el procesamiento del extremo 3' UTR promueve que los RNA mensajeros, una vez que se han transcrito completamente, sean cortados y poliadenilados inmediatamente ^[4].

1.2 El papel de la proteína PC4 en la regulación de la expresión génica.

Recientemente se han obtenido evidencias que sugieren que en humano, el inicio y la terminación de la transcripción pueden estar ligados con la poliadenilación a través del factor de transcripción y poliadenilación PC4 (por sus siglas en inglés, Positive Coactivator 4). PC4 inicialmente fue descubierto como una proteína con función de coactivador transcripcional, esto es, un factor que permite que proteínas activadoras de la transcripción funcionen de manera específica, ya que promueve su interacción con los factores generales de la transcripción y el DNA. La habilidad de PC4 para interactuar con los GTFs y las proteínas activadoras facilita los primeros pasos en el ensamble del PIC, por lo tanto, PC4 es una proteína que promueve el inicio de la transcripción ^[5]. Sin embargo, se ha reportado que PC4, al tener la capacidad de unirse al DNA y no permitir el arranque de la RNA pol II, también puede actuar como un represor del inicio de la transcripción hasta que el PIC esté completo. La represión de la transcripción por PC4 es sólo transitoria y reversible, ya que se inhibe con la presencia del factor de transcripción

TFIIH. Se sabe que TFIIH es el último componente que se recluta en el PIC, mientras el PIC no esté completo PC4 reprime el inicio de la transcripción de la RNA pol II. Cuando TFIIH se recluta fosforila a PC4, inhibiendo su capacidad de unirse al DNA y por lo tanto su actividad represora, como consecuencia de esto se puede iniciar la transcripción y PC4 fosforilado se une a los factores de poliadenilación unidos a la RNAPol II ^[6]. Estos datos sugieren que PC4 puede tener múltiples funciones, siendo una de ellas el permitir la formación de un PIC completo y activo estimulando así el inicio de la transcripción (Figura 1).

Mediante experimentos donde se ha empleado resonancia magnética nuclear para definir como es la interacción de PC4 con el DNA, se ha observado que PC4 tiene la capacidad de unirse a DNA de cadena sencilla (ssDNA) y de cadena doble (dsDNA) mediante su extremo carboxilo terminal (PC4-CTD) ^[7]. Particularmente, PC4 muestra una alta afinidad por regiones de DNA en donde las cadenas están parcialmente abiertas, por ejemplo en promotores parcialmente desnaturalizados ^[8].

Se ha reportado que la proteína PC4 interacciona con factores de la maquinaria de poliadenilación, promoviendo así el ensamble y el funcionamiento de esta maquinaria. A través de ensayos de doble híbrido se ha demostrado que PC4 interactúa con el factor de corte y poliadenilación CstF-64, el cual a su vez interactúa con la RNA pol II, desde la formación del PIC hasta la terminación de la transcripción (Figura 1) ^[9]. Así mismo, mediante este tipo de ensayos se ha verificado la interacción de los homólogos a PC4 y Cst-F64 en *S. cerevisiae* (Sub1 y Rna15, respectivamente) y se ha observado que son requeridos para una eficiente terminación de la transcripción y para el procesamiento del extremo 3' UTR de los pre-mRNAs ^[10]. Se ha propuesto que PC4 funciona también como un anti-terminador de la transcripción, ya que al estar unido a CstF-64 inhibe la actividad de este factor estimulante de corte. Una vez que se han alcanzado y transcrito las señales de poliadenilación en el pre-mRNA, PC4 se disocia de CstF-64 liberándolo y permitiendo su participación en la terminación de la transcripción y en el inicio del corte y la poliadenilación ^[9].

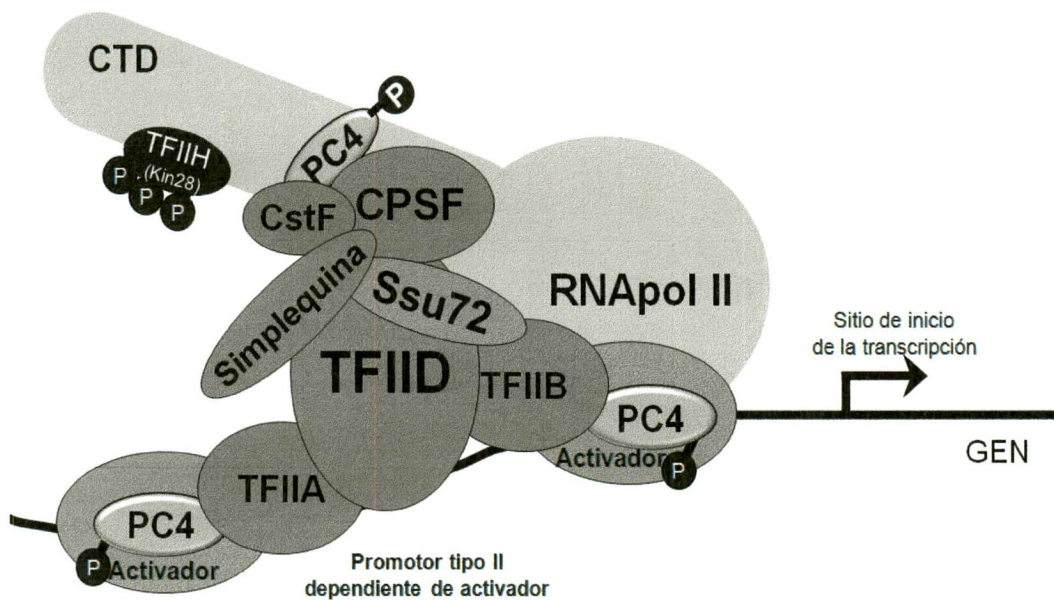


Figura 1. Complejo de preinicio de la transcripción. El PIC tiene la función de proporcionar una plataforma para que la RNA pol II reconozca las regiones promotoras y transcriba los genes; está constituido principalmente por factores basales o generales de la transcripción, proteínas activadoras y coactivadoras, factores de poliadenilación y la RNA pol II. Tomada y modificada de Calvo y Manley, 2003 ^[3].

Se han hecho estudios de la proteína homóloga a PC4 en *S. cerevisiae*, Sub1 (también llamada Tsp1), y se ha observado que este factor purificado es capaz de incrementar la transcripción basal de la RNA pol II *in vitro*, de unirse a dsDNA y ssDNA, y de interactuar con el factor general de la transcripción TFIIB, así como con proteínas activadoras, dichas interacciones parecen estar reguladas por fosforilación. Así mismo, se ha observado mediante depleción de Sub1 que por sí mismo no es esencial en levadura, y que su sobreexpresión incrementa la expresión de muchos genes específicos^[10].

1.3 Otras funciones de la proteína PC4

PC4 se encuentra asociada a la cromatina durante las diferentes fases del ciclo celular e interacciona con las histonas H3 y H2B favoreciendo la condensación de la cromatina^[11,12]. Así mismo, interactúa directamente con XPG, un factor que se requiere para la reparación del daño al DNA acoplada a transcripción y ayuda a la reparación del DNA producido por daño oxidativo^[13]. Así mismo, forma complejos con HSSB, una proteína de unión al DNA de cadena sencilla, la cual es esencial para muchos aspectos del metabolismo de los ácidos nucleicos tal como replicación, reparación y recombinación. Dependiendo de las concentraciones de HSSB, PC4 es capaz de inhibir o activar la replicación del DNA de SV40^[14]. PC4 además estimula la reparación de las rupturas de DNA de doble cadena a través de la unión de extremos no homólogos (Figura 2)^[15].

Por otra parte, se ha reportado que PC4 se encuentra sobreexpresada en diferentes tipos de tejido y líneas celulares de cáncer, incluyendo células no pequeñas de pulmón, por lo que se ha sugerido que esta proteína está involucrada en el desarrollo de la tumorigenesis, probablemente a través de su capacidad activadora de la transcripción, o mediante la sinergia con genes involucrados en el proceso de carcinogénesis. Más aún, el silenciamiento de PC4 *in vitro* en la línea celular A549, promueve una disminución en la proliferación celular, arresto del ciclo celular y la apoptosis. Estos datos sugieren que PC4 puede ser un nuevo blanco potencial para terapias anticancerígenas en humanos^[16].

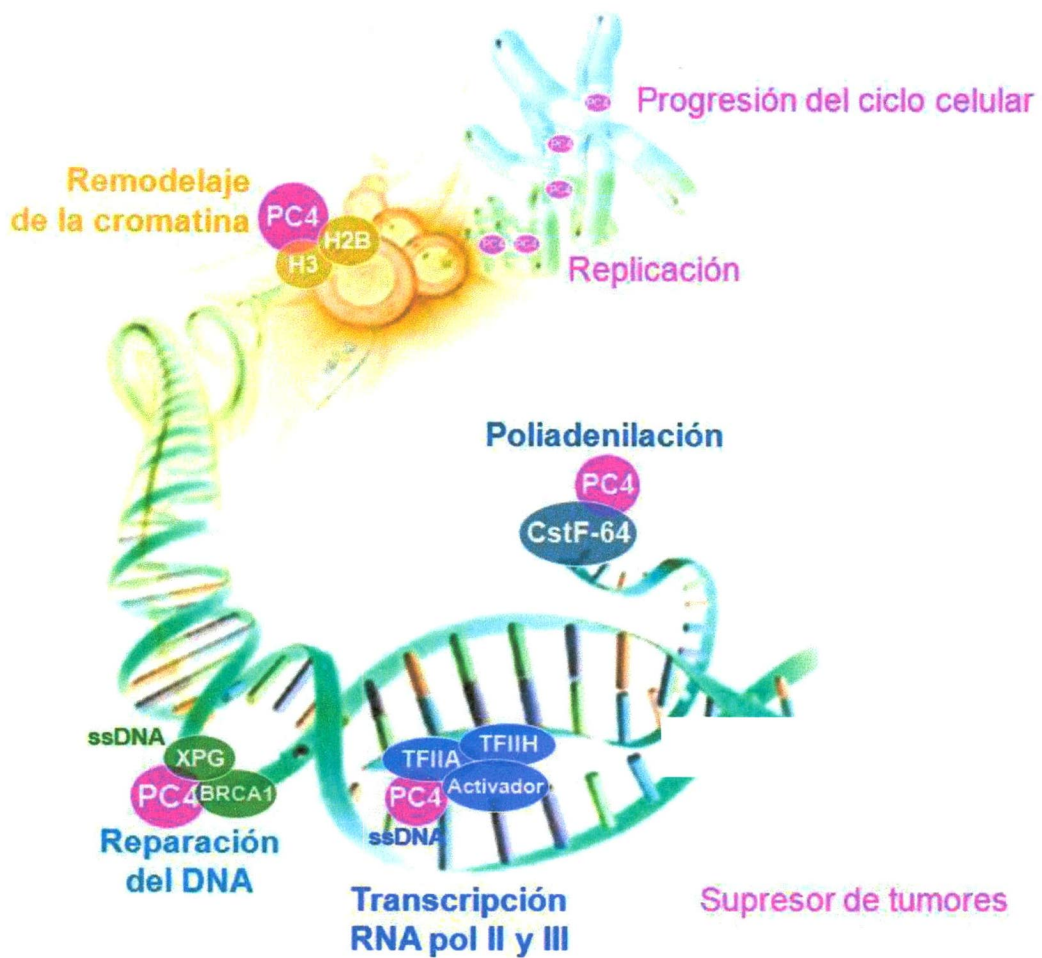


Figura 2. Funciones de la proteína PC4. PC4 participa en diferentes procesos celulares, tal como la progresión del ciclo celular, el remodelaje de la cromatina, reparación y replicación del DNA, transcripción y procesamiento del extremo 3'-UTR de los pre-mRNAs.

2. ESTADO DEL ARTE

2.1 Generalidades de *Entamoeba histolytica*.

E. histolytica es un microorganismo eucarionte unicelular que vive generalmente como comensal en el lumen del intestino grueso del hombre, donde produce amibiasis luminal benigna. Comúnmente el hombre adquiere este parásito vía oral-fecal, mediante la ingesta de alimentos y bebidas contaminadas con heces humanas que contienen quistes del parásito.

La Organización Mundial de la Salud define a la amibiasis como la condición de portar el parásito protozooario *Entamoeba histolytica*, independientemente si se presentan o no manifestaciones clínicas. Las manifestaciones clínicas presentan un amplio espectro, desde una infección asintomática, diarrea y disentería, hasta colitis fulminante y peritonitis, así como amibiasis extraintestinal. La amibiasis aguda puede presentarse como diarrea o disentería, acompañadas frecuentemente de heces sanguinolentas. La amibiasis crónica puede ocasionar síntomas gastrointestinales, fatiga, pérdida de peso y en ocasiones fiebre. Bajo ciertas condiciones aún no bien entendidas, y que están correlacionadas con la expresión de genes de virulencia del parásito, este microorganismo es capaz de invadir la mucosa intestinal. Una vez invadido el epitelio intestinal, el parásito puede atravesarlo y diseminarse a través de la sangre originando una amibiasis extraintestinal, la cual se caracteriza por la diseminación del parásito en diferentes órganos del hospedero, principalmente en hígado, y con menos frecuencia en el pulmón, cerebro, piel, órganos genitales, bazo y riñón^[17]. Cuando el parásito alcanza los diferentes órganos puede comenzar a formar lesiones conocidas como abscesos, que a su vez pueden producir en el hospedero fiebre y dolor abdominal en el caso de que dichos abscesos se localicen en el hígado.

2.1.1 Epidemiología de la amibiasis.

E. histolytica se distribuye ampliamente en todo el mundo y presenta una alta incidencia en varias regiones, particularmente en los trópicos, convirtiendo a la amibiasis en uno de los problemas provocados por parásitos más serios de salud a escala mundial. Su prevalencia es el resultado de condiciones socioeconómicas precarias, desnutrición, así como estándares de higiene y sanidad bajos, lo cual es muy frecuente en

comunidades de países en vías de desarrollo. En países desarrollados la amibiasis está ampliamente determinada por el estado socioeconómico, hábitos de higiene, la edad, hacinamiento, etc. La desnutrición de los individuos es un factor importante de predisposición y riesgo para el establecimiento de infecciones, en especial aquellas producidas por parásitos protozoarios que habitan comúnmente el tracto gastrointestinal, como *E. histolytica*, ya que propicia un estado inmunológico deficiente ^[18, 19]. En algunos países, la amibiasis causada por *E. histolytica* se coloca entre las diez primeras causas de muerte, siendo la tercera enfermedad parasitaria por protozoarios de mayor importancia en el ámbito mundial, precedida únicamente por la malaria y la esquistosomiasis ^[20].

Los estudios serológicos realizados para estimar la proporción de la población con amibiasis invasora sugieren que uno de cada diez individuos con infección sintomática presenta invasión de la mucosa intestinal o hepática ^[20]. Las áreas geográficas con mayor incidencia de amibiasis son el Sur y Centro de América, Sur y Oeste de África, el Oriente y la India. A nivel mundial se ha estimado que 500 millones de individuos están infectados con *E. histolytica*, de las cuales, 40 millones podrían desarrollar una enfermedad invasiva, causando al año al menos 100,000 muertes, muchas de éstas por complicaciones secundarias extra-intestinales, tal como abscesos hepáticos ^[21].

Anteriormente, con los métodos empleados para la detección del parásito (principalmente microscopía) era imposible hacer una distinción entre diferentes especies de *Entamoeba*, por lo que se piensa que los datos epidemiológicos viejos presentan una sobreestimación de la prevalencia de *E. histolytica* en el mundo. Actualmente se cuenta con herramientas moleculares rápidas y sensibles, como la detección por PCR, que permiten un diagnóstico más preciso, ya que tiene la capacidad de diferenciar entre especies. Ahora se acepta que la distribución mundial de otra especie, *E. dispar*, es en general mucho más amplia que la de *E. histolytica* ^[22]. En países desarrollados la infección por *E. dispar* es mucho más común y es confinada a ciertos grupos como son inmigrantes de áreas endémicas, hombres homosexuales, pacientes infectados con VIH ^[23]. *Entamoeba dispar* y *Entamoeba moshkovskii* son dos especies indistinguibles morfológicamente de *E. histolytica*, y en muchas partes del mundo se presentan con una alta frecuencia, a pesar de esto, se piensa que sólo *E. histolytica* es capaz de causar enfermedad invasiva en el humano. Aunque se ha reportado previamente que *E. dispar* es capaz de producir abscesos hepáticos en hámsteres ^[24].

En México la amibiasis es una enfermedad endémica considerada como un serio problema de salud pública, ya que se ha estimado que existe una proporción de un paciente con amibiasis invasiva por cada 4 o 5 portadores asintomáticos ^[25]. Se estima que el 20% de la población mexicana total es portadora, de los cuales el 2% presentan síntomas de la enfermedad y entre el 0.1-0.2% de los enfermos muere, esto equivale aproximadamente a 16 millones de portadores, 1.3 millones de enfermos sintomáticos y entre 10 a 20 mil muertes cada año ^[26]. En México, Caballero-Salcedo y cols., realizaron un estudio de hemaglutinación indirecta con anticuerpos específicos dirigidos contra *E. histolytica* y encontraron que el 8.4% de la población examinada fue seropositiva, siendo la zona norte del país donde se presentó menor incidencia de amibiasis. Los resultados señalan una relación directa entre la frecuencia de amibiasis y los factores socio-económicos tales como el hacinamiento, la carencia de servicios públicos y los malos hábitos higiénicos ^[27].

2.1.2 Ciclo de vida de *E. histolytica*.

El ciclo de vida del parásito es relativamente sencillo; presenta dos estadios morfológicos claramente distinguibles: el quiste y el trofozoíto. Los quistes, que generalmente se encuentran en el medio ambiente contaminando alimentos y agua, constituyen la forma infectiva y propagativa del parásito. Cuando están maduros son muy resistentes a cambios ambientales drásticos ya que sintetizan una pared celular gruesa de quitina de alrededor de 125-150 nm de espesor. Presentan una forma ligeramente ovalada con un diámetro de 8 a 20 μm y cuatro núcleos. Los quistes al ser ingeridos por el humano son arrastrados hacia el estómago junto con los alimentos, y cuando llegan al intestino comienzan el proceso de desenquistamiento. De cada quiste surgen 8 trofozoítos uninucleados, los cuales se dividen rápidamente por fisión binaria ^[17]. La fase activa e invasiva del parásito es el trofozoíto, que a diferencia del quiste, es extremadamente sensible al medio ambiente externo y muere rápidamente por desecación. El trofozoíto tiene un diámetro promedio entre 20 a 40 μm , posee una gran actividad motora y un pleomorfismo característico por la forma ameboide. El trofozoíto es esencialmente anaerobio, aunque puede crecer en presencia de oxígeno.

Los trofozoítos dentro del intestino se adhieren a la mucosa intestinal y se alojan como comensales, sin producir daño al hospedero, se alimentan de bacterias y detritos celulares provenientes del intestino. Después de un tiempo, los trofozoítos se desprenden

de la mucosa, y en la luz del intestino grueso inician nuevamente el proceso de enquistamiento, el cual se caracteriza por la pérdida de movilidad de los trofozoítos, comienzan a tomar una forma esférica, se deshidratan y excretan parte de las reservas alimenticias presentes en las vacuolas digestivas, asumiendo la forma de prequiste. Posteriormente, secretan una pared quitica y forman pilas de ribosomas que forman los cuerpos cromidiales, transformándose en quistes uninucleados inmaduros, los cuales pasan por varias divisiones nucleares sucesivas originando quistes maduros tetranucleados. Estos serán expulsados al medio ambiente junto con las heces, cerrando así su ciclo de vida. Sin embargo, mediante mecanismos moleculares aún no bien caracterizados, los trofozoítos tienen la capacidad de penetrar la mucosa intestinal, invadir los vasos sanguíneos de los tejidos más próximos y diseminarse hacia los diferentes órganos del cuerpo provocando abscesos. Este proceso invasivo está determinado por la expresión de algunos genes de virulencia, los cuales bajo condiciones normales, o de cultivo en laboratorio, se expresan a bajos niveles.

2.1.3 Taxonomía y filogenia de *E. histolytica*.

Tradicionalmente, las relaciones filogenéticas entre los eucariontes han sido inferidas a partir de información morfológica. Desde hace mucho tiempo *E. histolytica* es considerado como un ejemplo clásico de un eucarionte primitivo, esto es debido a su aparente falta de estructuras celulares típicas de un eucarionte, tal como mitocondrias, peroxisomas, aparato de Golgi y retículo endoplásmico. La visión que se tenía de *E. histolytica* como un eucarionte primitivo amitocondriado se modificó con el descubrimiento de genes que codifican para proteínas mitocondriales, como son la chaperonina 60, Hsp 70 mitocondrial y PNT, y por la demostración de la existencia de mitosomas (organelos remanentes de mitocondrias) que han sido retenidos en este organismo ^[28].

El estudio de la filogenia del genero *Entamoeba* ha sido controversial e interesante debido al lugar que ocupa en la escala evolutiva. En los primeros estudios que se hicieron de filogenia molecular en *E. histolytica* se compararon secuencias codificantes de la subunidad pequeña del RNA ribosomal, debido a que se considera que estas secuencias nucleotídicas se encuentran en todos los organismos y a que han presentado una tasa de cambio muy lenta durante la evolución de las especies. Los resultados que arrojan estos estudios han colocado a *E. histolytica* dentro de los organismos amitocondriados, como una especie que divergió tempranamente de los primeros eucariontes ^[29, 30]. Otro estudio

de filogenia molecular que apoya esta idea es el reportado por Clark G. y cols., que se basa en el análisis de las secuencias de la proteína chaperonina CPN60 (una proteína de origen mitocondrial) y de GroEL (su homóloga en procariontes) ^[31]. Contrario a estos datos, Hasewaga y cols. reconstruyeron un árbol filogenético utilizando la secuencia de aminoácidos del factor EF-1 α (en procariontes EF-Tu), debido a su ocurrencia universal en todos los organismos vivos y a su lenta tasa evolutiva. Sus resultados mostraron que *E. histolytica* divergió de la línea principal hacia el tronco de los primeros eucariontes mitocondriados antes de que se separaran en varios reinos ^[30]. Esto sugiere que *E. histolytica* es una reliquia viviente de la fase temprana de la evolución de los eucariontes, que ocurrió antes de que la simbiosis de la promitocondria emergiera. Así mismo, se ha sugerido que *E. histolytica* pertenece a un linaje que, junto con otros flagelados, divergió muy temprano dentro de la evolución de los eucariontes, solamente es precedida por *Microsporidia*, *Trichomona* y *Giardia*.

En otro estudio, Bakker-Grunwald y Wostman analizaron la estructura, el metabolismo y organización del DNA y RNA, y sugirieron que *E. histolytica* al igual que *Giardia* es probablemente uno de los eucariontes más primitivos que existen, por lo que se le considera un protoeucarionte ^[32]. Clark G. y Diamond L., utilizaron *riboprints* y construyeron un árbol filogenético con la finalidad de comparar distancias genéticas para el género *Entamoeba*. Sus datos muestran que *E. histolytica* se encuentra más relacionada con *E. dispar* y *E. moshkovskii* que con *E. coli* y *E. invadens* ^[33].

2.2 El genoma de *E. histolytica*.

Uno de los primeros genomas de protistas en ser secuenciado fue el de *E. histolytica*, el proyecto inició en el año 2000 y en el 2005 Loftus y cols. publicaron el primer borrador del genoma completo de este microorganismo ^[34]. Para la secuenciación se utilizó el método de "Shotgun" y se empleó la cepa HM-1:IMSS debido a que la mayoría de los datos existentes hasta ese momento se derivaban de esta cepa. Su cultivo se estableció en 1967 a partir de una biopsia rectal de un hombre mexicano con disentería. Desde entonces, la cepa ha sido ampliamente empleada en todo el mundo para estudios de virulencia, inmunología, biología celular, bioquímica, genética, etc.

Se ha tratado de hacer una estimación del tamaño del genoma por diferentes métodos y ha sido complicado, debido a que presenta una alta heterogeneidad en su contenido

genómico. Sin embargo, se ha sugerido que el genoma de *E. histolytica* consta de 14 cromosomas que van de 0.3 a 2.2 millones de pares de bases. A diferencia de muchos eucariontes, las células de *E. histolytica* pueden duplicar su genoma varias veces antes de que la división celular ocurra, como consecuencia aproximadamente entre el 5-20% de los trofozoítos en cultivos axénicos (dependiendo de la fase de crecimiento) presentan más de un núcleo. Además, puede existir duplicación del DNA en ausencia de división nuclear, lo que provoca que un sólo núcleo pueda presentar un contenido genómico 1X a 10X, incluso más. Por otro lado, presenta un bajo contenido en GC (24.1%) y se estima que alrededor del 49.2% del DNA es codificante. Aparte de los cromosomas lineales *E. histolytica* presenta varias moléculas de DNA circular tipo plásmidos ^[35].

En el año 2010 Lorenzi y cols. reportaron un nuevo análisis del genoma de *E. histolytica*, con la finalidad de tener una idea más exacta de sus características ^[36]. Estimaron que está constituido por aproximadamente 20 millones de pares de bases, y presenta información para 8,201 genes que codifican proteínas, esto representa 2 veces más que *P. falciparum* y *S. cerevisiae*, pero muy cercano al del protista de vida libre *D. discoideum*. El número de genes en *E. histolytica* es relativamente grande cuando se compara con otros organismos parásitos, lo que refleja una relativa complejidad genética a pesar de la pérdida de ciertos genes a lo largo de su evolución. Esto último se hace más evidente cuando se analizan las reconstrucciones de las rutas metabólicas, que muestran un consistente patrón de pérdida de la capacidad sintética como consecuencia de su vida parasitaria en un ambiente rico en nutrientes ^[37]. Se ha estimado que la longitud promedio de los genes es sorprendentemente pequeño, de 1167 pb, cuando se compara con el promedio de las proteínas de *D. discoideum* y *P. falciparum*, y sólo el 25.2% presentan intrones (la mayoría presenta sólo un exón). En este mismo trabajo se reportó un análisis exhaustivo de las funciones de las proteínas de *E. histolytica*, donde se propusieron funciones para el 46% (3,788 proteínas) e identificaron 58 familias con cinco o más miembros que no presentan homología con proteínas conocidas, por lo que se sugiere que pueden ser específicas de *Entamoeba*.

2.3 Regulación de la expresión génica en *E. histolytica*.

Son pocos los factores que han sido clonados y caracterizados en *E. histolytica* y que forman parte de las maquinarias de transcripción y procesamiento del pre-mRNA. Ejemplo de estos son las proteínas URE3-BP, EhEBP1 y EhEBP2, las cuales regulan la expresión

de los genes *fdx1* y *hgl5* ^[38, 39] y una proteína tipo EhC/EBP que está involucrada en la activación del gen *EhPgp1* ^[40]. Además, EhTBP y EhP53 han sido caracterizados como los ortólogos de TBP y P53 de mamíferos, respectivamente ^[41]. La proteína de unión a la caja TATA de *E. histolytica* (EhTBP) fue el primer miembro de la maquinaria basal de transcripción en ser clonado y caracterizado ^[42]. Posteriormente, se identificó otro miembro de la familia TBP, denominado factor relacionado a TBP 1 (EhTRF1), el cual tiene la capacidad de unirse *in silico* a secuencias TATA ^[43]. Mediante análisis *in silico* del genoma de *E. histolytica* se ha identificado una familia grande de genes que codifican para proteínas tipo Myb, las cuales podrían estar involucradas en la regulación transcripcional de genes de virulencia o estrés, entre otros ^[44, 45].

Con la finalidad de entender cómo se regula la transcripción en *E. histolytica*, en el 2004 Ramakrishnan y cols. analizaron su genoma y examinaron si este parásito presenta secuencias que codifiquen factores conservados que lleven a cabo la acetilación y desacetilación de las histonas. Encontraron representantes de las principales familias de acetilasas de histonas GNAT y MYST, que les denominaron EhGCN5 y EhMYST, respectivamente; así como un representante de las deacetilasas de histonas (EhHDAC). Dichos factores podrían ser reclutados en sitios específicos de la cromatina y promover la acetilación y desacetilación de las histonas, regulando de ésta manera la expresión global de genes en este parásito ^[46]. Fisher y cols. en el 2004 identificaron y caracterizaron un gen que codifica para una DNA metiltransferasa (Ehmeth), la cual proponen que podría estar modificando epigenéticamente el DNA, afectando la transcripción de genes específicos y la conformación de la cromatina ^[47].

El núcleo del promotor de *E. histolytica* presenta una estructura tripartita, que consiste de los elementos conservados TATA, GAAC e INR ^[48]. La RNA pol II de *E. histolytica* es α -amanitina resistente y su CTD carece de los repetidos del heptapéptido (característicos en RNA pol II de mamíferos), sin embargo, presenta una secuencia rica en prolinas y serinas (40%) y es altamente fosforilado (en 24 serinas, 6 treoninas y 3 tirosinas) ^[49]. A la fecha, se han identificado en *E. histolytica* 10 subunidades de la RNA pol II ^[37]; 6 de las 14 subunidades evolutivamente conservadas de TFIID en eucariontes; y homólogos de algunos otros factores generales de la transcripción como son TFIIIE, TFIIF y TFIIH.

E. histolytica presenta regiones 5'-UTRs cortas, susceptibles a ser modificadas por la maquinaria de "capping". Se han identificado homólogos de la enzima RNA guanilil

transferasa (enzima que adiciona el *cap*) y de la metilasa del *cap*. Se ha propuesto que dichas enzimas interactúan con el CTD fosforilado de la RNA pol II en este organismo. Así mismo, se han identificado homólogos para aproximadamente el 80% de factores que participan en la maquinaria de *splicing* de *S. cerevisiae* [37].

En el 2005 nuestro grupo de trabajo reportó las secuencias y factores hipotéticos que podrían participar en el procesamiento del extremo 3' UTR del pre-mRNA de *E. histolytica* [50]. A diferencia del humano y levadura que presentan 3 secuencias importantes representadas por la señal de poliadenilación, que generalmente es el hexanucleótido AAUAAA, el elemento rico en U/GU río-abajo de la señal de poliadenilación y el sitio de corte endonucleotídico constituido por el dinucleótido CA, en *E. histolytica* se encontraron 2 regiones ricas en U, una localizada entre el nucleótido 1-30 río arriba del sitio de poliadenilación y otro entre los nt 3-30 río abajo del sitio de poliadenilación; un motivo rico en U similar al de mamíferos y levadura. Notablemente la señal de poliadenilación UA(A/U)UUU y el sitio de corte no presentan una secuencia consenso similar a la de humano y levadura. En este mismo trabajo, se reportaron 16 factores hipotéticos del procesamiento del 3' UTR del pre-mRNA altamente conservados en *E. histolytica*, con alta similitud e identidad a los de humano y levadura. Así mismo, se observó que *E. histolytica* contiene algunos factores homólogos a humano, pero no con levadura, y viceversa, lo que permitió sugerir que la maquinaria del procesamiento del 3' UTR de *E. histolytica* podía representar un estado evolutivo intermedio entre las maquinarias de estos otros dos organismos. También, recientemente se ha caracterizado la proteína poli(A) polimerasa EhPAP de *E. histolytica* [51], y el factor de corte de 25 kDa EhCFIm25 [52,53].

3. ANTECEDENTES PARTICULARES DEL PROYECTO

3.1 La proteína EhPC4 de *Entamoeba histolytica*.

En el 2005, nuestro grupo de trabajo reportó la identificación de un posible gen homólogo de *pc4* de humano, que presenta un alto grado de similitud e identidad (65 y 61%, respectivamente), el cual denominamos *Ehpc4*, y a partir de entonces hemos trabajado en su caracterización.

Mediante análisis *in silico* previamente determinamos que el genoma de *E. histolytica* contiene un sólo gen *Ehpc4*, sin intrones, y está constituido por 453 pares de bases. La proteína presenta dominios funcionales y estructurales que son característicos de PC4 humana. El programa MOTIF SCAN identifica una región rica en lisina (K) y ácido glutámico (E) en la región amino terminal de EhPC4, que comprende del residuo 8 al 80. El programa InterPro-Scan predice un dominio PC4 ubicado en el extremo C-terminal, que a su vez comprende 2 dominios funcionales: uno de unión a DNA de cadena sencilla (que va del residuo 88 al 133) y otro de dimerización (que comprende del residuo de aminoácido 133 al 151) (Figura 3). Así mismo, MOTIF SCAN predice que *EhPC4* presenta alrededor de 19 sitios posibles de reconocimiento para CKII, principalmente en residuos de ácido glutámico (E) y serina (S); 12 posibles sitios de reconocimiento para PKC, principalmente en residuos de ácido aspártico (D), lisina (K) y serina (S); y 9 sitios de reconocimiento para la tirosina cinasa entre los residuos de aminoácidos 82 y 90.

El gen *Ehpc4* fue clonado en el vector pRSET-A para generar una proteína recombinante acoplada a una etiqueta de 6 histidinas (rEhPC4-6xHis). La proteína recombinante fue utilizada para generar anticuerpos policlonales en conejo, los cuales reconocen una proteína de un peso molecular aproximado de 18 kDa (151 aminoácidos) en extractos totales de trofozoítos de *E. histolytica*. Así mismo, iniciamos con los primeros análisis de interacción con el DNA, los resultados sugerían que EhPC4 era una proteína de unión al DNA. Por lo que en este trabajo hemos decidido continuar con su caracterización.

Por otra parte, Santi-Rocca y cols. en el 2008 reportaron que los genes *Ehpc4* y *EhCstF-64* de *E. histolytica* incrementaban su expresión de manera significativa en los trofozoítos virulentos, en comparación con trofozoítos no virulentos ^[54]. Esto es interesante, ya que EhPC4, como posible factor de transcripción y poliadenilación, podría estar regulando la expresión de genes en *E. histolytica*, incluyendo aquellos que participan en virulencia. Un dato que apoya esta hipótesis es la detección de la expresión del gen *Ehpc4*, a nivel de mRNA en trofozoítos de la clona A virulenta, no así en trofozoítos de la clona L6 no virulenta. Sin embargo, hasta este trabajo, no se había reportado alguna función de la proteína EhPC4 en la regulación de la expresión de genes de *E. histolytica* y su posible relación con la virulencia del parásito.

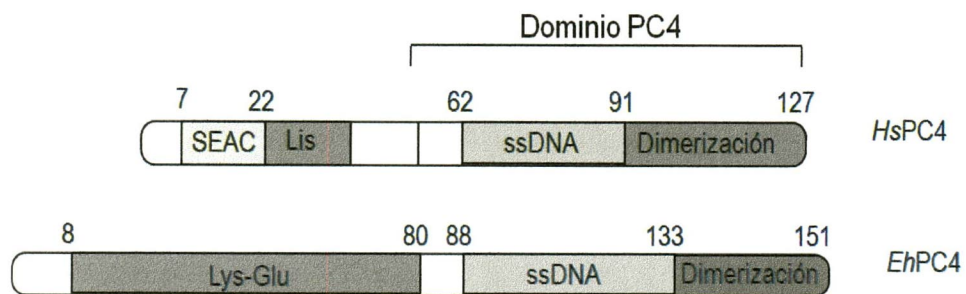


Figura 3. Comparación de las características de la secuencia primaria de *HsPC4* (*Homo sapiens*) y *EhPC4* (*E. histolytica*).

4. JUSTIFICACIÓN

El parásito humano *E. histolytica* infecta alrededor de 50 millones de personas en todo el mundo, provocando entre 40,000-100,000 muertes anualmente. En México, la amibiasis es una enfermedad endémica considerada como un serio problema de salud pública. Se estima que el 20% de la población mexicana total es portadora, de los cuales el 2% presentan síntomas de la enfermedad y entre el 0.1-0.2% de los enfermos muere. Esto equivale a 16 millones de portadores, 1.3 millones de enfermos sintomáticos y entre 10 a 20 mil muertes anuales.

Aunque la regulación transcripcional y post-transcripcional son puntos clave para modular la expresión de genes, incluyendo los de virulencia, y consecuentemente el potencial patogénico del parásito, los factores y mecanismos moleculares involucrados en estos procesos permanecen poco entendidos. A la fecha sólo unos pocos factores han sido caracterizados en *E. histolytica*. La identificación de nuevas proteínas involucradas en estos procesos celulares, como podría ser EhPC4, permite tener nuevos candidatos moleculares que sean blancos terapéuticos y permitan disminuir la sobrevivencia y la proliferación de *E. histolytica* dentro del huésped.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

Analizar la actividad de unión al DNA y la localización celular de la proteína EhPC4, así como evaluar el efecto de su sobreexpresión sobre el proteoma y transcriptoma de *E. histolytica*.

5.2 Objetivos específicos

- 1.- Analizar la actividad de unión al DNA de la proteína EhPC4.
- 2.- Identificar los residuos de aminoácidos implicados en la interacción de la proteína EhPC4 con el DNA.
- 3.- Determinar la localización celular de la proteína EhPC4.
- 4.- Analizar el efecto de la sobreexpresión de EhPC4 sobre el proteoma de *E. histolytica*.
- 5.- Evaluar el efecto de la sobreexpresión de EhPC4 sobre el transcriptoma de *E. histolytica*.
- 6.- Identificar los procesos y rutas biológicas afectadas por la sobreexpresión de EhPC4 en trofozoítos de *E. histolytica*.

6. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

Para cumplir con los objetivos planteados en este trabajo, seguimos la estrategia experimental que se presenta en la Figura 4.

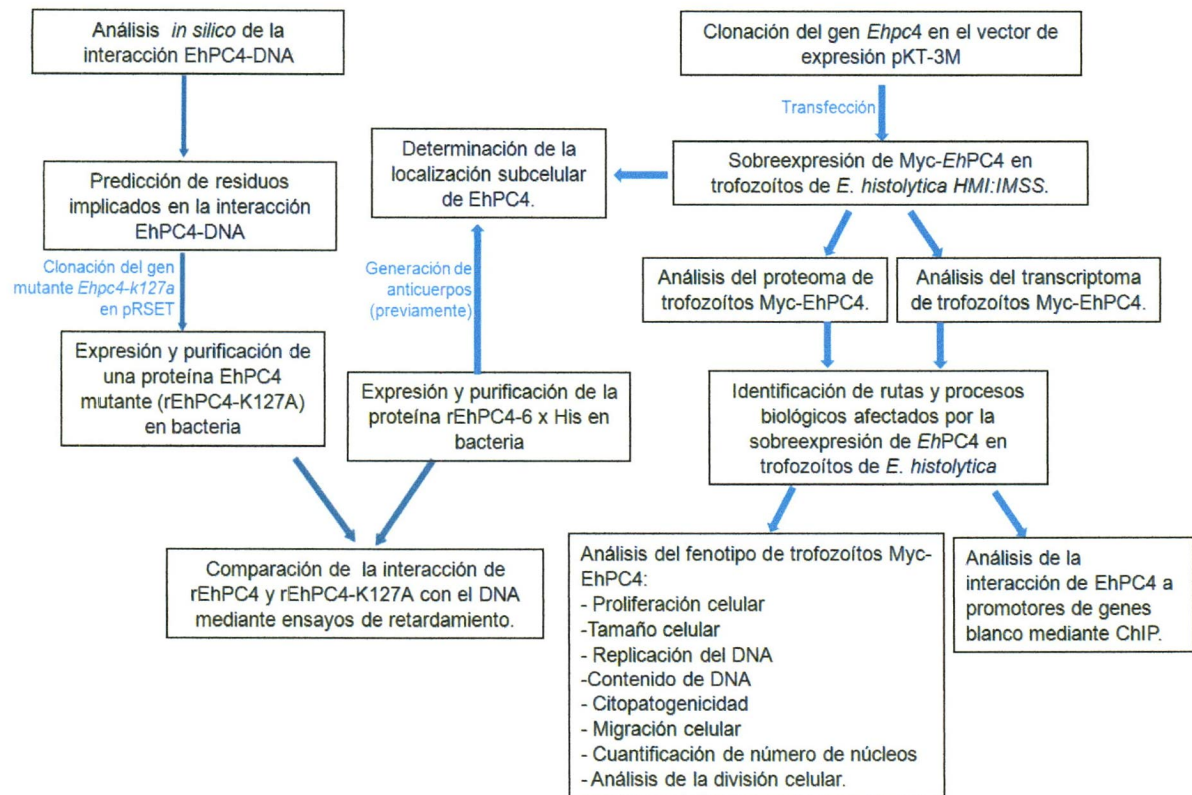


Figura 4. Estrategia experimental. Análisis de la interacción de EhPC4 con el DNA y efecto de la sobreexpresión de EhPC4 en el proteoma, transcriptoma y fenotipo de *E. histolytica*.

7. MATERIALES Y MÉTODOS

7.1 Análisis bioinformáticos.

Los ortólogos de EhPC4 fueron identificados mediante BLAST en la base de datos de NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), usando su secuencia completa de aminoácidos, la cual fue obtenida de la base de datos de UNIPROT (número de acceso UNIPROT: C4M1H2). Los alineamientos pareados y múltiples de las secuencias, para identificar residuos conservados, fueron realizados con el programa ClustalW2 en la página del EMBL-EBI (<https://www.ebi.ac.uk/>) y representados con el programa WebLogo (<http://weblogo.berkeley.edu>). La inferencia filogenética se obtuvo por el método de Neighbor-Joining empleando el programa MEGA versión 5.0 (<http://www.megasoftware.net/>); La robustez de la inferencia del árbol se determinó mediante análisis "bootstrap" con 1000 réplicas. Los dominios funcionales y motivos estructurales para la proteína EhPC4, EhNUDC y la proteína de unión a actina de 16 kDa fueron predichos por el programa Motif Scan en el servidor MyHits (<http://myhits.isb-sib.ch/>). El modelo tridimensional de EhPC4 fue deducido por homología, usando como templado la estructura previamente resuelta de PC4-CTD de humano (número de acceso PDB: 1PCF), con el uso programa Phyre y analizada con el visualizador VMD (<http://www.ks.uiuc.edu/Research/vmd/>). El modelaje molecular del complejo ternario que comprende el dímero CTD-EhPC4 en complejo con un oligonucleótido de 19 bases (dT₍₁₈₎G) fue generado por homología, usando como templado la estructura PDB:2C62 y empleando el programa MOE (<https://www.chemcomp.com/>). El residuo de aminoácido candidato para mutagénesis de EhPC4 fue seleccionado de acuerdo a los siguientes criterios: que estuviera localizado dentro del dominio de unión al DNA, ser altamente conservado y que fuera predicho como relevante para la interacción DNA-proteína en el modelo molecular del complejo ternario.

7.2 Cultivos celulares.

Los trofozoítos de *E. histolytica* cepa HMI:IMSS fueron crecidos en condiciones axénicas a 37° C, en medio TYI-S-33 complementado con suero bovino al 15% (Microlabs), 3% de una mezcla de vitaminas Diamond, y los antibióticos ampicilina (0.3 U/ml) y estreptomycin (0.25 mg/ml). Las células de adenocarcinoma de colon humano

SW480 fueron cultivadas a 37° C, en 5% CO₂ y medio DMEM suplementado con 10% de suero fetal bovino, penicilina y estreptomicina (100 U/ml).

7.3 Obtención de DNA genómico de *E. histolytica*.

El DNA genómico se obtuvo a partir de trofozoítos de *E. histolytica* clona HMI:IMSS, empleando el "kit Wizard Genomic DNA purification" (Promega) y siguiendo el protocolo recomendado por el fabricante para aislamiento de DNA genómico de cultivos de tejidos y tejidos animales. Brevemente, se obtuvo una pastilla de 6.0×10^6 células y posteriormente se resuspendieron en 1200 µl de una solución de lisis (*Nuclei Lysis Solution*). La suspensión se distribuyó en 2 tubos de microcentrífuga de 1.5 ml (800 µl en cada uno), a cada tubo se le adicionaron 200 µl de una solución para precipitación de proteínas (*Protein Precipitation Solution*) y se incubaron durante 5 min en hielo. Los tubos se centrifugaron a 4°C durante 4 min a 13,000 rpm. El sobrenadante se recuperó en tubos de microcentrífuga nuevos y se les adicionaron 600 µl de isopropanol al 100%, mezclando por inversión suave de los tubos. Nuevamente, se centrifugaron los tubos a temperatura ambiente durante 5 min a 13000 rpm, se desechó el sobrenadante y se dejó secar la pastilla de DNA a temperatura ambiente durante 15 min. Finalmente, la pastilla fue resuspendida en 30 µl de agua grado biología molecular (Sigma) y se hicieron alícuotas que fueron almacenadas a -20°C hasta su uso. La cuantificación del DNA purificado se realizó por espectrofotometría. Para esto, hicimos una dilución del DNA 1:500 en agua estéril y se midió la absorbancia a 260 y 280 nm (A_{260/280} nm). Ya que existe una relación lineal entre el coeficiente de absorción y la concentración de DNA (1 D.O = 50 µg de DNA plasmídico) en solución, la concentración del plásmido se estimó de acuerdo a la siguiente ecuación: [DNA µg/ml] = (A_{260/280} nm) (50) (factor de dilución).

7.4 Construcción de plásmidos.

La secuencia completa del gen *Ehpc4* (número de acceso NCBI: EHI_192520) de 456 pares de bases fue amplificada por PCR a partir de DNA genómico de *E. histolytica* HMI:IMSS, empleando los oligonucleótidos *Ehpc4*-sense (5'-CCC GGA TCC ATG TCA GAT AAA AAA CCT-3') y *Ehpc4*-antisense (5'-CCC AAG CTT TGC TTA TTT AAT CCA CTT-3'), los cuales contienen los sitios de restricción para las enzimas *Bam*HI y *Hind*III, respectivamente (secuencia subrayada). El gen *Ehpc4* fue clonado previamente entre los

sitios de restricción *Bam*HI y *Hind*III, río abajo de una secuencia que codifica una etiqueta de 6xHis, en el plásmido pRSET-A (invitrogen), generando así el plásmido pRSET-*Ehpc4*.

Una vez seleccionado el residuo candidato a mutación, el gen *Ehpc4*-k127a mutante fue obtenido por PCR empleando los oligonucleótidos *Ehpc4*-sense y un megaoligonucleótido K₁₂₇A₉₅-antisense (5'-CCC AAG CTT TGC TTA TTT AAT CCA CTT CTT AAT TTT GTC TAT GTT GTT AAC AAG TTC TTC AAA CTC ATA GTC TTT TAA TGA AAT TCC **CGC** TTG TC-3'), que contienen el sitio de restricción para la enzima *Hind*III (secuencia subrayada) y un cambio de codón (en negritas), el cual nos permite introducir la sustitución del triplete que codifica el aminoácido lisina (K) por el de alanina (A), en la posición 127 de la proteína EhPC4. Una vez que se amplificó el gen *Ehpc4*-k127a, fue clonado entre los sitios de restricción *Bam*HI y *Hind*III del plásmido pRSET-A (invitrogen), generando el plásmido pRSET-*Ehpc4*-k127a.

Las secuencias completas de los genes *Ehpc4* y *Ehnudc* (número de acceso NCBI: EHI_023890) fueron clonados de manera independiente entre los sitios de restricción *Sma*I y *Xho*I del plásmido pKT-3M^[56].

La secuencia completa del gen EhABP16 (EHI_186840) fue introducida entre los sitios de restricción *Hind*III y *Xho*I del plásmido pL4440 (Adgene).

Antes de su uso, todas las construcciones fueron analizadas por PCR y con enzimas de restricción, y finalmente, secuenciadas empleando el kit ABI Prism BigDye Terminator, v2.0 y el secuenciador de DNA automático 31300 Genetic Analyzer (Applied Biosystem). La secuenciación se realizó por el método enzimático de Sanger y se llevó a cabo en presencia de 300-600 ng de plásmido, 10 picomoles de un oligonucleótido específico (en sentido o antisentido) y una mezcla del kit que contiene la enzima AmpliTaq DNA polimerasa y MgCl₂. Los resultados fueron generados y desplegados gráficamente por el programa Sequencing Analysis 5.2 (Applied Biosystem) y se procedió a analizarlos.

7.5 Amplificación y purificación de plásmidos.

Para la obtención de DNA plasmídico de células transformadas se siguió la técnica descrita por Sambrook y cols., en 1989^[57]. Las clonas seleccionadas después de la transformación se sembraron por separado en 5 ml de medio LB con 50 µg/ml de

ampicilina y se crecieron hasta la saturación del cultivo, durante toda la noche a 37°C y 200 rpm. Al siguiente día, se tomaron 1.5 ml de cada cultivo y se colocaron en un tubo de microcentrifuga, se empastillaron las células centrifugándolas a 4°C durante 5 min a 5000 rpm. Se desechó el sobrenadante y las pastillas se dejaron secar a temperatura ambiente durante 15 min, después se resuspendieron en 100 µl de la solución I fría (glucosa 50 mM, Tris HCl 25 mM pH 8, EDTA 10 mM pH 8) y se incubaron durante 5 min a temperatura ambiente. Posteriormente, se agregó a cada tubo 200 µl de solución II (NaOH 0.2 N, SDS 1%) y se mezclaron por inversión suave, después se incubaron en hielo por 5 min. Se agregaron 150 µl de solución III (acetato de potasio 5 M) mezclando suavemente por inversión de los tubos y se incubaron durante 5 min en hielo. La muestra fue centrifugada a 4°C durante 10 min a 8500 rpm para empastillar los restos celulares y el DNA genómico. Los sobrenadantes se recuperaron en tubos nuevos de microcentrifuga, se les adicionó a cada uno 800 µl de etanol frío al 100% y se incubaron 5 min a temperatura ambiente para precipitar los ácidos nucleicos. La mezcla se centrifugó nuevamente durante 10 min a temperatura ambiente para precipitar el DNA plasmídico. Se decantó el sobrenadante y la pastilla se dejó secar a temperatura ambiente durante 15 min para evaporar todo el etanol. Finalmente, la pastilla se resuspendió en 30 µl de agua desionizada estéril.

7.6 Obtención de bacterias ultracompetentes por el método de cloruro de rubidio.

Se seleccionó una colonia de células *E. coli* (de la cepa de interés) y fue inoculada en 2 ml de medio LB líquido y crecida hasta su saturación durante toda la noche a 37°C y 200 rpm. Al día siguiente, se tomaron 100 µl de este precultivo y se inocularon 50 ml de medio SOB líquido. Las bacterias se crecieron a 37°C y 230 rpm hasta que el cultivo alcanzó una densidad óptica (D.O.) entre 0.4-0.6 a A595 nm. Las células se cosecharon en un tubo cónico y se centrifugaron a 4°C durante 3 min a 5000 rpm, se desechó el sobrenadante y la pastilla celular se resuspendió en 16 ml de la solución RF1 estéril (0.6 g de RbCl, 0.5 g de MnCl₂·4H₂O, 0.147 g de acetato de potasio, 0.0937 g de CaCl₂·2H₂O, 5.95 ml de glicerol y agua cbp 50 ml). La mezcla se incubó durante 15 min en hielo. Nuevamente se centrifugó a 4°C durante 3 min a 5000 rpm, se desechó el sobrenadante y la pastilla celular se resuspendió en 4 ml de la solución RF2 estéril (1 ml de MOPS 0.5M, 0.6 g de RbCl, 0.55 g de CaCl₂·2H₂O, 5.95 ml de glicerol y agua cbp 50ml). Se incubó

durante 10 min en hielo y posteriormente se prosiguió a hacer alícuotas. Las células competentes se almacenan a -80°C hasta su uso.

7.7 Transformación de bacterias.

La transformación de células competentes de *E. coli* se realizó mediante la técnica de choque térmico. Para esto, en tubos de microcentrífuga de 1.5 ml se mezclaron 50 μl de células competentes *E. coli* y el DNA de interés. Los tubos se incubaron durante 30 min en hielo. Luego las células fueron sometidas a un choque térmico de 42°C durante 90 s e inmediatamente se incubaron en hielo durante 3 min. Después se le adicionó a cada tubo 200 μl de medio LB líquido estéril. Las células se incubaron a 37°C durante 45 min, a 200 rpm, para permitir la recuperación de las células sometidas a choque y la expresión del fenotipo resistente a ampicilina que se manifiesta en las células que han adquirido el plásmido. Toda la mezcla se espatuló en placas con medio sólido LB con ampicilina (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$) para seleccionar a las transformantes resistentes y se incubaron toda la noche a 37°C . Al día siguiente se observa la selección de las clonas resistentes que han adquirido el plásmido.

7.8 Expresión y purificación de las proteínas recombinantes.

Los plásmidos pRSET-*Ehpc4* y pRSET-*Ehpc4-k127a* fueron introducidos de manera independiente en células *E. coli* BL21(DE3)pLySs. Las células transformadas fueron crecidas a 37°C en medio LB con ampicilina (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) y cloranfenicol (35 $\mu\text{g}/\text{ml}$) hasta una densidad óptica entre 0.4-0.6. La inducción de la expresión de las proteínas recombinantes rEhPC4 y rEhPC4-K127A se realizó con la adición del inductor IPTG a una concentración final de 1 mM, durante 3 horas a 37°C y en agitación de 200 rpm. Posteriormente se analizó la expresión de las proteínas recombinantes en SDS-PAGE al 15% teñidos con azul de Coomassie. La verificación de la expresión de las proteínas se realizó mediante western blot con el uso de anticuerpos dirigidos contra la etiqueta de histidina (Santa Cruz Biotechnology) a una dilución 1:2000 y un anti-conejo HRP (Jackson ImmunoResearch) a una dilución 1:8000. La membrana fue revelada con el sistema Amersham ECLTM (GE Healthcare). Para determinar la solubilidad de las proteínas, 10 ml de células inducidas durante 3 h fueron resuspendidas en 5 ml de amortiguador de lisis (NaH_2PO_4 50 mM, NaCl 300 mM e imidazol 10 mM, pH 8.0), lisadas en hielo por sonicación (7 pulsos de 10 segundos con pausas de 10 segundos, y una amplitud del

75%). El lisado fue centrifugado 45 min a 10,000 x g y a 4°C. Para determinar en que fracción se encontraban las proteínas de interés, las proteínas del sobrenadante (fracción soluble) y de la pastilla (fracción insoluble) fueron separadas en un gel de poliacrilamida desnaturante al 12%, y analizadas por western blot con un anticuerpo anti-histidinas, de la misma manera en cómo se describió previamente. Las proteínas recombinantes rEhPC4 y rEhPC4K127A fueron purificadas por afinidad bajo condiciones nativas, empleando una columna cromatográfica de níquel con sefarsa High Performance His trap TM (GE Healthcare) y un gradiente de imidazol. Las proteínas puras se cuantificaron y su pureza se analizó mediante SDS-PAGE al 15%. Finalmente, se corroboró su identidad por western blot empleando anticuerpos α -histidina.

7.9 Ensayos de retardamiento de la movilidad electroforética.

Los ensayos de retardamiento fueron realizados empleando como sonda un fragmento de promotor de 174 pares de bases que corresponde al gen *Ehadh112* (posición -151 a +24) ^[58]. La amplificación de la sonda se realizó a partir de la construcción p400CAT-*Ehadh112* (proporcionado por la Dra. Elisa Azuara, UACM), la cual tiene clonado un fragmento de 400 pb del promotor del gen *Ehadh112*, que a su vez contiene al fragmento de 174 que nos interesa. Para la amplificación se emplearon los oligonucleótidos específicos en sentido (Adh S-151: 5'-AAA ACT GCA GTT TAT TTT TAT GAT TTG ATT G -3') y antisentido (Adh AS-30: 5' -CCC AAG CTT TTC AGG AAT GAA TTG TCT ATT CAT CT -3'). Las condiciones de PCR fueron las siguientes: un ciclo de desnaturalización del DNA durante 5 min a 94°C, posteriormente, 25 ciclos que comprenden 30 s a 94°C para desnaturalizar; 30 s a 50°C de alineamiento; y 35 s a 72°C de extensión. Finalmente, a un ciclo adicional de extensión de 7 min a 72°C. Los productos de PCR fueron resueltos en un gel de agarosa al 1% en amortiguador TAE 1X. Las bandas correspondientes al fragmento de 174 pb fueron cortadas y purificadas con "QIAquick Gel Extraction Kit" de QUIAGEN. Después de la purificación el fragmento de DNA se cuantificó por espectrofotometría.

El fragmento de DNA fue marcado con biotina empleando el kit *Biotin 3' End DNA Labeling* (Thermo Scientific Pierce), siguiendo las instrucciones del fabricante. La sonda marcada fue purificada con una mezcla de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1), y después se analizó la eficiencia de marcaje mediante Dot blot.

La sonda marcada fue incubada durante 15 min a 4°C en presencia de diferentes concentraciones (1, 0.5, 0.25 y 0.12 µg/reacción) de la proteína rEhPC4 o rEhPC4-K127A, en un amortiguador de unión (Hepes 12 mM pH 7.9, KCl 60 mM, glicerol al 10% (v/v), Tris-HCl 4 mM pH 7.8, DTT 1 mM, EDTA 1 mM, MgCl₂ 4 mM y espermidina 4 mM) ^[59]. Para las reacciones de super-retardamiento se adicionó 1 µg del anticuerpo α-EhPC4. Los complejos DNA-proteína fueron resueltos en un gel de poliacrilamida no desnaturizante al 6%, en amortiguador TBE 0.5 X. Posteriormente se transfirieron a una membrana de nailon (*HybondTM-N+*, GE Healthcare) y se revelaron usando el kit *Chemiluminescent Nucleic Acid detection module™* (Thermo Scientific Pierce).

7.10 Extracción, cuantificación y análisis de la calidad de los extractos proteicos totales, nucleares y citoplásmicos de *E. histolytica*.

Para la obtención de extractos totales, los trofozoítos de *E. histolytica* fueron crecidos en cajas con medio TYI-S-33 y cosechados en fase exponencial. Se lavaron con PBS 1X frío dos veces y fueron contados en el último lavado con una cámara de Neubauer. La pastilla de células se escurrió perfectamente para eliminar el exceso de PBS 1X y se resuspendió en un amortiguador de lisis (pHMB 100 mM disuelto en Tris 100 mM) e inhibidores de proteasas (Complete-Roche). Para resuspender la pastilla se utilizó 1 ml de amortiguador de lisis y 30 µl de inhibidor de proteasas 4X por cada 15 millones de células. Inmediatamente, se incubaron en hielo seco durante 10 minutos. Se sacaron las muestras del hielo seco y se agitaron vigorosamente hasta que se descongelaron. Los dos últimos pasos se repitieron tres veces consecutivas. Se hicieron alícuotas de los extractos y se almacenaron a -70°C hasta su uso. Se tomó una alícuota para cuantificar por el método de Bradford y analizar su integridad por SDS-PAGE.

La obtención de extractos nucleares y citoplásmicos de *E. histolytica* se realizó por el método descrito por Schreiber y cols ^[55]. Los trofozoítos de *E. histolytica* fueron crecidos en cajas de 25 cm² con medio TYI-S-33 y cosechados en fase exponencial. Se lavaron dos veces con PBS 1X pH 6.8 frío. La pastilla celular se resuspendió en 400 µl de amortiguador A (Hepes 10 mM pH 7.9, KCl 10 mM, EDTA 0.1 mM, EGTA 0.1 mM, DTT 1.0 mM, PMSF 0.5 mM) y se incubó en hielo por 15 minutos. Durante este tiempo se observaron las células bajo el microscopio para verificar que estuvieran turgentes. Pasado este tiempo, se adicionaron a la mezcla 25 µl de NP-40 al 10% y 20 µl de inhibidores de proteasas Complete-Roche 4X y se agitaron vigorosamente durante 10 s. Se verificó

nuevamente bajo el microscopio que las células estuvieran reventadas. Se centrifugó la muestra durante 1 min a 14,000 rpm y el sobrenadante, que corresponde a las proteínas citoplasmáticas, se almacenó a -70°C hasta su uso. La pastilla de núcleos se resuspendió en 50 μl de amortiguador C frío (Hepes 20 mM pH 7.0, NaCl 400 mM, EDTA 1 mM, EGTA 1 mM, DTT 1 mM, PMSF 1 mM) y 50 μl de la mezcla de inhibidores de proteasas. El tubo se agitó vigorosamente durante 15 min a 4°C y posteriormente, se centrifugó durante 1 min a 14,000 rpm a 4°C . El sobrenadante que corresponde a las proteínas nucleares se recuperó y se almacenó a -70°C hasta su uso. Se tomó una alícuota de cada fracción para cuantificar por el método de Bradford y analizar su integridad por SDS-PAGE.

7.11 Cuantificación de proteínas por el método de Bradford.

Para determinar la cantidad de proteína en una muestra se siguió el método de Bradford. Primero, se realizó una curva patrón con una proteína de concentración conocida. Para esto, en tubos de microcentrífuga de 1.5 ml se colocaron por separado 0, 2.5, 5, 7.5, 10 y 15 μg de BSA, a cada tubo se le agregó la cantidad necesaria de NaCl 0.15 M para obtener un volumen final de 100 μl y 1 ml del reactivo azul de Coomassie en solución. Los tubos fueron agitados vigorosamente durante 15 s e incubados 2 min a temperatura ambiente. Posteriormente, se determinó la absorbancia de las muestras en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 595 nm ($A_{595\text{ nm}}$). Para estimar la concentración de proteína en una muestra dada, se tomaron de 2 μl de la muestra, se mezclaron con 98 μl de NaCl 0.15 M y 1 ml del reactivo azul de Coomassie, y se midió la $A_{595\text{ nm}}$. Los valores de absorbancia fueron comparados y extrapolados con los de la curva patrón de BSA para calcular la concentración de proteína total en la muestra original.

Para examinar de manera global los datos obtenidos de los experimentos de microarreglos e interpretarlos biológicamente, la lista de los genes diferencialmente expresados fue introducida y analizada de manera automática con las herramientas del programa KEGG (http://www.genome.jp/kegg/tool/map_pathway1.html), para identificar las rutas biológicas en las cuales participan. Para predecir *in silico* redes de asociación entre los productos de los genes, la lista de genes diferencialmente expresados se analizó con el programa STRING (<http://string-db.org/>).

7.12 Inmunolocalización de EhPC4, 3-Myc EhPC4 y 3-Myc EhNUDC en *E. histolytica*.

Para la inmunolocalización de EhPC4 mediante western blot utilizamos 50 µg de proteínas totales, nucleares o citoplásmicas las cuales fueron resueltas en SDS-PAGE al 15%, posteriormente electrotransferidos a membranas de nitrocelulosa de 0.2 µM (BIO-RAD). La proteína endógena EhPC4 y la ectópicamente expresada Myc-EhPC4 fueron detectadas usando el anticuerpo α-EhPC4 a una dilución 1:2000 y el anticuerpo secundario anti-conejo HRP (Jackson Immunoresearch) a una dilución 1:8000. Las proteínas Myc-EhPC4 y Myc-EhNUDC fueron detectadas utilizando el anticuerpo primario anti-Myc (Cell Signaling) a una dilución 1:2000 y un anti-ratón HRP 1:5000. Las proteínas fueron reveladas usando el reactivo Amersham ECL™ (GE Healthcare).

Para la inmunolocalización de EhPC4 mediante inmunofluorescencia y microscopía confocal, los trofozoítos cultivados sobre cubreobjetos fueron fijados al vidrio con paraformaldehído al 4% durante 1 h a 37°C. Se lavaron 3 veces con PBS 1X pH 6.8 y se permeabilizaron con acetona al 100% durante 10-15 s. El bloqueo se realizó con suero fetal bovino (SFB) al 1% durante 1 h a 37°C. La inmunotinción se realizó con α-EhPC4 de conejo (dilución 1:200 en PBS 1X-SFB 1%) o α-Myc de ratón (dilución 1:200 en PBS 1X-SFB 1%) durante 2 horas a temperatura ambiente, seguidos de un anti-conejo FITC (Jackson ImmunoResearch) o anti-ratón Alexa 546 (Invitrogene) durante 1 h a 37°C. El DNA nuclear se tiñó con 2.5 µg/ml de DAPI (Invitrogen) durante 1 min. Las imágenes fueron adquiridas con un microscopio invertido acoplado a un sistema de escaneo laser confocal (TCS SP2, Leica Microsystems) y analizadas con el programa Image J.

7.13 Coinmunolocalización de EhPC4 con laminina B1

Para la coinmunolocalización, los trofozoítos fueron fijados a cubreobjetos, permeabilizados con acetona y bloqueados con SFB, tal como se describe previamente. La inmunolocalización se realizó de manera simultánea, incubando las células con α-EhPC4 de conejo a una dilución 1:100 y α-laminina B1 de ratón (ab16048, Abcam) a una dilución 1:100, toda la noche a 4°C. Posteriormente las células se incubaron durante 1 h con una mezcla de anticuerpos secundarios, anti-conejo Alexa 687 (Invitrogen) y anti-ratón Alexa 488 (Invitrogen) diluidos 1:200. El DNA nuclear se tiñó con DAPI. Las imágenes fueron obtenidas con un microscopio invertido acoplado a un sistema de escaneo laser confocal (TCS SP2, Leica Microsystems) y analizadas con el programa

WCIF Image J. El fondo fue corregido utilizando la función “*Background subtraction*”. Se calculó el coeficiente de correlación de Pearson y el coeficiente de solapamiento de Mander con la función “*Intensity Correlation Analysis*”. Estos análisis fueron realizados con 10 imágenes de microscopía confocal elegidas al azar.

7.14 Transfección de trofozoítos de *E. histolytica*.

Los trofozoítos de *E. histolytica* clona HMI:IMSS fueron transfectados mediante electroporación [60]. Los trofozoítos fueron crecidos en cajas con medio TYI-S-33 hasta que formaron una monocapa del 80-90% de confluencia. 1.0×10^7 trofozoítos de *E. histolytica* fueron cosechados y lavados 2 veces con PBS 1X pH 6.8 frío, y una vez con citomix incompleto frío (KCl 120 mM, CaCl₂ 0.15 mM, K₂HPO₄/KH₂PO₄ 10 mM pH 7.6, Hepes 25 mM pH 7.6, EGTA 2 mM pH 7.6 y MgCl 5 mM). Las células se centrifugaron durante 5 min a 1000 rpm y se decantó el sobrenadante. Posteriormente se resuspendieron en 0.8 ml de citomix completo (complementado con ATP y glutatión reducido) y se mezclaron en una celda de electroporación junto con 100 ug del plásmido de interés (pKT-3M *Ehpc4*, pKT-3M-*EhNudC* o pKT-3M). La celda se colocó en un sistema de electroporación *Gene Pulser Xcell* (BIO-RAD) y se aplicaron dos descargas exponenciales de 1200 V/cm cada uno y una capacitancia de 25 µF. Inmediatamente, las células se inocularon en un frasco de cultivo chico (25 cm²) lleno con medio TYI-S-33 completo y sin antibiótico. El frasco se incubó a 37°C y a las 48 h post-transfección se adicionaron 2.5 ug de G418 por ml de medio para la selección de las transfectantes. Durante aproximadamente dos meses se fue incrementando poco a poco la concentración de la droga hasta llegar a una concentración de 60 µg/ml. Posteriormente, los trofozoítos transfectantes fueron analizados por western blot e inmunofluorescencia para verificar la expresión de las proteínas de interés.

7.15 Análisis proteómico de trofozoítos que sobreexpresan EhPC4 mediante geles de poliacrilamida en dos dimensiones (2D-PAGE).

Se obtuvieron de manera independiente 500 µg de proteína total a partir de cultivos celulares transfectados con los plásmidos pKT-3M y pKT-3M-*Ehpc4*, posteriormente se purificaron con el kit *ReadyPrep 2-D cleanup* (BIO-RAD) y se resuspendieron en un amortiguador que contenía CHAPS al 4%, DTT 80 mM, urea 8 M, anfolinas al 0.2% y azul de bromofenol al 0.001%. Las muestras de proteína fueron cargadas en tiras IPG de 11

cm con un gradiente de pH de 4-7 (BIO-RAD). El isoelectroenfoque se realizó en tres pasos: 250 v por 0.5 h, 8000 v durante 2.5 h, and 8000 v por 3.0 h. Después de la corrida, las tiras fueron incubadas durante 25 min en amortiguador I (Urea 6 M, Tris-HCl 0.375 pH 8.8, SDS al 2%, glicerol al 20% y DTT al 2%) y reducidas en amortiguador II (Urea 6 M, Tris-HCl 0.375 pH 8.8, SDS al 2%, glicerol al 20% y iodoacetamida al 2.5%). Finalmente la tira se enjuagó en amortiguador de corrida para proteínas y se escurrió antes colocarla en el gel para la segunda dimensión. Para la segunda dimensión, las proteínas fueron separadas en geles de poliacrilamida desnaturalizantes al 13%, de 16 x 16 cm. La corrida se llevó a cabo durante 5 h a 4°C y 200 V. Los geles fueron teñidos con el colorante *Sypro Ruby* (Invitrogen) y las imágenes se adquirieron con un escáner FLA-5100 (Fuji Film) usando el programa *Multigauge*. Los análisis para cada una de las condiciones se realizaron por triplicado. Para hacer la comparación y análisis de las imágenes se empleó el programa *Melanie* versión 7.0 (Genebio). De las 33 proteínas detectadas con variaciones en expresión cuando se sobreexpresa EhPC4 (FC>2.0; p<0.05), se seleccionaron 17 de los *spots* más abundantes para su identificación por espectrometría de masas. Se cortaron de los geles, se lavaron con una mezcla de metanol al 50% y ácido acético al 5% durante 2 h. Posteriormente, se incubaron durante 10 min en bicarbonato de amonio 100 mM, se pulverizaron, se incubaron en acetonitrilo al 100% y se secaron al vacío. La digestión del gel fue llevada a cabo adicionando 30 µl de una solución de tripsina porcina (Promega, Madison, WI, USA). Los péptidos fueron extraídos incubando en una mezcla de acetonitrilo al 50% y ácido fórmico al 5%, dos veces por 30 min. Los análisis de identificación se realizaron en un sistema 3200 Q TRAP LC/MS/MS (AB SCIEX). Para la interpretación de los datos y la identificación de proteínas se empleó el algoritmo MASCOT.

7.16 Extracción, cuantificación y análisis de la calidad del RNA de *E. histolytica*.

La extracción de RNA total se realizó mediante el uso del reactivo comercial TRIzol (Invitrogen). Una pastilla de trofozoítos (4.0×10^6 células) se resuspendió en 1 ml de TRIzol, se mezcló suavemente, y se incubó durante 5 min a temperatura ambiente para permitir la lisis celular. Al lisado celular se le añadieron 800 µl de cloroformo, se mezclaron por inversión suave, y se dejó en reposo durante 3 min a temperatura ambiente. Posteriormente, se centrifugó la mezcla a 4°C durante 10 min a 12500 rpm para separar la fase orgánica de la acuosa. Se tomó la fase acuosa que contiene al RNA, se le

adicionaron 800 μ l de isopropanol, se mezclaron por inversión suave del tubo, y luego se dejó en reposo 10 min a temperatura ambiente para precipitar el RNA. Posteriormente, se centrifugó a 4°C durante 10 min a 12500 rpm, el sobrenadante se decantó y la pastilla de RNA se secó a temperatura ambiente durante 15 min. Finalmente la pastilla fue resuspendida en 100 μ l de agua DEPC libre de ribonucleasas. El RNA obtenido fue almacenado a -20°C hasta su uso.

La cuantificación y determinación de la calidad del RNA total extraído se realizó de manera estándar por espectrofotometría. Debido a que el RNA cuando está puro presenta una relación lineal entre concentración y absorbancia a 260 nm (A_{260nm}), su concentración se determinó midiendo su A_{260nm} en solución. Dado que 1 unidad de A_{260nm} de RNA de cadena sencilla corresponde a 44 μ g/ml, la concentración del RNA problema se estimó de acuerdo a la siguiente ecuación: $[\text{RNA } \mu\text{g/ml}] = (A_{260nm}) (44)$ (factor de dilución del RNA en agua). La pureza del RNA en solución también se determinó midiendo la relación de absorbancia a 260 y 280 nm ($A_{260/280}$), si ésta es mayor que 2, considerándolo puro. Un valor de $A_{260/280}$ entre 1.8-2 indica la presencia de DNA y un valor menor a 1.7 significa contaminación con proteínas y fenol. Así mismo, la cantidad y calidad del RNA total extraído se determinó mediante la observación del patrón de corrimiento electroforético de las moléculas en geles de agarosa al 1% con amortiguador TBE 1X.

7.17 Validación de los datos de proteómica por RT-PCR

Para determinar los niveles de expresión a nivel de mRNA de genes individuales, y detectar diferencias en la expresión de los genes de interés, se realizaron análisis de RT-PCR. El protocolo consta de tres pasos: pretratamiento del RNA total con DNAsa I, la reacción de retrotranscripción (RT) para la generación de cDNA, y finalmente la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para amplificar las secuencias de interés.

Pretratamiento con DNAsa I libre de RNAsa. Para eliminar el DNA contaminante que pudiera haber quedado en el RNA total después de su extracción, este fue tratado con la enzima DNAsa I libre de RNAsa. Para ello, 1 μ g de RNA total se mezcló con 1 U de DNAsa y 20 U de Rnasin, llevándolo el volumen final de reacción a 10 μ l con agua. Se incubaron a 37°C durante 15 min. Posteriormente, se inactivó la DNAsa I adicionando 1 μ l de EDTA 25 mM e incubándolos a 65°C durante 15 min. Para llevar a cabo la reacción de

retrotranscripción, es decir, la síntesis de cDNA a partir del RNA total, se siguió el siguiente protocolo. A la mezcla de reacción que fue pretratada con DNAsa I libre de RNAsa se le adicionaron 100 ng de oligo d(T), 1 µl de dNTP's 10 mM (dATP, dCTP, dGTP y dTTP), 1 U de RNAsin, 1 µl de DTT 0.2 M y 4 µl de buffer de reacción 5X para la enzima Superscript IITM de Invitrogen (Tris-HCl 250 mM pH 8.3, KCl 375 mM, MgCl₂ 1mM). La mezcla se incubó durante 5 min a temperatura ambiente, posteriormente se le adicionaron 200 U de la enzima Superscript II dependiente de RNA y se llevó la reacción a un volumen final de 20 µl con agua. Se incubó a 42°C durante 90 min para permitir que la retrotranscriptasa sintetizara el cDNA. Finalmente, se trató la reacción con 1 µl de RNAsa H para eliminar el templado de RNA y optimizar la reacción de PCR. Para la reacción de PCR se utilizaron 4 µl del cDNA (que corresponden a una quinta parte de la reacción final de retrotranscripción), 1 µl de dNTP's 10 mM (dATP, dCTP, dGTP y dTTP), 20 picomoles de cada oligonucleótido en sentido y antisentido específicos para el gen de interés, MgCl₂ 2 mM y 5 µl de amortiguador de reacción 10X para la enzima Taq DNA polimerasa (Invitrogen). El volumen de la reacción se ajustó a 50 µl con agua. Finalmente, se le adicionó 1 U de enzima Taq DNA polimerasa. Los tubos se incubaron en un termociclador (Thermoline) y se aplicó el programa de amplificación específico para cada gen. Cada reacción de RT-PCR, fue acompañada de una reacción que sirve como control negativo, denominada RT negativa, que consistió en la reacción de RT-PCR tal como se explicó previamente, excepto que no se le adicionó la enzima retrotranscriptasa, esto con el fin de detectar contaminación por DNA.

7.18 Ensayo citopático.

Se sembraron 1×10^5 células SW480 en placas de 6 pozos con medio DMEM, y cuando formaron monocapas 100% confluentes, se lavaron tres veces con PBS 1X pH 6.8. Posteriormente, se pusieron a interaccionar durante 45 min a 37°C con las amibas, en una proporción 1:10 (trofozoítos:SW480), resuspendidas en medio TYI-S-33 incompleto. Para evaluar el porcentaje de destrucción de las monocapas después de la interacción, las células SW480 restantes se lavaron con PBS 1X pH 6.8 frío para eliminar los trofozoítos y posteriormente se tiñeron durante 10 min a 37°C con azul de metileno al 1%, disuelto en un amortiguador de boratos 100 mM pH 8.7. Se lavaron las células dos veces con amortiguador de boratos 10 mM pH 8.7. El colorante fue extraído incubando las células con 1 ml de HCl 0.1 N durante 30 minutos a 37°C, y cuantificado con un

espectrofotómetro a 660 nm. Como control negativo se usaron células SW480 sin interactuar con amibas.

7.19 Ensayo de migración celular.

La migración fue analizada usando cámaras transwell Costar de 5 mm, con membranas de policarbonato y poros de 8 μ M. Para estos experimentos, los trofozoítos fueron lavados tres veces en amortiguador TBS-CaCl₂ (Tris 50 mM pH 7.2, NaCl 150 mM y CaCl₂ 1 mM) y contadas. 10,000 células fueron depositadas dentro de la cámara superior en un volumen total de 100 μ l de amortiguador TBS-CaCl₂, y en la cámara inferior se depositaron 600 μ l de suero bovino como quimio-atrayente. Las cámaras fueron incubadas durante 3 horas a 37°C. El número de células que migraron de la cámara superior a la inferior fue determinado por conteo directo con ayuda de un microscopio.

7.20 Silenciamiento del gen *Ehabp16* mediante RNA de interferencia.

El silenciamiento se realizó de acuerdo a Solis y cols. 2009^[61]. Generación de dsRNA: células *E. coli* HT115 fueron transformadas de manera independiente con los plásmidos L4440-*EhABP16* y L4440-GFP como control. La síntesis del dsRNA fue inducida en las células transformadas HT115 con 2 mM de IPTG durante 4 h a 37°C. La purificación se llevó a cabo con una mezcla de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1) y la precipitación con isopropanol. La pastilla de ácidos nucleicos obtenida fue lavada con etanol al 70%, secada y resuspendida en agua libre de nucleasas. Posteriormente, se trató con DNAsa y RNAsaA durante hora y media. El dsRNA fue nuevamente extraído con fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1) y precipitado con acetato de amonio e isopropanol toda la noche. La pastilla fue lavada con etanol al 70%, secada y resuspendida en amortiguador TE. La calidad del dsRNA y su cantidad fue analizada en geles de agarosa al 1%. Ensayos de silenciamiento: 1 x 10⁴ trofozoítos fueron inoculados en tubos con medio TYI-S-33 completo, se les añadió directamente los dsRNAs a una concentración final de 100 μ g/ml, y se incubaron durante 72 h a 37°C. El silenciamiento del gen *EhABP16* fué verificado por RT-PCR. Como control, dsRNAs para el silenciamiento de la proteína GFP fueron empleados en los experimentos.

7.21 Inmunodetección de F-actina

Los trofozoítos fueron fijados con paraformaldehído al 4% durante 30 min y permeabilizados 15 s con acetona al 100%. El bloqueo se hizo con suero fetal bovino al 1% en PBS 1X durante 1 h. Las células se incubaron con faloidina rodaminada (invitrogen) a una dilución 1:50 durante 1h a temperatura ambiente. El DNA se tiñó con DAPI y los trofozoítos se analizaron mediante microscopia confocal.

7.22 Análisis transcriptómico de trofozoítos que sobreexpresan EhPC4 mediante microarreglos de expresión.

El RNA total de células HMI:IMSS transfectadas con el plásmido pKT-3M *Ehpc4* y pKT-3M fue obtenido con TRIzol (Invitrogene). Su cantidad y calidad fueron analizadas en un nanodrop, en geles de agarosa al 1.0% en amortiguador TBE 0.5 X y finalmente en el equipo 2100 *Bioanalyzer Instrument* (Agilent). La síntesis del cDNA y el marcaje con Cy3 y Cy5 para cada una de las condiciones se realizó a partir de 10 µg de RNA total, empleando el kit *SuperScript™ Indirect cDNA Labeling System* (Invitrogen), siguiendo las recomendaciones del fabricante. Los microarreglos (EH-IP2008; Agilent Technologies) fueron hibridados, lavados y escaneados (GenePix 4000 A, Axon) y las imágenes se analizaron con el programa *GenePix5* (Axon). Tres réplicas biológicas para cada condición fueron analizadas, cada una de ellas con dos réplicas técnicas. Los análisis estadísticos fueron realizados como están descritos por Santi-Rocca J, 2012 ^[62]. Sólo los genes con una expresión diferencial de > 1.5 y un valor de p < 0.05 fueron considerados para este estudio.

7.23 Análisis de proliferación, viabilidad y tamaño celular de *E. histolytica*.

1.5×10^5 trofozoítos fueron inoculados en tubos de cultivo con medio TYI-S-33 completo, y crecidos a 37°C durante 24, 48, 72 y 96 h. En cada uno de los tiempos se determinó el número de células en los cultivos, la viabilidad celular y el diámetro celular usando el sistema de conteo celular automatizado *TC20* (BIO-RAD) y el colorante vital azul de tripano *TC10* (BIO-RAD). Estos ensayos se llevaron a cabo tres veces por duplicado.

7.24 Ensayo de replicación del DNA

Se utilizó un kit de replicación de ADN (Upstate Biotechnology) de acuerdo a las recomendaciones del fabricante. Brevemente, los trofozoítos de *E. histolytica* fueron crecidos durante 24 h previas antes de cada experimento sobre cubreobjetos estériles en medio TYI-S-33. Al siguiente día, se retiró el medio y se sustituyó por medio nuevo TYI-S-33 suplementado con BrdU (concentración final 10 μ M) y las células se incubaron durante 45 min a 37°C. Posteriormente se fijaron con paraformaldehído al 4% durante 30 min y se permeabilizaron con acetona durante 15 s. Las células se incubaron durante 1 h a temperatura ambiente con un anticuerpo primario α -BrdU (clona BU-1, dilución 1:4), después con un anticuerpo secundario anti-ratón hecho en cabra (a una concentración de 5 μ g/ml) durante 30 min a temperatura ambiente. Finalmente se incubaron con un anticuerpo terciario anti-cabra hecho en burro, conjugado con la cianina Cy2 (dilución 1:400) durante 20 min a temperatura ambiente. Los cubreobjetos fueron montados con un medio de montaje especial para Cy2 (citrato de sodio 0.1 M, fosfato de sodio 0.2 M y glicerol al 50% (v/v), pH 5.5) recomendado por el fabricante. Las células fueron examinadas bajo un microscopio invertido Nikon acoplado a un sistema de escáner confocal (TCS SP2, Leica Microsystems), y analizadas con el programa Image J. Las intensidades de fluorescencia de 250 células al azar para cada condición y por experimento fueron determinadas con el programa Leica confocal.

7.25 Determinación del contenido de DNA por citometría de flujo.

Los trofozoítos fueron sincronizados por ausencia de suero durante 12-13 h y posteriormente crecidos en medio TYI-S-33 completo. Los trofozoítos se cosecharon a diferentes tiempos post-sincronización, se tiñeron con yoduro de propidio usando procedimientos estándar, y se analizaron mediante citometría de flujo para determinar el contenido de DNA. Se registraron 10,000 eventos (células) por muestra empleando el equipo FACScalibur (Becton Dickinson), el análisis se realizó con el programa CellQuest (Becton Dickinson).

7.26 Determinación del número de núcleos por trofozoíto de *E. histolytica*

Los trofozoítos de *E. histolytica* fueron sincronizados por ausencia de suero durante 12-13 h ^[63]. Posteriormente se tomaron 1.5×10^5 células y se inocularon en tubos de

cultivo con medio TYI-S-33 completo. A las 0, 24, 48, 72 y 96 h de crecimiento post-sincronización se tomó una alícuota de los cultivos y las células se colocaron sobre cubreobjetos durante 20 min a 37°C para permitir que se adhirieran al vidrio. Posteriormente, los trofozoítos se fijaron al cubreobjetos con paraformaldehído al 4% durante 1h. Los núcleos se tiñeron con 2.5 ug/ml de DAPI (Invitrogen) durante 1 min. Los cubreobjetos fueron montados sobre portaobjetos con *Vectashield*. El número de núcleos por célula (250 células seleccionadas aleatoriamente en cada condición) fue contado con ayuda de un microscopio invertido Nikon acoplado a un sistema de escaneo laser confocal (TCS SP2, Leica Microsystems).

7.27 Imagenología de células vivas en tiempo real.

Las células HMI:IMSS sin transfectar, HMI:IMSS transfectadas con el plásmido pKT-3M *Ehpc4*, pKT-3M *nudC* ó pKT-3M (como control) fueron sincronizadas por ausencia de suero durante 12-13 h. Posteriormente, fueron colocadas en cámaras POC-R2 (LaCon, Germany) con medio TYI-S-33, suplementado con suero bovino adulto (10%), e incubadas a 37° C durante 24 h dentro de una incubadora (Tempcontrol 37-2 digital, Zeiss, Germany) acoplada a un microscopio Axiovert 200 M (Zeiss Germany). Los videos fueron tomados con el objetivo 40X y las imágenes capturadas con intervalos de tiempo de 2 s. Se analizaron y procesaron con el programa Axiovision v4.8 (Zeiss, Germany).

7.28 Ensayos de inmunoprecipitación de la cromatina

Los ensayos de inmunoprecipitación de la cromatina fueron realizados de acuerdo a Anbar M. 2005 ^[64]. Brevemente, 20×10^6 trofozoítos de la cepa HM-1:IMSS fueron crecidos en medio TYI-S-33, se cosecharon en la fase exponencial y se fijaron con formaldehído al 1% durante 10 min a temperatura ambiente. Las células fueron colectadas y lavadas una vez con PBS 1X frío, una vez con el amortiguador I (HEPES 10 mM, pH 6.5, EDTA 10 mM, EGTA 0.5 mM y Tritón X-100 0.25%) y una vez con el amortiguador II (HEPES 10 mM, pH 6.5, EDTA 1 mM, EGTA 0.5 mM y NaCl 200 mM). Las células fueron resuspendidas en 500 µl de amortiguador de lisis (Tris 50 mM, pH 8.1, EDTA 10 mM, y SDS 1%) con inhibidores de proteasas. Se sonicó la muestra 12 veces (pulsos de 30 seg y descansos de 30 seg, con una amplitud del 75%) para producir fragmentos de de DNA de un tamaño aproximado de 300-500 pares de bases. Una alícuota del extracto se diluyó 10 veces en un amortiguador que contenía Tris 20 mM, pH 8.1, NaCl 150 mM, EDTA 2

mM y Triton X-100 al 1%. Se adicionaron 50 µg/ml de espermatozoides de salmón, 100 µg/ml de tRNA1, 1 mg/ml de BSA y 50 µl de sefarosa con proteína A (Amersham). Se incubó la mezcla durante 30 minutos en agitación. Después, la muestra se centrifugó durante 15 min a 4°C y el sobrenadante (cromatina soluble) fue usado para la inmunoprecipitación. El anticuerpo anti-EhPC4 se adicionó a 1 ml de cromatina soluble y se incubó toda la noche a 4°C. Posteriormente, 30 µl de sefarosa con proteína A fueron añadidos e incubados a 4°C durante 2 horas en rotación. Las perlas fueron lavadas secuencialmente, una vez con amortiguador III, otra con amortiguador de LiCl y finalmente dos veces con TE. Los complejos fueron eluidos incubando durante 15 min las perlas con 250 µl de amortiguador de elusión, dos veces a temperatura ambiente. Para revertir el entrecruzamiento, la mezcla de elusión fue incubada con NaCl 200 mM durante 4 h a 65°C. Para la purificación de los fragmentos de DNA de la elusión, se realizó una extracción con fenol-cloroformo seguida de una con cloroformo. Los fragmentos fueron precipitados con etanol y resuspendidos en 20 µl de amortiguador TE. 2 µl de muestra fueron utilizados para la amplificación por PCR. Pares de oligonucleótidos apropiados fueron diseñados y sintetizados para amplificar fragmentos de los promotores de los genes *Ehnudc*, *Ehc48*, *Ehstg1*, *Ehsmc*, *Ehcwf2*, *Ehodc1*, *Ehskip1* y *Ehdusp1*. Los productos de PCR fueron separados y analizados por electroforesis en geles de agarosa al 1.5%.

8. RESULTADOS.

8.1 EhPC4 es una proteína altamente conservada a través de la escala evolutiva.

Mediante búsquedas en las bases de datos de genomas de diversos organismos, y usando el programa BLAST, identificamos 111 proteínas ortólogas a EhPC4. El análisis de las secuencias mostró que 15 de ellas eran de origen bacteriano, en su mayoría proteobacterias, y 97 de eucariontes que abarcan otros protistas, algas, hongos, plantas y animales. La región que incluye el dominio de unión al DNA representa la región más conservada entre las proteínas ortólogas, y dentro de este dominio existe un motivo altamente conservado, que nosotros denominamos $Fx_8Rx(Fx_{(7-10)})Px_2KG$, el cual parece ser relevante para la interacción de EhPC4 y sus ortólogos con el DNA (Figuras 5 y 6). Estos datos en su conjunto sugieren que PC4 es una proteína altamente conservada que apareció tempranamente en la evolución en bacterias, y posteriormente se diversificó en las diferentes ramas de los eucariontes.

Consistente con esta hipótesis, los análisis de inferencia filogenética indicaron que el dominio PC4 bacteriano es más divergente, sólo contiene el dominio de unión al DNA y carece del dominio de dimerización. Así, estas proteínas bacterianas son agrupadas en un clado aparte de sus contrapartes eucariontes (Figura 7). La proteína EhPC4 de *E. histolytica* forma un subgrupo con su homóloga de una especie altamente relacionada (*E. dispar*), y estas a su vez se relacionan más con la proteína de *Dictiostelium discoideum*. Las tres especies pertenecientes al grupo Amebozoa, subfilo Conosa, que se caracteriza por contener organismos ameboides que se desplazan por pseudópodos y se alimentan por fagocitosis.

La predicción de la estructura terciaria del EhPC4-CTD hizo evidente que el dominio de unión al DNA está constituido por una hoja- β (que comprende cuatro cadenas β) y el de dimerización está conformado por una α -hélice, mostrando así una organización molecular similar a su homóloga PC4 de humano, estos datos apoyan la idea de que pudieran conservar una función biológica parecida. En la Figura 8 se muestra una comparación de EhPC4-CTD con HsPC4-CTD, a través de un alineamiento estructural.

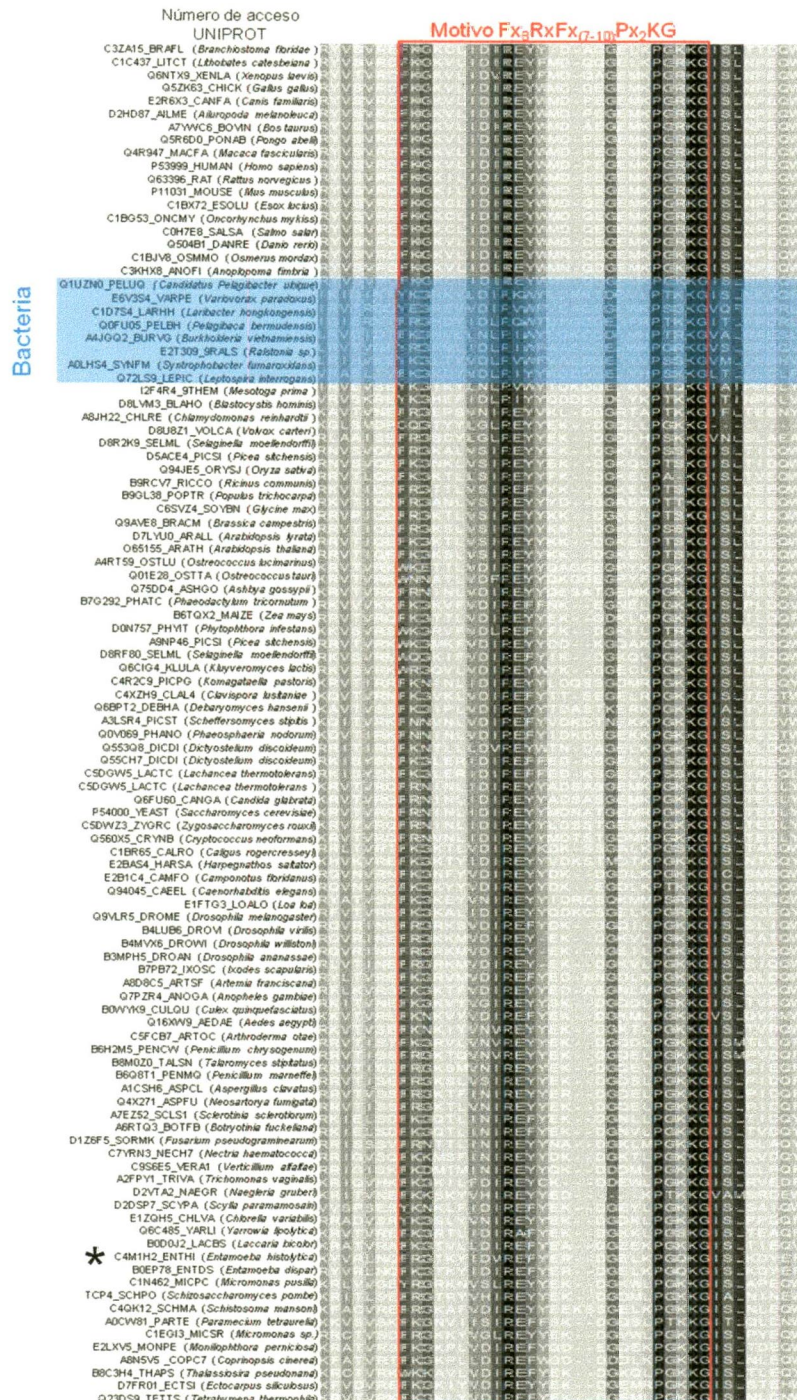


Figura 5. Alineamiento múltiple del dominio de unión al DNA de EhPC4 y sus proteínas ortólogas. Los ortólogos de EhPC4 fueron identificados mediante BLAST en la base de datos de NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). El alineamiento fue realizado con el programa Clustal W. Las secuencias de bacteria se muestran sombreadas en azul (■), el motivo Fx₈RxFx₍₇₋₁₀₎Px₂KG se muestra en una caja (□), y la secuencia correspondiente a *E. histolytica* se encuentra marcada con un asterisco (*). Las letras blancas en fondo negro representan residuos idénticos en las secuencias alineadas. Las letras blancas en fondo gris representan residuos similares.

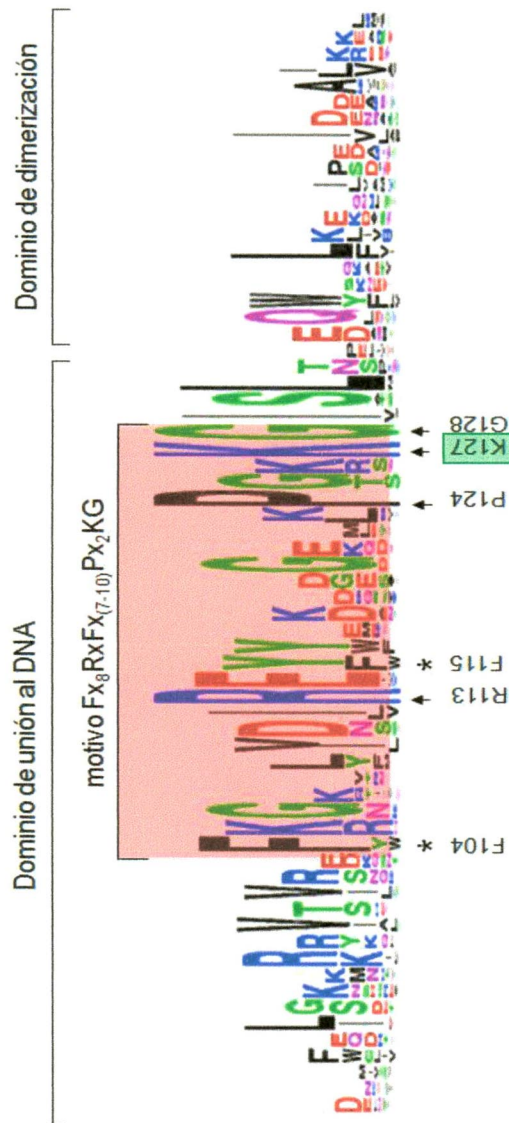


Figura 6. Weblogo del alineamiento múltiple entre la secuencia EhPC4-CTD y los dominios C-terminales de sus proteínas ortólogas. El análisis de los sitios conservados se realizó con la aplicación Weblogo (<http://weblogo.berkeley.edu>). La altura de las letras representa la frecuencia de los residuos de aminoácidos (grado de conservación) entre las 112 proteínas analizadas. Las flechas muestran los residuos de aminoácidos conservados 100% en todas las secuencias analizadas, los números corresponden a la posición de ese residuo en la proteína EhPC4, y los asteriscos muestran las posiciones donde los residuos aromáticos son altamente conservados. Sombreado en rojo se muestra el motivo $Fx_8Rx(Fx_{7-10})Px_2KG$ dentro del dominio de unión al DNA. En la caja verde (■) se resalta el aminoácido K_{127} , el cual fue analizado posteriormente para definir su papel en la interacción de PC4 con el DNA.

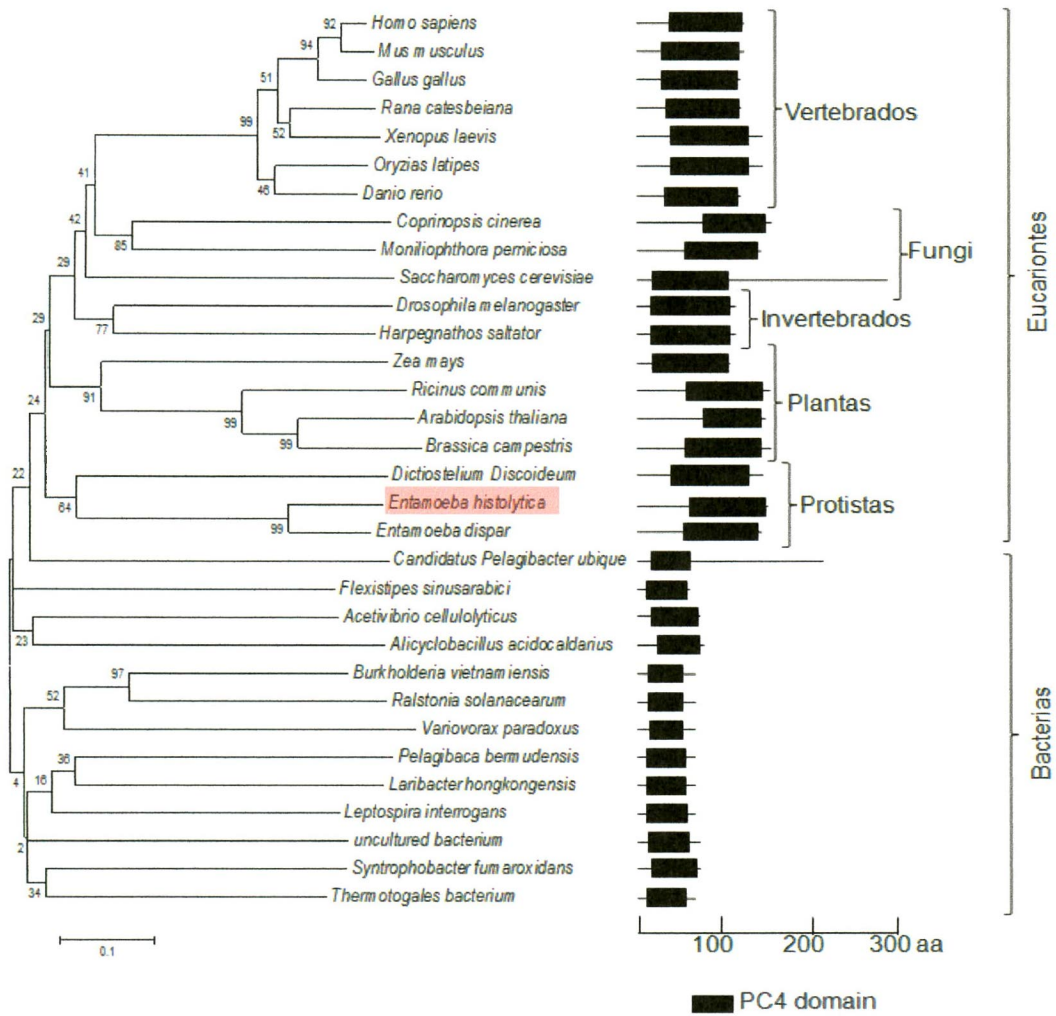


Figura 7. Árbol sin raíz de EhPC4 con sus proteínas ortólogas. La inferencia filogenética fué realizada por el método de *Neighbor joining* con 1000 réplicas en el programa MEGA 5. Los números en los nodos indican el soporte estadístico de las ramas obtenido mediante el criterio de *bootstrap*. La barra en la parte inferior del filograma hace referencia a la distancia evolutiva. A la izquierda de la figura se muestra la organización molecular de EhPC4 y sus ortólogos. El dominio PC4 predicho con el programa PFAM se representa en una caja negra.

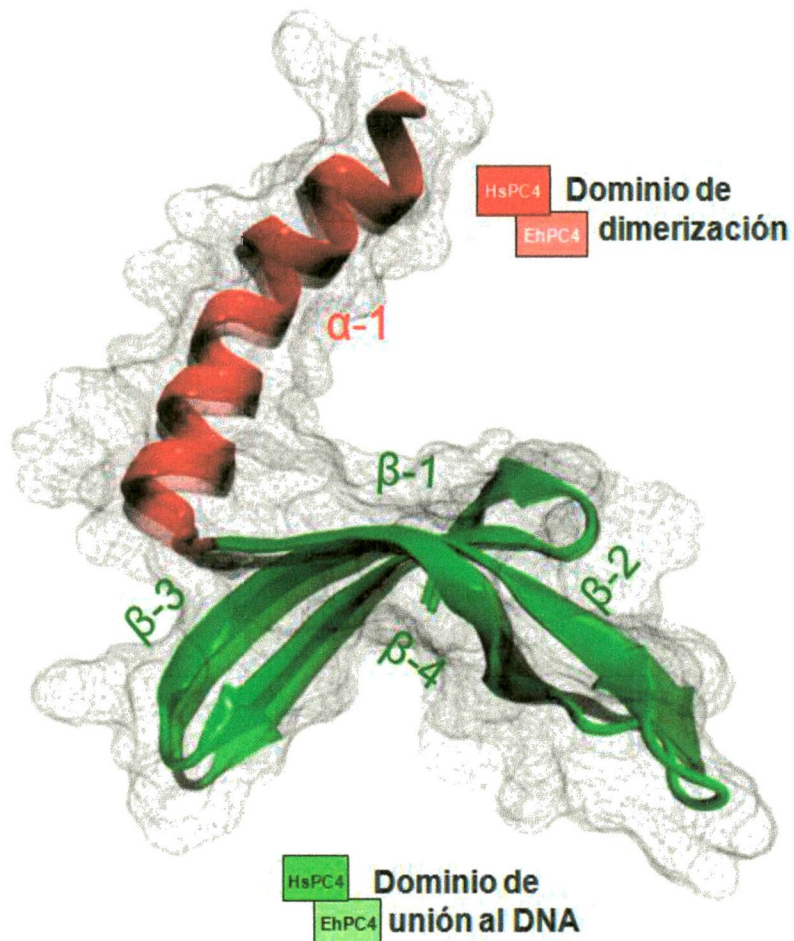


Figura 8. Alineamiento estructural del HsPC4-CTD con EhPC4-CTD. La estructura tridimensional de EhPC4-CTD fue deducido por homología usando como templado la estructura previamente resuelta por cristalografía de rayos X de PC4-CTD (Número de acceso PDB: 1PCF) y modelado usando el programa Phyre (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2/html/page.cgi?id=index>). El alineamiento estructural es visualizado con el programa VMD (<http://www.ks.uiuc.edu/Research/vmd/>). Las cadenas de aminoácidos son representadas como listones.

8.2 EhPC4 requiere del residuo K₁₂₇ para la unión al DNA.

Para identificar los residuos de aminoácidos que están probablemente implicados en la interacción de la proteína EhPC4 con el DNA y definir la relevancia del motivo Fx₈RxFx₍₇₋₁₀₎Px₂KG, se hizo un modelo molecular *in silico* por homología de un complejo ternario, que corresponde a un dímero del CTD-EhPC4 (CTD-EhPC4 cadena A: CTD-EhPC4 cadena B) en interacción con un oligonucleótido dT₍₁₈₎G (cadena C), empleando el programa MOE (Figura 9a) y se determinaron los contactos más representativos en la estructura (Figura 9b). El molde empleado para el modelaje fue la estructura 2C62 de la base de datos del PDB, que corresponde a dos cadenas del C-terminal de PC4 de *H. sapiens* (que incluye al dominio de unión al DNA y al dominio de dimerización) formando un homodímero y en complejo con una molécula de DNA (oligo dT18G).

El modelo predice que 10 residuos de aminoácidos (K97, F104, R105, R113, Y116, R118, K123, Q126, K127 y K132) podrían estar implicados en la interacción, tres de ellos (F104, R113 y K127) se encuentran altamente conservados (70, 100 y 100%, respectivamente) en el motivo Fx₈RxFx₍₇₋₁₀₎Px₂KG (Figura 6). El residuo aromático F₁₀₄ puede contribuir a la afinidad al DNA a través de interacciones no covalentes tipo “*stacking*” con las bases nitrogenadas, como se ha visto en otros sistemas; y los residuos R₁₁₃ y K₁₂₇ cargados positivamente pueden estar involucrados en la afinidad de la proteína a través de interacciones con las bases nitrogenadas y los grupos fosfato del DNA que están cargados negativamente (Figura 9b).

Con el mismo programa se mutó *in silico* cada uno de los contactos más representativos por alanina, de manera independiente, y se evaluó el impacto de dichas sustituciones sobre la energía total de interacción del complejo ternario. Mediante este análisis se identificaron varios residuos de aminoácidos potencialmente implicados en la interacción del homodímero EhPC4 con el DNA, entre los que sobresalen 5 que a continuación se mencionan por orden de importancia: K₁₂₇, R₁₁₃, R₁₁₈, K₁₂₃ y Q₁₂₆ (Figura 9c). Estos análisis muestran que la sustitución más significativa (que incrementa la energía de interacción del complejo ternario), corresponde al cambio de la lisina 127 por alanina (K₁₂₇A), sugiriendo que este aminoácido puede ser determinante para la actividad de unión de EhPC4 al DNA.

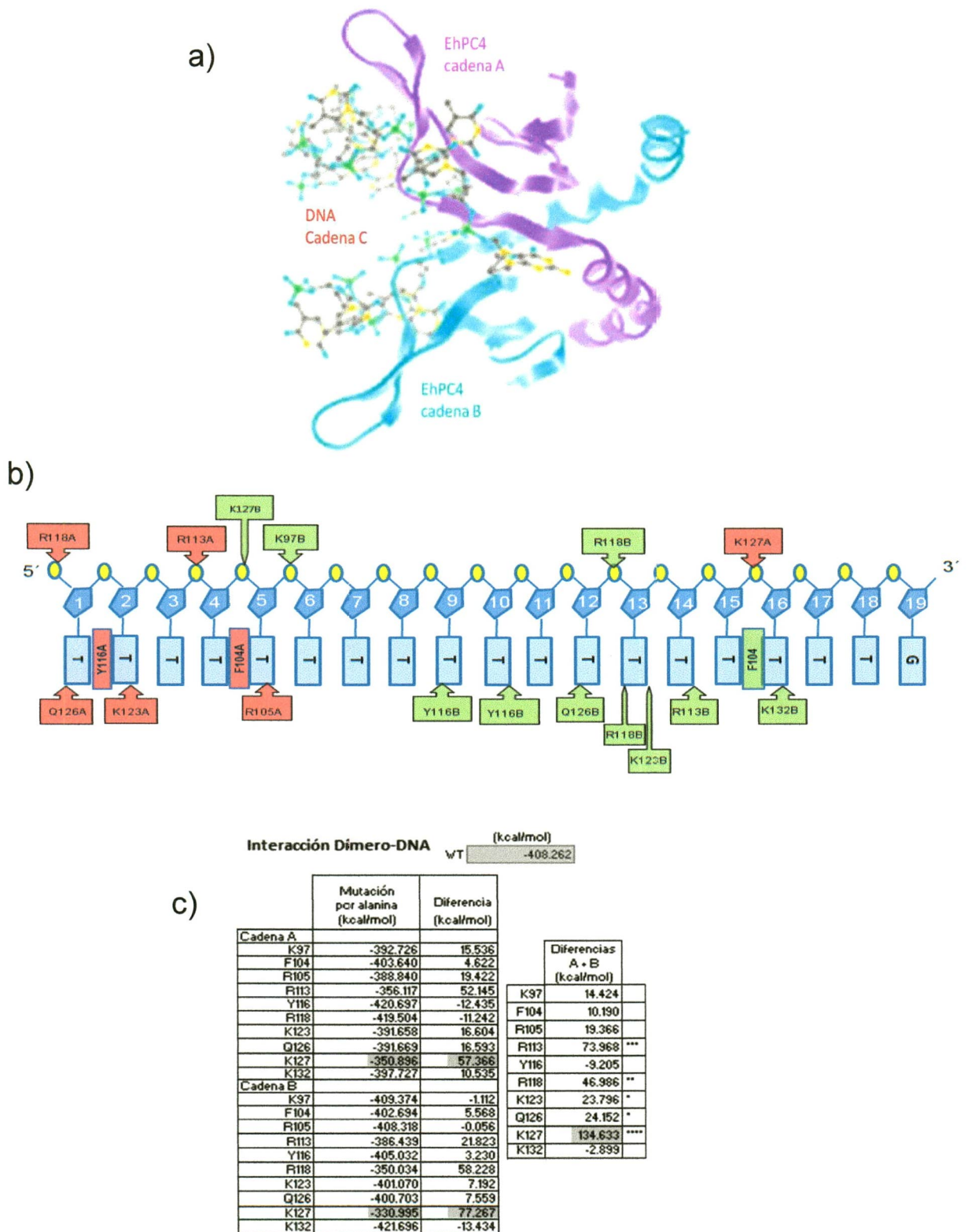


Figura 9. Análisis *in silico* de la interacción de EhPC4 con el DNA. a) Modelo molecular del complejo ternario (dímero CTD-EhPC4 cadena A:CTD-EhPC4 cadena B con dT₍₁₈₎G). b) Representación esquemática de los contactos más representativos en el complejo ternario. En gris oscuro se enmarcan los residuos de aminoácidos correspondientes a la cadena A y en gris claro los residuos correspondientes a la cadena B. c) Análisis del impacto de las sustituciones por alanina, de los contactos más representativos, sobre la energía total de interacción del complejo ternario.

Para explorar experimentalmente estas observaciones, primero analizamos la capacidad de unión al DNA de la proteína EhPC4 mediante ensayos de retardamiento de la movilidad electroforética (EMSA). Para esto, primero se transformaron células de *E. coli* BL21(DE3)pLysS con el vector de expresión pRSET-*Ehpc4* (Figura 10a). Posteriormente, se indujo la expresión de la proteína recombinante rEhPC4-6xHis acoplada a una etiqueta 6xHis en las bacterias, durante tres horas con IPTG (Figura 10b, línea 3h), y se analizó su solubilidad. Se observó que la proteína se encuentra principalmente en la fracción soluble de los extractos bacterianos (Figura 10b, línea FS). La expresión de la proteína recombinante en las bacterias fue verificada mediante inmunodetección empleando anticuerpos α -His (Figura 10c) y α -EhPC4 (Figura 10d). Los anticuerpos reconocieron una sola banda de aproximadamente 21.8 kDa, que corresponde con el peso molecular esperado de la proteína rEhPC4-6xHis. La purificación de la proteína rEhPC4 se realizó mediante cromatografía de afinidad a una columna de níquel, siendo las fracciones de elusión 13 y 14 donde se encuentra la proteína más enriquecida y pura (Figura 10e).

Se ha reportado que Sub1 de *Saccharomyces cerevisiae* (ortólogo de PC4 de humano) se une preferencialmente a secuencias de DNA que se encuentran alrededor de los sitios de inicio de la transcripción^[65], aunque no ha sido reportado un sitio consenso de unión. Por esta razón, seleccionamos como sonda para los análisis de retardamiento un fragmento del promotor de 174 pb (sonda ds174) del gen de la adhesina *EhAdh112* de *E. histolytica*, que va de la posición -151 a +24, para el cual se han mapeado y reportado previamente dos sitios de inicio de la transcripción, uno en la posición -151 y otro en la posición -69 (Figura 11a)^[58].

Los ensayos de retardamiento mostraron que rEhPC4 tiene la capacidad de formar un complejo de retardamiento con el DNA (Figura 11b, línea 2), como habíamos observado en ensayos previos. La adición del anticuerpo α -EhPC4 a la reacción permitió la formación de un complejo de superretardamiento (Figura 11b, línea 3). Como control negativo de la reacción de retardamiento (sin proteína rEhPC4) se utilizó BSA, ya que dicha proteína no tiene capacidad de unión al DNA, por lo que en los análisis no se observó la formación de complejos (Figura 11b, línea 4). El anticuerpo α -EhPC4 por sí sólo tampoco mostró la capacidad de formar complejos con el DNA (Figura 11b, línea 5). Estos datos muestran que rEhPC4 es una proteína de unión al DNA, ya que tiene la capacidad de formar complejos específicos con la sonda ds174.

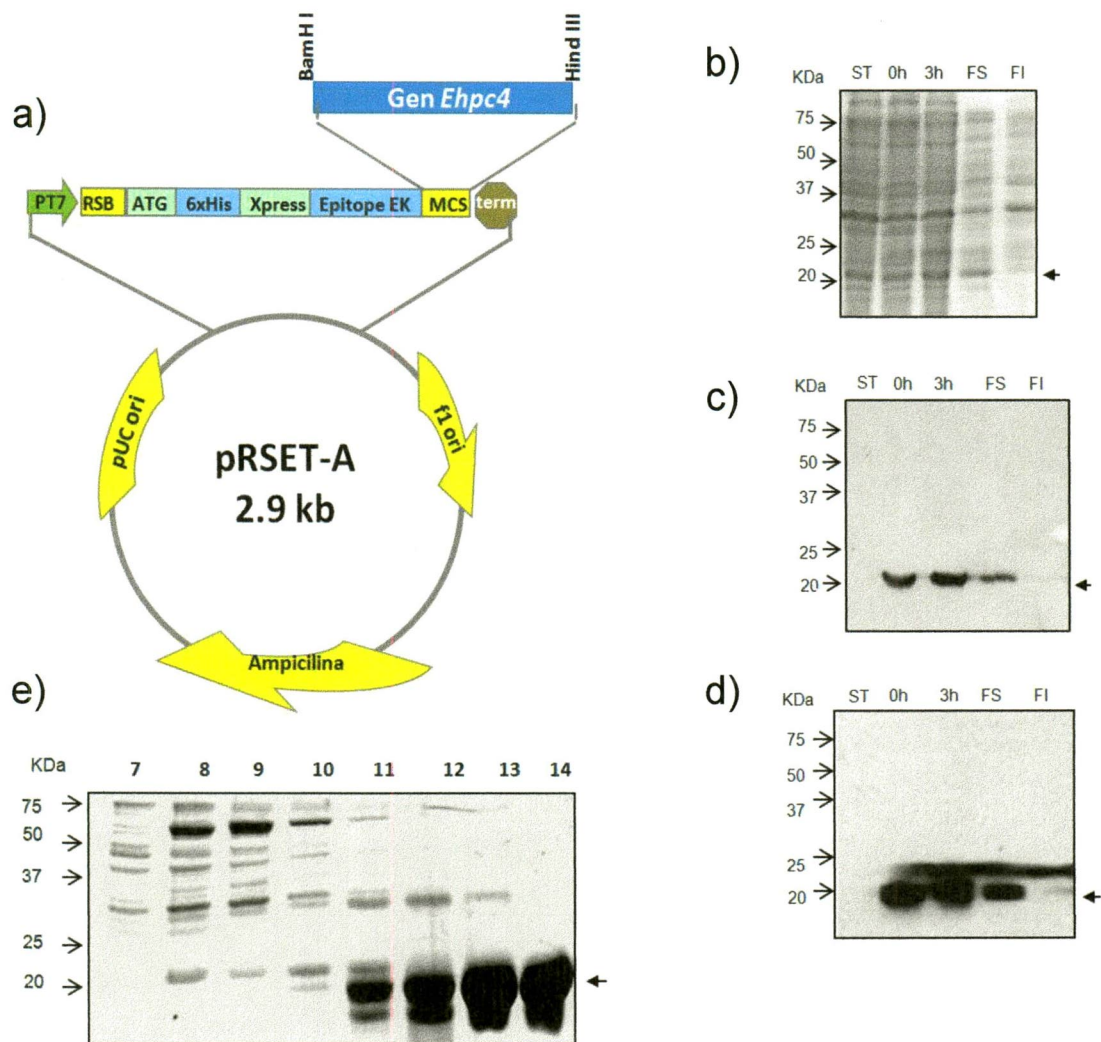
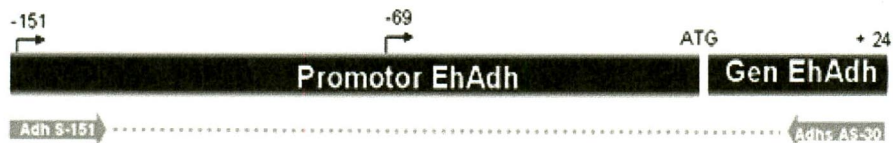


Figura 10. Expresión y purificación de la proteína EhPC4. a) Esquema del plásmido pRSET-Ehpc4. b) Análisis en gel de poliacrilamida de la expresión de la proteína rEhPC4 en *E. coli* BL21(DE3)p*LysS*. MP, marcador de peso molecular; ST, bacterias sin transformar; 0h, bacterias transformadas y sin inducir; 3 h, bacterias transformadas e inducidas 3 h con IPTG; FS, fracción soluble; FI, fracción insoluble. Confirmación de la expresión de rEhPC4 mediante inmunodetección empleando anticuerpos α -His (c) y α -EhPC4 (d). e) Análisis en gel de poliacrilamida de las fracciones de elusión obtenidas durante la purificación de rEhPC4 por cromatografía de afinidad a una columna de níquel.

a)



b)

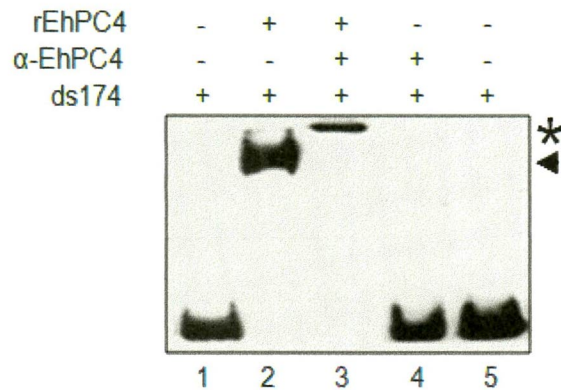
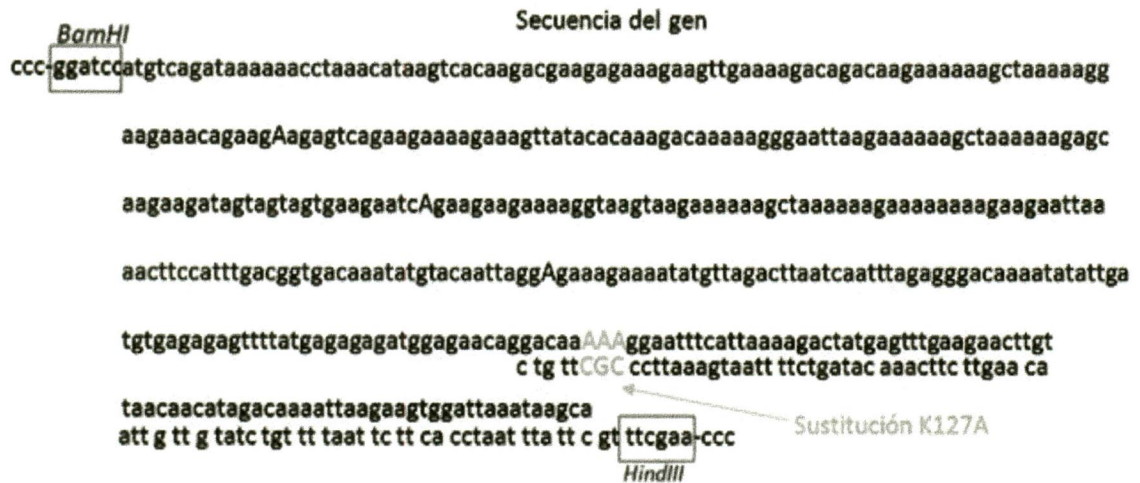


Figura 11. Análisis de la interacción de la proteína rEhPC4 con el DNA mediante ensayos de retardamiento. a) Representación esquemática del la sonda de DNA empleada en los ensayos de retardamiento. La sonda corresponde a un fragmento de promotor del gen de la adhesina EhAdh112, y fue amplificada por PCR a partir del plásmido p400CAT EhADh (donado por la Dra. Elisa Azuara^[58]) empleando oligonucleótidos específicos en sentido y antisentido (Adh S-151 y Adh AS-30, respectivamente). B) Ensayo de retardamiento para analizar la interacción de rEhPC4 con el DNA. Línea 1, sonda ds174 libre; Línea 2, sonda + proteína rEhPC4; Línea 3, sonda + proteína rEhPC4 + anticuerpo α -EhPC4; Línea 4, sonda + proteína BSA; Línea 5, sonda + anticuerpo α -EhPC4. El complejo de retardamiento se señala con una cabeza de flecha (\blacktriangleleft) y el de superretardamiento con un asterisco (*).

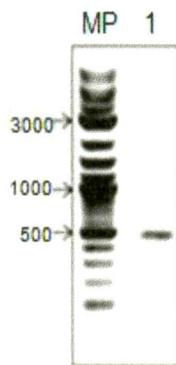
Para definir la relevancia del residuo K127 en la actividad de unión al DNA de EhPC4, se clonó el gen mutante *Ehpc4-k127a* en el vector de expresión pRSET-A. El gen mutante fue obtenido por PCR usando un meganucleótido en antisentido que introduce un cambio de triplete, de lisina (aaa) por alanina (gcg), en la posición 127 de la proteína EhPC4 (Figura 12, paneles a y b). Posteriormente, el plásmido pRSET y el gen *Ehpc4-k127a* amplificado fueron purificados (Figura 12, panel c) y ligados. La reacción de ligación se transformó en bacterias y posteriormente se seleccionaron 3 colonias candidatas. Se extrajeron los plásmidos de las colonias candidatas (Figura 12, panel d), y se analizaron por PCR empleando oligonucleótidos específicos (Figura 12, panel e) y por doble digestión con las enzimas *Bam*HI y *Hind*III (Figura 12, panel f). Los resultados muestran que los plásmidos obtenidos amplificaron un producto de PCR y liberan un inserto del tamaño esperado para el gen *Ehpc4-k127a*, por lo que se procedió a analizarlos por secuenciación automática. Los resultados muestran que el gen completo *Ehpc4-k127a* está clonado en marco de lectura en pRSET-A (Figura 13).

Posteriormente, el plásmido pRSET-*Ehpc4-k127a* fue introducido en células *E. coli* BL21(DE3)pLysS y se indujo la expresión de la proteína rEhPC4-K127A-6xHis durante 3h con IPTG (Figura 14a, línea 3h). Se analizó la solubilidad de la proteína y se observó que, al igual que la silvestre, se encuentra principalmente en la fracción soluble (Figura 14a, línea FS). La expresión fue verificada por western blot empleando anticuerpos α -His (Figura 14b) y α -EhPC4 (Figura 14c). Los anticuerpos reconocieron una banda de aproximadamente 21.8 kDa, que corresponde con el peso molecular esperado de la proteína rEhPC4-K127A-6xHis. Finalmente, se purificó la proteína mutante rEhPC4-K127A mediante cromatografía de afinidad, y se analizó su capacidad de unión al DNA a diferentes concentraciones, mediante EMSA. Se observó que cuando se disminuye la concentración de rEhPC4 en las reacciones de retardamiento (de 2.8 a 0.35 μ M) los complejo DNA-proteína permanecen formados (Figura 14d, líneas 2-5). En contraste, cuando se disminuye la concentración de rEhPC4-K₁₂₇A se forman barridos, los cuales son más evidentes entre más baja es la concentración de proteína (Figura 14d, carriles 6-9), mostrando que existe una reducción en su habilidad de unión al DNA. Estos resultados en su conjunto sugieren que el residuo K₁₂₇ (el cual se encuentra altamente conservado dentro del motivo Fx₈RxFx₍₇₋₁₀₎Px₂KG) es requerido para la actividad de unión al DNA de la proteína EhPC4.

a)



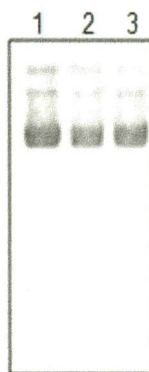
b)



c)



d)



e)



f)



Figura 12. Clonación del gen mutante *Ehpc4-k127a* en el vector pRSET-A. a) Sitio de hibridación, en el gen *Ehpc4*, del megaoligonucleótido en antisentido empleado para introducir por PCR un cambio de codón en el gen *Ehpc4*. Dicho cambio corresponde a una lisina (aaa) por una alanina (cgc) en la posición 127 de la proteína EhPC4 (K₁₂₇A). b) Análisis de la amplificación del gen *Ehpc4-k127a* por PCR (carril 1) en gel de agarosa al 1% TAE 0.5 X. MP, marcador de peso molecular. c) Análisis de la purificación del gen *Ehpc4-k127a* (carril 1) y del plásmido pRSET-A (carril 2) en gel de agarosa. d) Análisis de los plásmidos purificados a partir de tres clonas candidatas (carriles 1-3) en gel de agarosa. Análisis por PCR (Panel e, carriles 1-3) y doble digestión (Panel f, carriles 1-3) de los plásmidos candidatos en gel de agarosa.

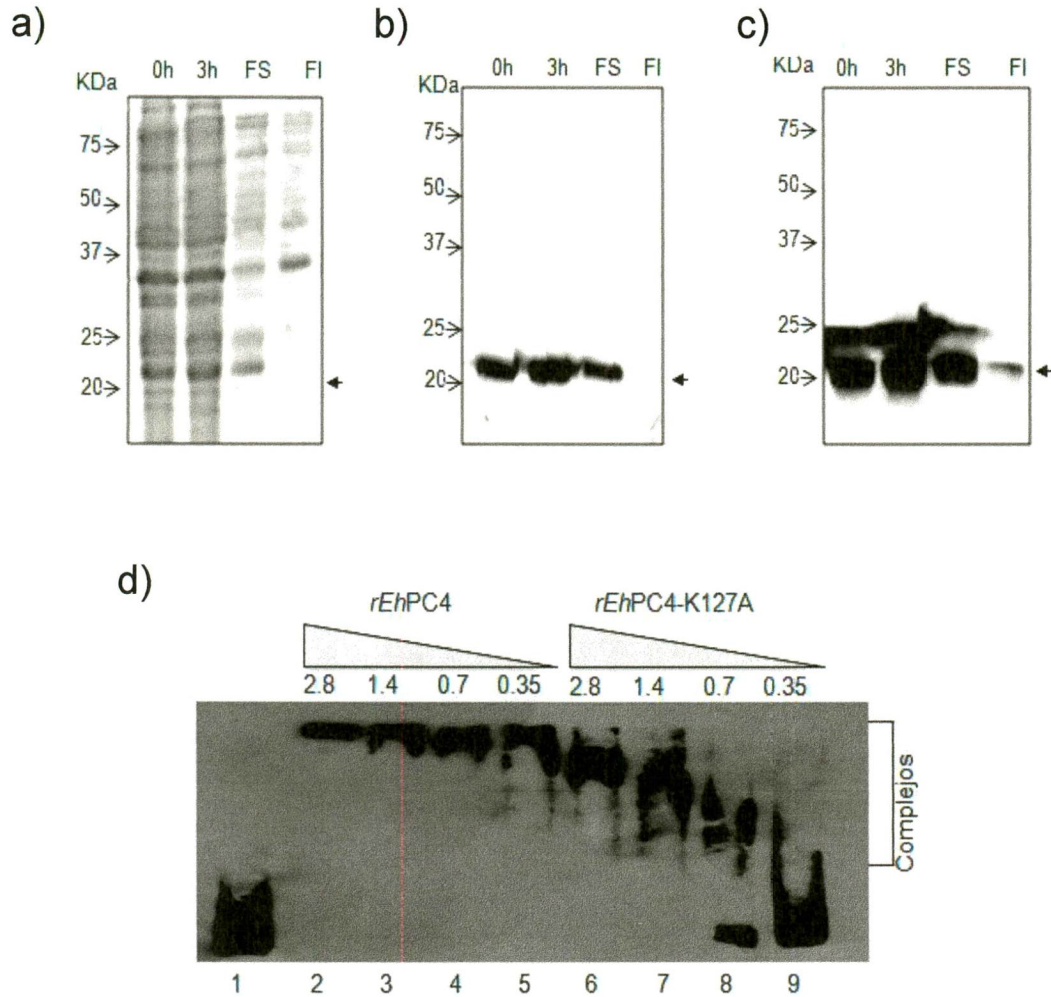


Figura 14. Expresión de la proteína rEhPC4-K127A en *E. coli* y análisis de su interacción con el DNA mediante ensayos de retardamiento. a) Análisis en gel de poliacrilamida de la expresión de la proteína rEhPC4-K127A en *E. coli* BL21(DE3)pLysS. 0h, bacterias transformadas y sin inducir; 3 h, bacterias transformadas e inducidas 3 h con IPTG; FS, fracción soluble; FI, fracción insoluble. Confirmación de la expresión de rEhPC4-K127A mediante inmunodetección con anticuerpos α -His (b) y α -EhPC4 (c). d) Comparación de la capacidad de unión al DNA de la proteína rEhPC4 silvestre y rEhPC4-K127A mutante mediante EMSA. Carril 1, sonda ds174 libre; Carriles 2-5, sonda + proteína rEhPC4 a diferentes concentraciones decrecientes (2.8, 1.4, 0.7 y 0.35 μM); Carriles 6-9, sonda + proteína rEhPC4-K127A a diferentes concentraciones (2.8, 1.4, 0.7 y 0.35 μM).

8.3 EhPC4 es una proteína nuclear distribuida en *foci* alrededor de la membrana nuclear externa.

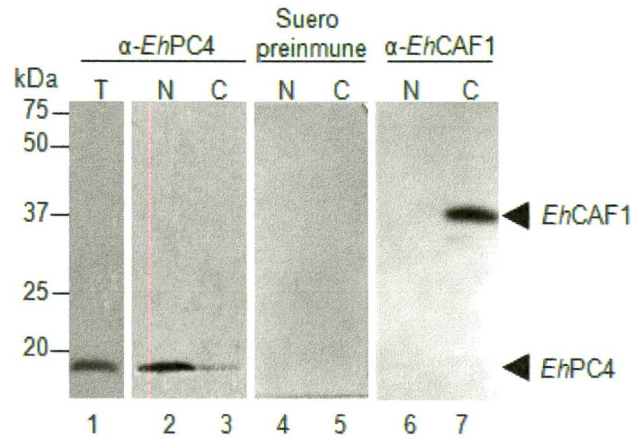
Para determinar la localización de la proteína EhPC4 en trofozoítos de *E. histolytica*, realizamos análisis de western blot, inmunofluorescencia y microscopía confocal utilizando anticuerpos policlonales de conejo específicos para la proteína EhPC4 (anti-EhPC4), obtenidos previamente por nosotros en el laboratorio.

Para analizar la localización subcelular de EhPC4 por western blot, se obtuvieron extractos totales, citoplásmicos y nucleares de trofozoítos de *E. histolytica*. Los anticuerpos reconocieron a la proteína EhPC4, de 18 kDa, en extractos totales (Figura 15a, carril 1) y nucleares (Figura 15a, carril 2). Así mismo, se observó una débil señal en la fracción citoplásmica de los trofozoítos (Figura 15a, carril 3). El empleo de suero preinmune, como control negativo, no mostró señal alguna en extractos nucleares ni citoplásmicos (Figura 15a, carril 4 y 5, respectivamente). La contaminación cruzada entre las fracciones proteicas, durante su obtención, fue descartada con un anticuerpo específico contra la proteína deadenilasa *EhCAF1*, que se encuentra exclusivamente en el citoplasma (Figura 15a, carril 7).

La distribución celular de EhPC4 fue confirmada posteriormente mediante ensayos de inmunofluorescencia y microscopía confocal. EhPC4 se encontró principalmente localizada en la región citoplásmica de los trofozoítos, sólo se observaron unos pequeños puntos en la región citoplásmica (Figura 15b, panel c). Un acercamiento al núcleo permite observar que EhPC4 se encuentra distribuida en el núcleo formando abundantes estructuras punteadas, o *foci* (Figura 15b, panel g). El análisis de las secciones confocales de los núcleos mostró que los *foci* se distribuyen en el nucleoplasma con una tendencia a polarizarse y acumularse cerca de la membrana nuclear (Figura 15b, panel i).

Para probar que la proteína se encuentra distribuida en la membrana nuclear, se realizaron análisis de colocalización de EhPC4 con Laminina B1, la cual es un marcador de membrana nuclear en eucariontes. Las imágenes de las inmunofluorescencias (Figura 16a, panel e), así como los valores del coeficiente de sobrelapamiento de Mander (MOC= 0.638) y de correlación de Pearson (PCC= 0.799) (Figura 16b y c), muestran que EhPC4 colocaliza parcialmente con laminina B1, confirmando que esta proteína se distribuye en la membrana nuclear de los trofozoítos de *E. histolytica*.

a)



b)

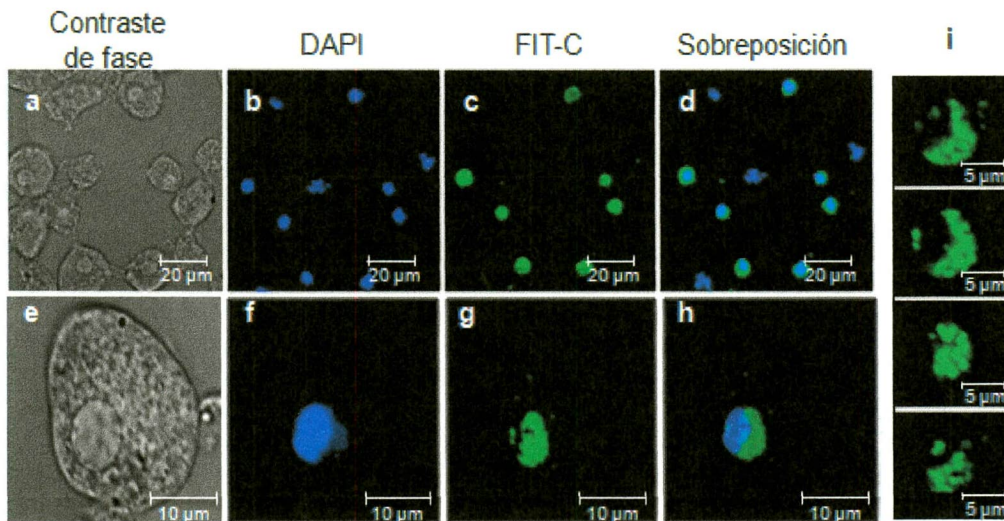
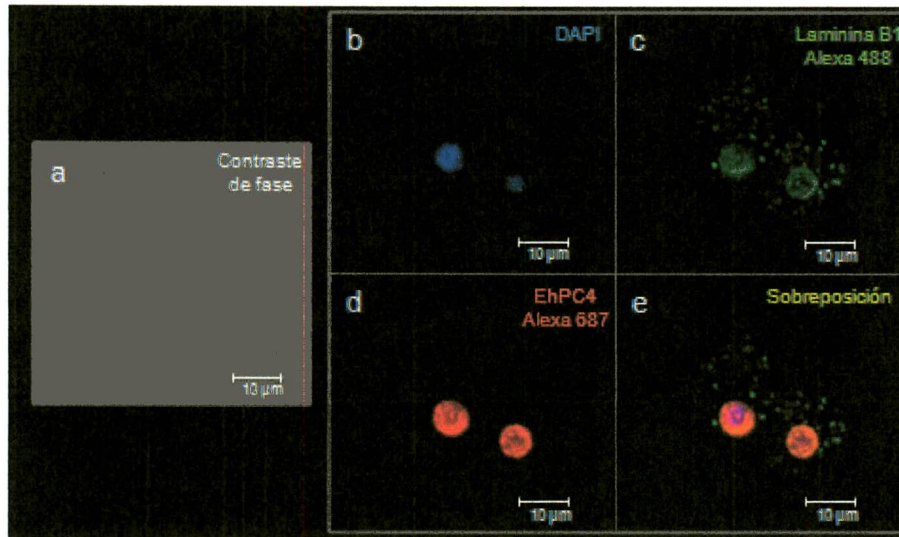
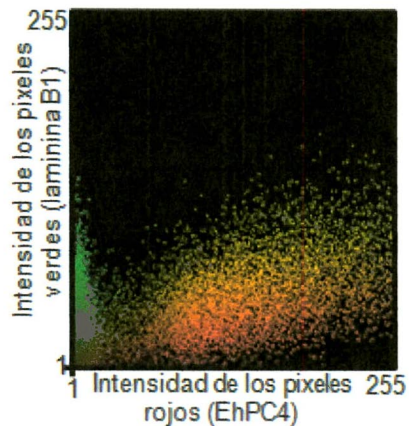


Figura 15. Inmuclocalización de EhPC4 en trofozoitos de *E. histolytica*. a) Localización subcelular de EhPC4 en extractos proteicos de *E. histolytica* mediante inmunodetección. Los trofozoitos de *E. histolytica* crecidos en estado basal son procesados para obtener extractos totales (T), nucleares (N) y citoplásmicos (C). Los extractos fueron resueltos en un gel de poliacrilamida, transferidos a una membrana de nitrocelulosa e incubados por separado con α -EhPC4 (1:2000), suero preinmune de conejo (1:2000) y α -EhCAF1 (1:2000). Las flechas señalan las bandas correspondientes a la proteína EhPC4 y EhCAF1. b) Localización subcelular de EhPC4 en trofozoitos de *E. histolytica*, mediante inmunofluorescencia. Los trofozoitos de *E. histolytica* fueron fijados con PFA 4% a cubreobjetos, permeabilizados con acetona y bloqueados con BSA 1%. Posteriormente, incubados con α -EhPC4 (1:200) y finalmente con α -rabbit FITC (1:200). La contratinción del núcleo se realizó con DAPI. Las laminillas fueron analizadas a través de microscopía confocal con un aumento 63X (paneles a-d) y 100 X (paneles e-h). En el panel i, se muestran las secciones confocales del núcleo mostrado en el panel g.

a)



b)



c)

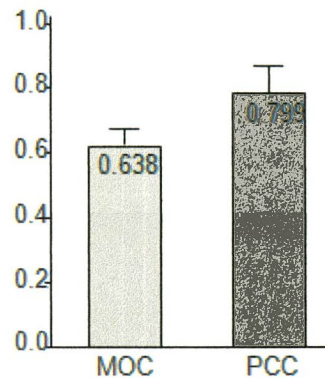


Figura 16. Colocalización de EhPC4 con laminina B1 en trofozoitos de *E. histolytica*.

a) Inmunocolocalización de EhPC4 con laminina B1 en trofozoitos de *E. histolytica*. Las células fueron fijadas a cubreobjetos con PFA 4%, permeabilizadas con acetona y bloqueadas con BSA 1%. Posteriormente, incubadas simultáneamente con α -EhPC4 de conejo (1:100) y α -laminina B1 de ratón (1:100). Después se incubaron con anticuerpos secundarios, anti-conejo Alexa 687 y anti-ratón Alexa 488 diluidos 1:200. La contratinción del núcleo se realizó con DAPI. Las imágenes fueron capturadas con un microscopio confocal, a un aumento de 63 X. b) Análisis de colocalización de EhPC4 con Laminin B1 a partir de las imágenes tomadas del microscopio confocal utilizando el programa WCIF Image J. c) Valores del coeficiente de correlación de Pearson y el coeficiente de superposición de Mander generados a partir de 10 imágenes diferentes de microscopía confocal elegidas al azar.

8.4 Expresión de la proteína de fusión Myc-EhPC4 en trofozoítos de *E. histolytica*.

Para iniciar con el estudio de las funciones celulares de EhPC4, primero se sobreexpresó la proteína Myc-EhPC4 en trofozoítos de *E. histolytica*. Para esto, el gen completo *Ehpc4* fue clonado en el vector de expresión pK-T3M. El gen fue obtenido por PCR usando oligonucleótidos específicos. Posteriormente, el producto de PCR y el vector se purificaron (Figura 17, panel a) y ligaron. La reacción de ligación se transformó en bacterias y posteriormente se seleccionaron tres colonias candidatas al azar. Se extrajeron los plásmidos de las colonias candidatas (Figura 17, panel b), y se analizaron por PCR (Figura 17 panel c) y por doble digestión con las enzimas *Sma*I y *Xho*I (Figura 17, panel d). Los resultados muestran que los plásmidos obtenidos amplificaron un producto de PCR y liberan un inserto del tamaño esperado para el gen *Ehpc4*, por lo que se procedió a analizarlos por secuenciación automática. Los resultados muestran que el gen completo *Ehpc4* está clonado en marco de lectura en el vector de expresión pKT-3M. En la figura 17e se muestra una representación esquemática del vector pKT-3M *Ehpc4* obtenido.

Para sobreexpresar la proteína EhPC4 en trofozoítos de *E. histolytica*, el plásmido pKT-3M *Ehpc4* fue introducido a las células mediante electroporación. Al mismo tiempo y por separado se transfectaron células con el vector pKT-3M vacío, para emplearlas como control en nuestros ensayos. Los análisis de western blot usando anticuerpos α -Myc revelan que sólo las células transfectadas con el plásmido pKT-3M *Ehpc4* (nombradas de ahora en adelante como células Myc-EhPC4) expresan la proteína de fusión Myc-EhPC4 de ~22 kDa (Figura 18a, carril 3). El análisis por western blot empleando α -EhPC4 reveló la presencia de la proteína endógena PC4 (~18 kDa) en células sin transfectar (Figura 18b, carril 1), transfectadas con el plásmido pKT-3M (Figura 18b, carril 2) y transfectadas con pKT-3M *Ehpc4* (Figura 18b, carril 3). Sólo las células Myc-EhPC4 expresan la proteína de fusión (Figura 18b, carril 3).

Estos datos fueron confirmados por inmunofluorescencia utilizando anticuerpos α -Myc. Se observó que la proteína Myc-EhPC4 se expresa únicamente en los trofozoítos transfectados con el plásmido pKT-3M *Ehpc4*, y mantiene su localización nuclear, tal como la proteína EhPC4 endógena (Figura 15b, paneles c y g), indicando que la etiqueta de Myc no afecta su distribución celular.

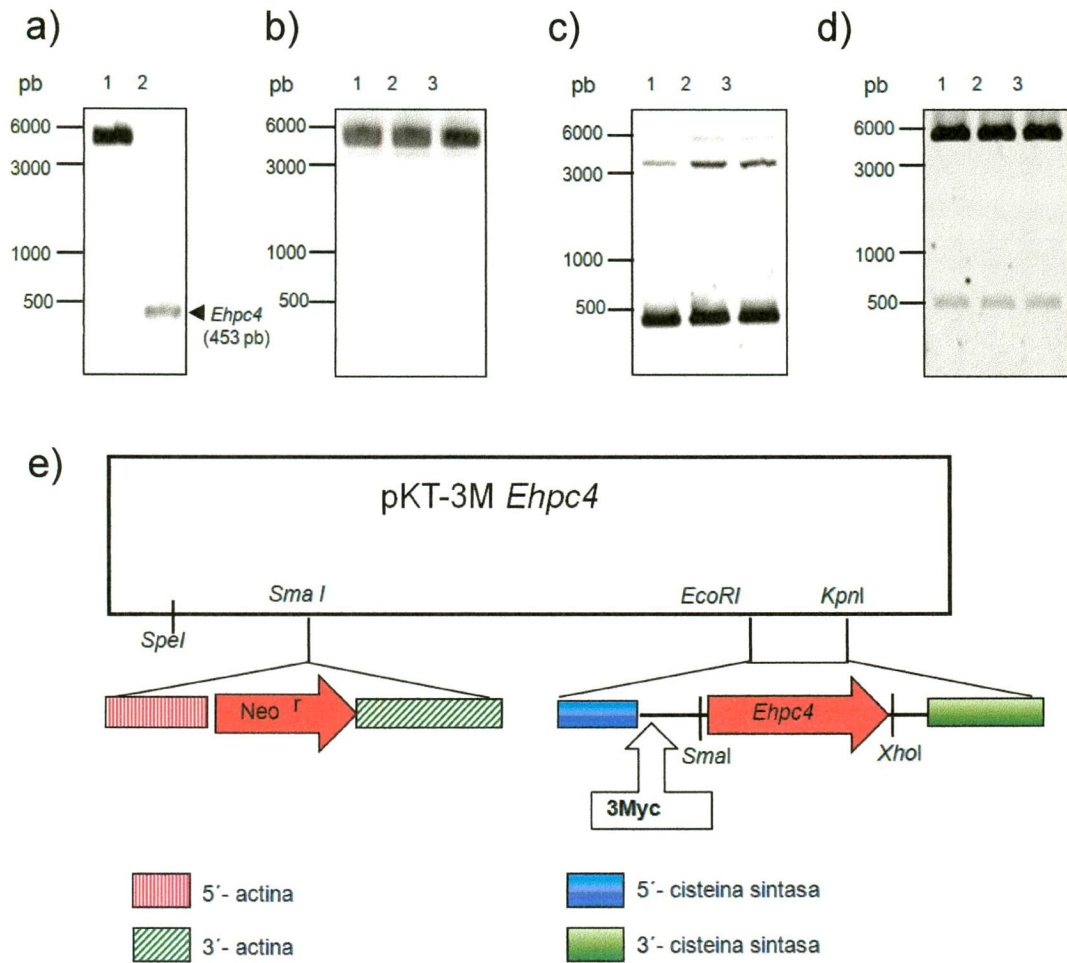


Figura 17. Clonación del *Ehpc4* en el vector pKT3M. a) Análisis de la purificación del gen *Ehpc4* (carril 1) y del plásmido pKT3M (carril 2) en gel de agarosa. b) Análisis de los plásmidos purificados a partir de tres clonas candidatas (carriles 1-3) en gel de agarosa. Análisis por PCR (Panel c, carriles 1-3) y doble digestión (Panel d, carriles 1-3) de los plásmidos candidatos en gel de agarosa. e) Representación esquemática del plásmido pKT-3M *Ehpc4*. El gen *Ehpc4* completo se clonó entre los sitios de restricción *SmaI* y *XhoI*, bajo el control de la secuencia 5' UTR y 3' UTR de la cisteín sintasa de *E. histolytica*, río abajo de la secuencia que codifica la etiqueta 3Myc.

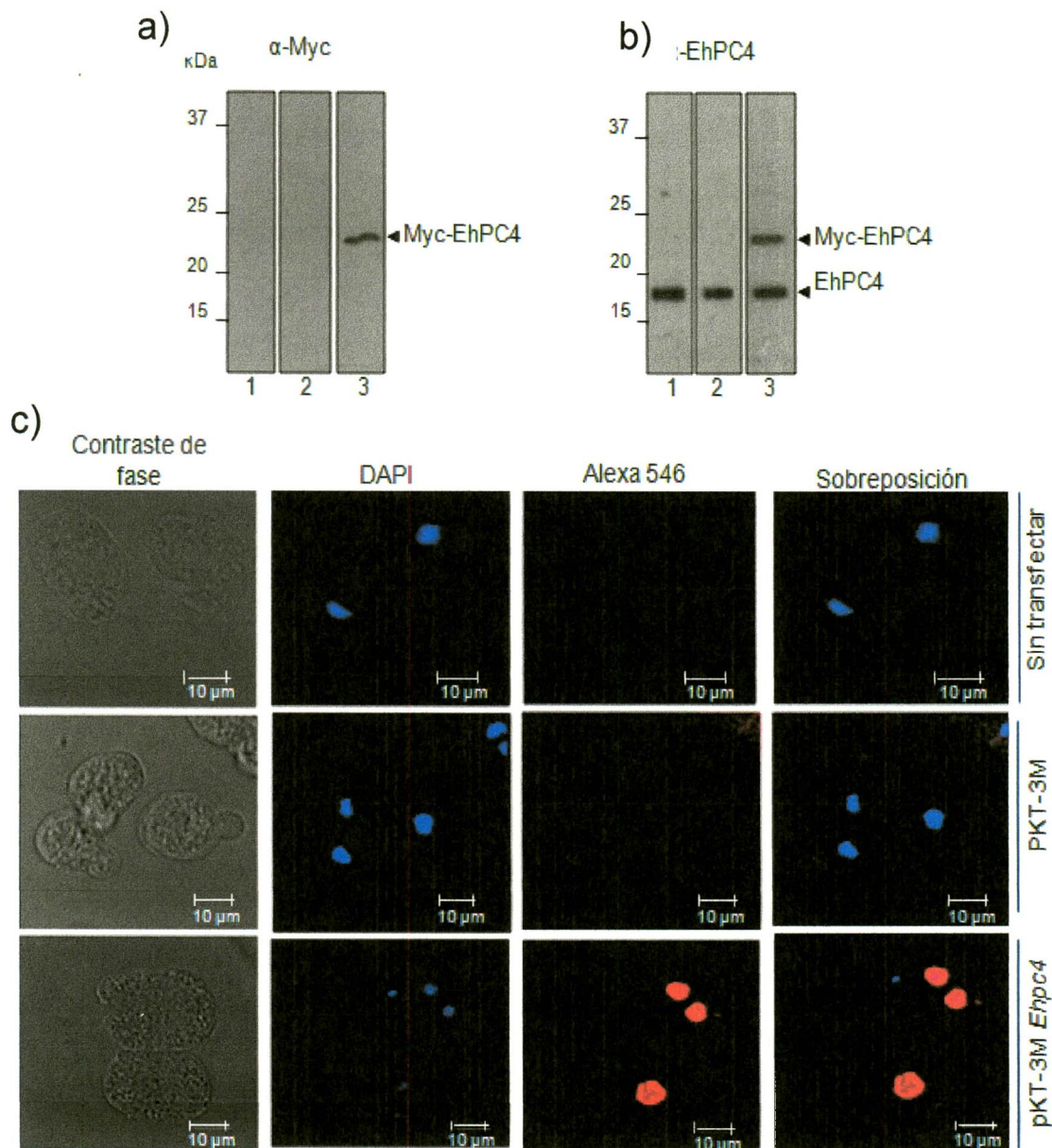


Figura 18. Expresión de la proteína de fusión Myc-EhPC4 en trofozoítos de *E. histolytica*. Inmunodetección por western blot de la proteína de fusión Myc-EhPC4, usando anticuerpos α -Myc (a) y de la proteína endógena EhPC4 usando anticuerpos α -EhPC4 (b), en células sin transfectar, transfectadas con el plásmido pKT-3M y con el plásmido pKT-3M EhPC4. Carril 1, extractos totales de trofozoítos sin transfectar; Carril 2, extractos totales de trofozoítos transfectados con el plásmido vacío pKT-3M; Carril 3, extractos totales de trofozoítos transfectados con el plásmido pKT-3M EhPC4. C) Análisis de la localización subcelular de la proteína Myc-EhPC4 por inmunofluorescencia y microscopía confocal, usando anticuerpos anti-Myc (1:200) y Alexa 546 (1:200). La contratinción del núcleo se realizó con DAPI.

8.5 La sobreexpresión de EhPC4 modifica el perfil proteómico de los trofozoítos.

Para analizar el efecto de la sobreexpresión de EhPC4 sobre el proteoma de *E. histolytica*, e identificar potenciales blancos moleculares, comparamos los perfiles de expresión de proteínas obtenidos de célula transfectadas con el plásmido pKT-3M y pKT3M EhPC4, mediante geles de electroforesis en dos dimensiones. Primero, se realizó la extracción de proteína total a partir de cultivos de trofozoítos Myc-EhPC4 y control en estado basal, y se analizó su integridad en gel de poliacrilamida (Figura 19a, panel a). 500 µg de proteína total fueron resueltos y analizados en geles de electroforesis en dos dimensiones (Figura 19, panel b y c). Notablemente, todos los perfiles que obtuvimos fueron altamente reproducibles (coeficiente de correlación promedio de 0.871). Los resultados mostraron que el número de spots detectados en las réplicas de las células pKT-3M and pKT-3M-EhPC4 fueron en promedio 488 y 493, respectivamente. Con el uso del programa Melanie analizamos y comparamos la abundancia de las proteínas en ambas condiciones. Con este análisis identificamos 33 proteínas diferencialmente expresadas ($FC > 2.0$; $p < 0.05$) como consecuencia de la sobreexpresión de EhPC4 en los trofozoítos de *E. histolytica*, de las cuales, se eligieron arbitrariamente 21 para su identificación a través de espectrometría de masas en tándem (Figura 20).

Se lograron identificar 17 proteínas, 11 sobreexpresadas y 6 subexpresadas en las células Myc-EhPC4 (Tabla I y II), las cuales están involucradas en diversos procesos celulares. Interesantemente, cuatro de las que resultaron sobreexpresadas como respuesta a la sobreexpresión de EhPC4 participan en la organización del citoesqueleto de actina: *Ehactin* (spot 8), *EhLimA* (spot 10), *EhMAEBL* (spot 19) y una proteína de unión a actina de la familia cofilina/tropomiosina (spot 26). Actina es una proteína multifuncional que participa en muchos procesos celulares en eucariontes, incluyendo la organización del citoesqueleto, movilidad celular y citocinesis ^[66], y en *E. histolytica* ha sido bien establecido su papel en la dinámica del citoesqueleto, motilidad celular, adhesión y fagocitosis ^[67,68]. *EhLimA* es una proteína con un dominio LIM, que se asocia directamente con el citoesqueleto de actina y las balsas lipídicas, por lo que se ha propuesto que forman parte de un sistema molecular que conecta el citoesqueleto de actina con la membrana celular en *E. histolytica* ^[69]. *EhMAEBL* es la proteína homóloga de la proteína transmembranal de unión a eritrocitos MAEBL de *Plasmodium falciparum*, que se ha reportado como esencial para el reconocimiento de eritrocitos e invasión de las glándulas

salivares de *Anopheles*, el paso crítico para la transmisión del parásito [70]. Por otro lado, las proteínas de unión a actina de la familia cofilina/tropomiosina están involucradas en la dinámica del citoesqueleto de actina durante la migración y citocinesis en células eucariontes [71], y su habilidad para unirse y promover la despolimerización de la actina es inhibida por fosforilación a través de la proteína cinasa LIM-1, una cinasa de serina/treonina que contiene un dominio LIM. Más aún, se ha reportado que la sobreexpresión de la cofilina en células de adenocarcinoma de colon humano afecta la organización del citoesqueleto y migración [72].

Para determinar si los cambios observados en la expresión de las proteínas son resultado de una regulación a nivel transcripcional, analizamos la expresión de los genes correspondientes mediante RT-PCR. Como se muestra en la Figura 21, la mayoría de los cambios de expresión a nivel de RNA mensajero fueron consistentes con los datos proteómicos, indicando que los niveles de proteína son en general un reflejo de la modulación transcripcional de los genes. Sin embargo, en algunos casos, los niveles de expresión del RNA mensajero no correlacionaron con la abundancia de las proteínas (por ejemplo, el gen *TolA*), lo que sugiere que otro mecanismo de regulación de la expresión génica, como el traduccional, puede ser el responsable.

8.6 La sobreexpresión de EhPC4 induce la formación de estructuras de F-actina, migración celular y destrucción de células de colon humano.

La actina y las proteínas de unión a actina son componentes del citoesqueleto que tienen un papel crítico en un amplio rango de procesos celulares, que incluyen migración celular, división celular y regulación de la expresión génica. Estas funciones son atribuidas a la habilidad de la actina para formar filamentos que rápidamente se ensamblan y desensamblan de acuerdo a las necesidades celulares. Durante la migración se incrementa la polimerización de la actina para generar los filamentos necesarios que soporten la fuerza para la motilidad celular, por lo que existe una relación entre la tasa de locomoción celular con la cantidad de actina en estado polimerizado [73, 74]. Los datos obtenidos por proteómica evidenciaron la sobreexpresión de proteínas del citoesqueleto de actina en las células Myc-EhPC4 (actina, LimA, proteína de unión a actina tipo cofilina, MAEBL). Por esta razón, analizamos la dinámica del citoesqueleto de trofozoítos Myc-EhPC4 mediante ensayos de inmunofluorescencia, utilizando faloidina rodaminada, la cual se une a los filamentos de actina de manera específica a la F-actina.

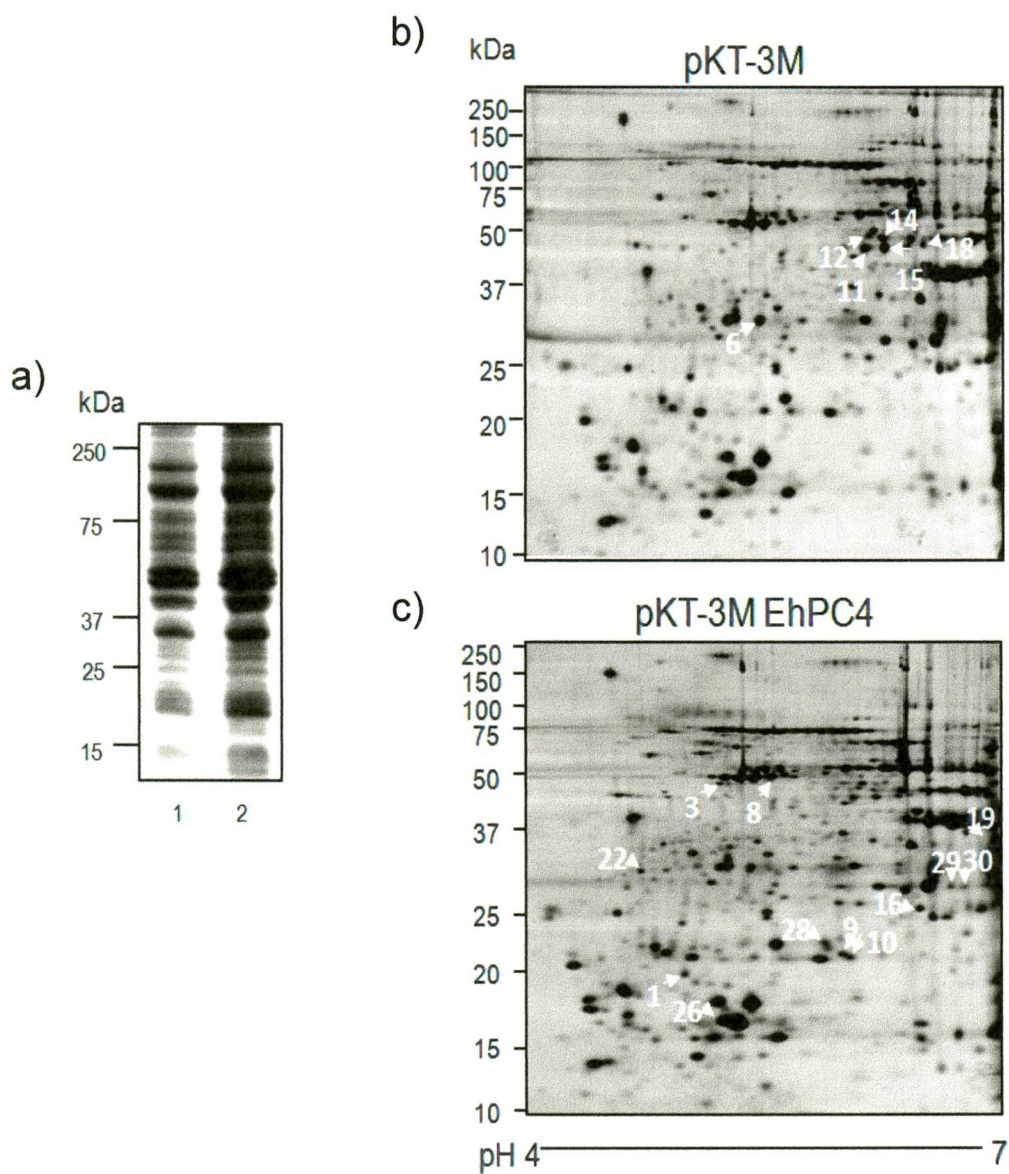


Figura 19. Comparación de los perfiles proteómicos de trofozoítos de *E. histolytica* transfectados con los plásmidos pKT-3M y pKT-3M-EhPC4. a) Análisis de la calidad de los extractos proteicos totales obtenidos a partir de células Myc-EhPC4 (carril 1) y control (carril 2). Imágenes representativas de los perfiles proteómicos de células transfectadas con los plásmidos pKT-3M (b) y pKT-3M-EhPC4 (c), donde se señalan con flechas las proteínas expresadas diferencialmente identificadas.

Tabla I. Proteínas sobreexpresadas en trofozoítos Myc-EhPC4.

Proteína (número de spot)	Peso molecular/pI	Número de acceso	Mascot score	Número de péptidos	Cobertura (%)	MS/MS secuencia de los péptidos (ion scores)	Función
S-phase kinase associated protein 1A (1)	18.8 / 4.98	C4M0Y3	125	4	30	TTFTVTEACANQSVLVQSLMK (33), EIMEQIR (33), EYLNEQD EYTPEELEELKK (42)	Degradación de proteínas, transducción de señales y transcripción.
Hypotetical protein (3)	41.57/5.31	B1N569	139	3	8	NEVFEIK (29), SQETINQIEIMK (73), ISIEEMIMK (44)	Desconocida.
Actin (8)	42.0/5.26	Q9TYD6	654	16	35	AVFP SIVGRPR (38), VAPEEHPVLLTEAPMNP (94), TTGIV MDSGDGVSHTVPIYEGFSLPHAILR (109), DLDYLMK (38), GYAFTTTAER (29), LCYVAEDFNEMQK (66), SYELPDGQVITVGN (110), LEKEMIQ LAPPTMK (22), EYDESGPAIVHR (118)	Citoesqueleto, motilidad celular, división celular, citocinesis y señalización celular.
Bacterial transferase heptapeptide (9)	19.33/5.41	C4M079	228	5	32	SSQQFIPHNQVNP (51), TVIPDNLVLMGSPAK (94), EKE FEYLK (51), ENIKEYDDIK (44), QGYHLEQPQNG (48)	Desconocida.
LIM zinc finger domain containing protein (10)	16.3/5.36	C4LWF5	172	3	30	NFFFDQGTQAVYCK (62), ATATAVTDIAIK (83), GAGGKPHSV VFGDSSER (29)	Proteína de membrana que interactúa con actina.
N-acetyl muramidase (16)	24.37/6.06	C4MAZ9	365	9	35	HALAALVAFTNDGK (98), FNFNSLK (36), VRTEDLPHHGVI E I R (23), TLNQQT FNELMGATINLGEPI MLT GK (80), NVPVAVC DASIK (58)	Enzima bacteriolítica.
Hypothetical with MAEBL domain (19)	33.59/6.18	C4LYU4	489	8	28	FGEFDPENHADGCSLDELNIHR (72), ILEHYNEHOTIQQFR- (95), LINAP QGAQSAEMQK (107), AQEMVDQVSVLLNEAVK (95), KMEEAEEYLNQK (64)	Proteína de unión a eritrocitos.
Eukaryotic translation initiation factor 6 (22)	26.26/4.71	C4M2Q1	550	12	54	AEYENSTDIGVFTK (82), YCITAPGSSSYK (32), IIEQEVSPK (57), GLLLPNTCNDQELLHLR (78), NSLPDDVVQR (80), HTVGGNPLVGTYSVITNK (109) GAMLAPNTTQEQEEIQTILQVPLVAGTVNR (53), LRNETDVQFASVMELMK (54)	Traducción.
actin-binding protein, cofilin/tropomyosin family (26)	16.49/5.23	C4LVQ1	425	14	79	MVEVEIVEKEK (59), FQEIMSK (27), KLVVAGSGEGGVDELK (113), DTGIYAFAR (54), DFDKIDDSICVK (79), FAFIEFIGDKSPR (52), AGVGMQLSSIQDQGFQFHITHMCSLDEVS AEI I LAK (55), NASGSASHVL (10)	Polimerización de actina, motilidad celular, interacciona con actina.
Transcription factor BTF3, putative (28)	19.35/6.69	C4M2W9	60	1	6	AAQAQIEITK (82)	Transcripción.
Triosephosphate isomerase (29 y 30)	28.18/5.89	O02611	489	8	23	GVAASVDAELAK (83), KVEVIVGVFFIYIPK (86), VIACIGETEQR (78), IANQTEEVVAQLK (101), TATPDQAQEVHOYIR (73), KADIDGFLVGGASLDAK (46)	Glicolisis y producción de energía.

Tabla II. Proteínas subexpresadas en trofozoítos Myc-EhPC4.

Proteína (número de spot)	Peso molecular/pI	Número de acceso	Mascot score	Número de péptidos	Cobertura (%)	MS/MS secuencia de los péptidos (ion scores)	Función
Transcription factor BTF3 (4)	19.24/6.69	C4M2W9	350	12	29	TLRGOQIGGIDECEMIQK (29), IMCTNEGCVFFVTGANKVEEMTEEQFNK (115) AAQAQIEEITK (67), QFAAPASTEELK (69)	Transcripción.
Cistein protease 1 (6)	35.54/5.8	Q01957	695	22	41	VTPIR DQGNCGSCYTFGSIAALEGR (89), LLIEKGGSETLDLSEEHMVQCTR (23), EDGNNGCNGGLGSNVYNYMENGIAK (57), ESDYPYTGSDSTCRSDVK-198 (18), NNYFALNHEVCAVGYGVVDGK (95), ECWIVR (40), NSWGTGWGEK (39)	Peptidasa, degradación de proteínas.
Fe-S cluster assembly protein NifU (11 y15)	39.58/5.71	Q8MU40	786	23	34	LIGGALWEHYSK (75), VIVADWGAECGDAVR (72), MYWGVNPK (49), ITNLDVER (54), DSPDVPVPPQK (68), MHCSVMSYDVVK (29), GNVVEDLDDEEIVCSCAR (112), TVEDITHYTK (50), KYLEDILR (48), KDGGSEVVEVK (59), KIIVIPVDLPHTHDDDLIEQLENETLNIK (74)	Metabolismo, reparación de DNA y transcripción.
Cysteine desulfurase (12)	43.00/5.92	Q76917	996	29	61	SVYLDNNAITMVDPEVLNSMLPYFSEIYGNPNSLHAFGQK (58), IIVSQIEHPSISESEK (103), MPVNEDGVVDPK (100), IAHDHGALFHSDATQAMGK (93), DVPVDYLFTFAHK (66), GVGALFIR (64), AGKPITPLLHGGEQMGGLR (50), SGTIDTPSVVGMVAVALKK (39), ATHDINIENITYVR (98), DKLEAALR (35), TIPDVTIVGKPELR (101), VPNTLVAFK (81), HGIAASTGSACASESLQANPTFK (64), FGEDLSHTGIR (66), FNTEEEEDYTIIDIKK (21)	Metabolismo de L-cysteina.
Aspartate ammonia ligase (14)	40.24/5.75	C4LT17	527	18	39	NLTYDLDLLR (17), GMNNSVEVHSLAK (64), TEEYICNEYSQ LKR (25), EITFLHTEDMEKEYPNLSPK (74), YGAVCVIGIGYPLPSK (58), EKFMFHQMLLK (14) GELPLSIGGGIGQSR (84), LCMFYLQK (36), AHIGEIQASWVNHETK (34), EQLAQHNIFLL (19)	Traducción.
TolA-like (18)	38.27/6.2	C4M3R7	217	7	12	VANAPOGDNTAELDK (24), IETAGLVAK (29), NAAIQELAK (49), LDSEDDLPLRR (68)	Desconocida.

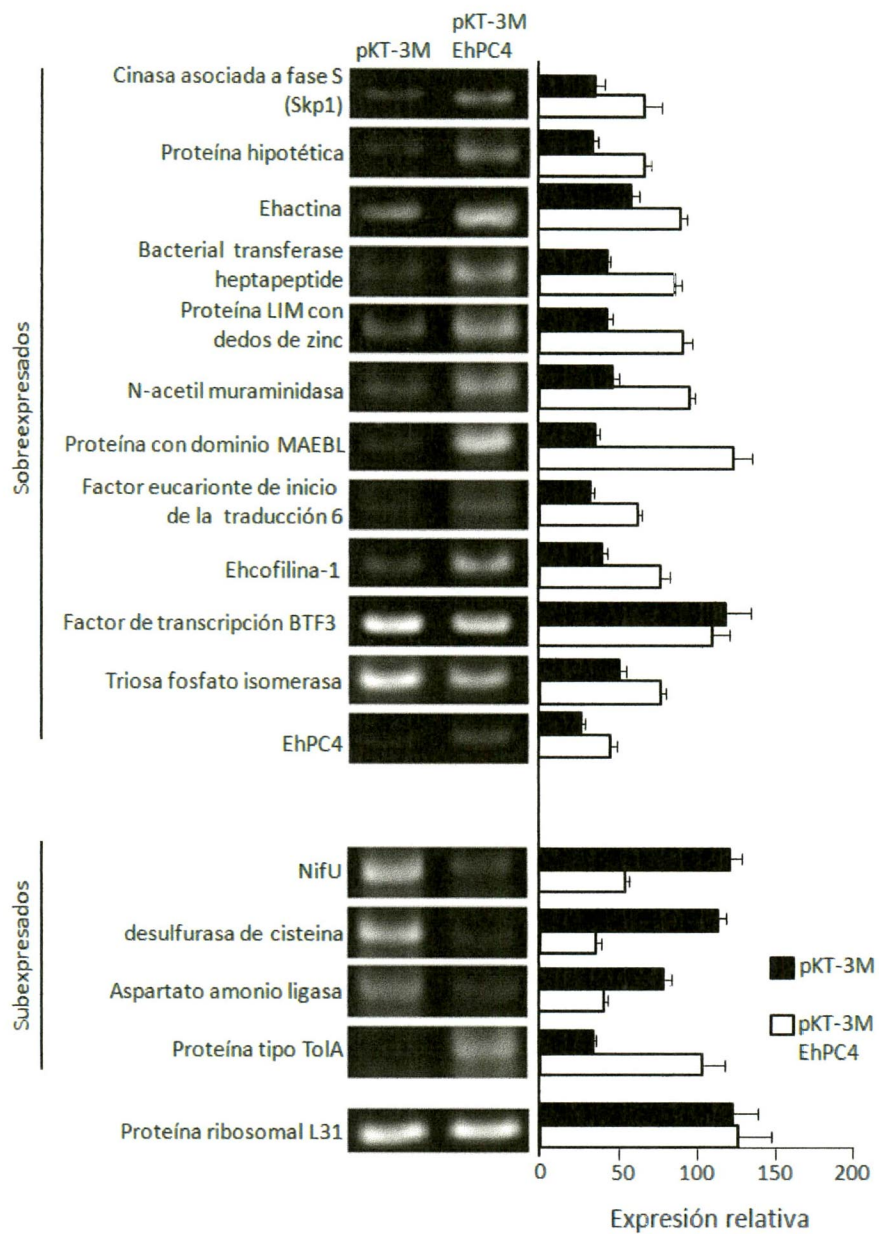


Figura 21. Análisis por RT-PCR de los genes que codifican a las proteínas identificadas como moduladas en células Myc-EhPC4.

Los resultados mostraron que los trofozoítos Myc-EhPC4, a diferencia de las células control, presentaron una alta frecuencia de estructuras de superficie, como pseudópodos, característicos del proceso de polarización celular que se da previo al movimiento celular (Figura 22a). Estos datos nos sugirieron que las células pKT-3M EhPC4 podrían tener un incremento en procesos celulares relacionados con la dinámica del citoesqueleto de actina, tal como motilidad celular y migración. Para probar esta hipótesis analizamos la migración mediante el uso de cámaras transwell. Los resultados mostraron que la sobreexpresión de EhPC4 produjo incremento en las tasas de migración de casi cuatro veces (Figura 22b). Debido a que la motilidad celular de *E. histolytica* es crucial para la sobrevivencia y permanencia del parásito en la mucosa intestinal humana, así como para inducir daño durante la invasión a otros tejidos tal como hígado y cerebro, investigamos *in vitro* la capacidad de los trofozoítos Myc-EhPC4 de destruir monocapas de células SW480 de colon humano. Los resultados indican que los trofozoítos Myc-EhPC4 presentaron un ligero pero significativo incremento en su capacidad de destrucción de monocapas celulares, en comparación con los trofozoítos control (Figura 22c y d).

8.7 La sobreexpresión de EhPC4 incrementa la migración celular de *E. histolytica* a través de la sobreexpresión de *EhABP16*.

La proteína unión a actina de la familia cofilina/tropomiosina, que se encuentra sobreexpresada en las células Myc-EhPC4, es codificada por un gen que no contiene intrones de 441 nucleótidos, el cual produce una proteína de 146 residuos de aminoácidos y un peso molecular predicho de 16 kDa. Contiene dos dominios sobrelapados, uno ADF-H (residuos 3-136) y otro cofilina-ADF (residuos 13-135), así como una región de unión a la F-actina en su extremo C-terminal (Figura 23a). Esta proteína, a la cual denominamos *EhABP16*, al estar implicada en la dinámica del citoesqueleto de actina podría contribuir a la migración potenciada de las células Myc-EhPC4.

Para analizar el papel de *EhABP16* en la migración de los trofozoítos de *E. histolytica*, silenciamos su expresión mediante RNA de interferencia (Figura 23, paneles b y c). Para esto, incubamos los trofozoítos con RNAs de doble cadena que tienen una secuencia complementaria a los RNAs mensajeros del gen *EhABP16* (dsRNA *EhABP16*). Posteriormente, investigamos los efectos de la disminución de *EhABP16* en la dinámica del citoesqueleto de actina, tiñendo la F-actina con faloidina rodaminada, y analizando por inmunofluorescencia y microscopía confocal su distribución.

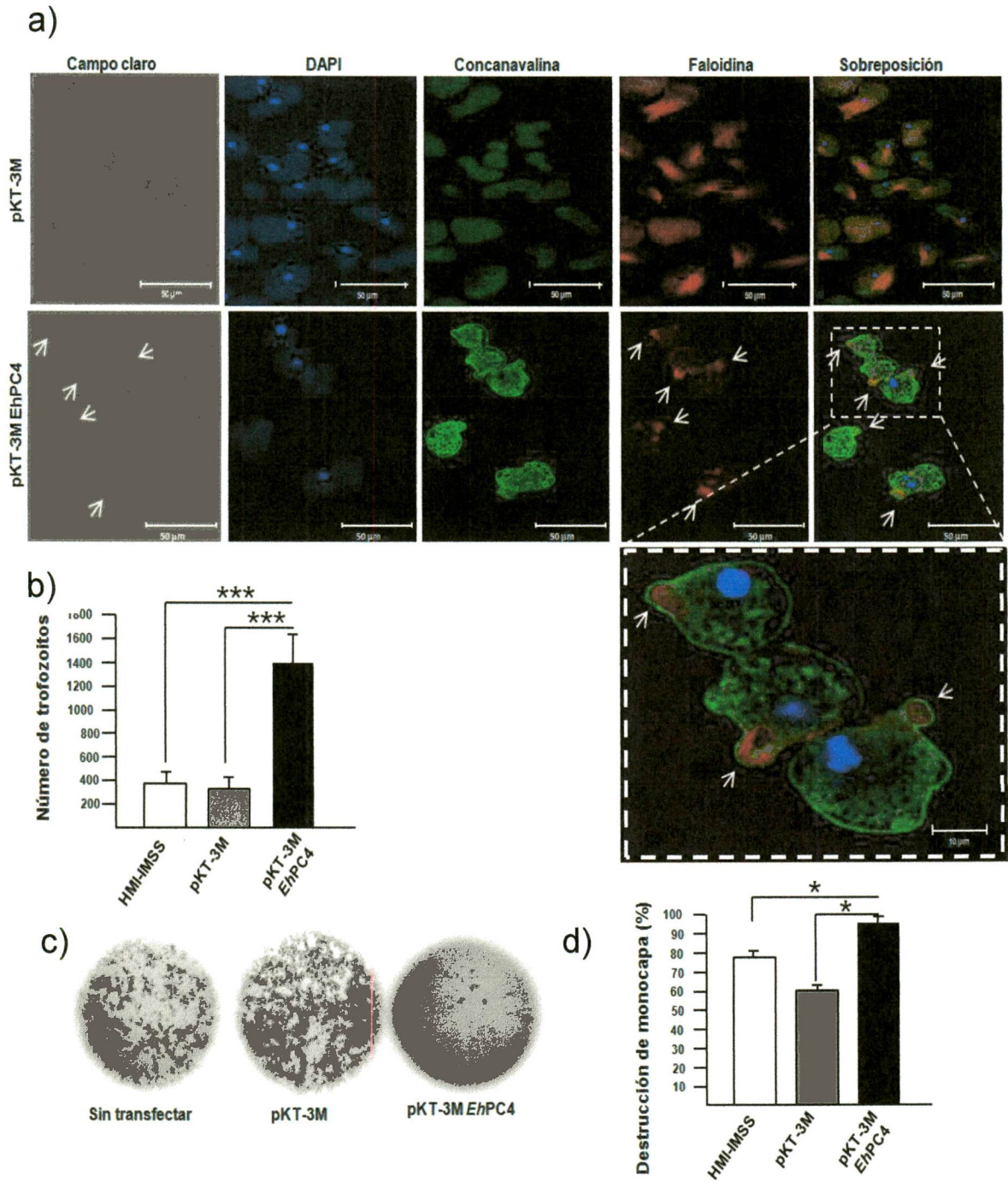


Figura 22. Efecto de la sobreexpresión de EhPC4 sobre la formación de estructuras de F-actina, migración celular y capacidad de destrucción de células de colon humano en trofozoitos de *E. histolytica*. a) Comparación de los patrones de distribución de F-actina, teñida con faloidina rodaminada (1:50), en células transfectadas con el plásmido vacío pKT-3M y pKT-3M EhPC4. La contratinción del núcleo se realizó con DAPI. Comparación de la capacidad de migración (b) y de destrucción de células SW480 (c), en células sin transfectar, transfectadas con el plásmido vacío pKT-3M y con el plásmido pKT-3M *Ehpc4*. d) Cuantificación del experimento correspondiente al panel c.

Los resultados del silenciamiento mostraron una clara disminución en la intensidad de la señal y los patrones de tinción en comparación con las células control (dsRNA GFP). Las células control se caracterizaron por puntos fluorescentes intensos de F-actina que decoran la célula, y un anillo periférico brillante típico de la red de actina lamelipodial. Por el contrario, las células donde se silenció la proteína *EhABP16* mostraron una morfología desigual y de tamaños irregulares, la F-actina se encontró esencialmente dispersa por todo el citoplasma y se formaron muy pocas estructuras (Figura 23d). En concordancia con estos resultados, los trofozoítos deficientes de *EhABP16* mostraron una enorme reducción en su capacidad de migración, en comparación con las células control (Figura 23e). Estos datos en su conjunto indican que el silenciamiento de la proteína *EhABP16* perturba en gran medida la polimerización de la actina, lo que lleva a la deslocalización de la F-actina, disminución de estructuras y organización del citoesqueleto, así como pérdida de polaridad y alteraciones en la morfología celular. Todo esto resultando en una drástica disminución de la migración celular.

8.8 La sobreexpresión de EhPC4 incrementa la proliferación celular y la replicación del DNA en trofozoítos de *E. histolytica*.

Para continuar con los análisis de los efectos biológicos producidos como consecuencia de la sobreexpresión de la proteína EhPC4 en trofozoítos de *E. histolytica*, comparamos la tasa de crecimiento de las células Myc-EhPC4 con células control (células sin transfectar y transfectadas con el plásmido vacío) en condiciones basales de cultivo. Interesantemente, observamos que las células Myc-EhPC4 incrementan significativamente su tasa de crecimiento a partir del segundo día en cultivo (Figura 24a). Las diferencias en las tasas de crecimiento celular no fueron debidas a diferencias en la viabilidad celular (Figura 24b). Así mismo, observamos un ligero incremento en el tamaño celular, de un promedio de 23 μM de diámetro en las célula control, a 28-37 μM en las células Myc-EhPC4 (Figura 24c). Se ha reportado previamente que un incremento en la proliferación y tamaño celular, pueden estar relacionadas con un incremento en la replicación y contenido de DNA ^[75]. En concordancia con esta hipótesis, encontramos que los cultivos de células Myc-EhPC4 exhibieron un incremento, de casi dos veces, en la tasa de incorporación de BrdU en comparación con las células control (Figura 24, paneles d y e), lo que es indicativo de una incrementada capacidad replicativa del DNA.

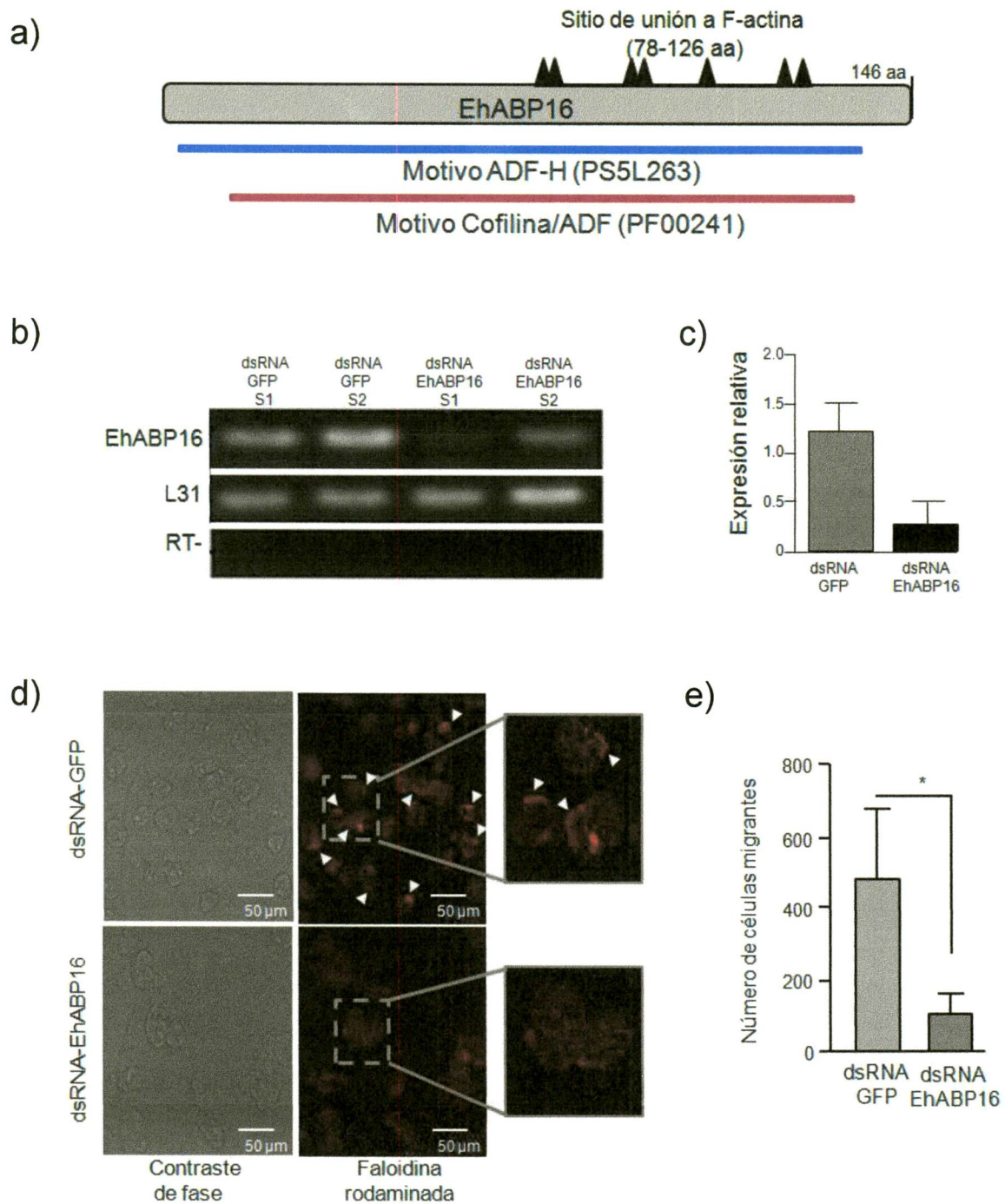


Figura 23. Efecto del silenciamiento de EhABP16 en trofozoítos de *E. histolytica*. a) Estructura molecular de la proteína EhABP16. b) Análisis del silenciamiento del gen EhABP16 mediante RT-PCR. c) Cuantificación por densitometría del silenciamiento del gen EhABP16, correspondiente al panel b. Análisis del efecto del silenciamiento de EhABP16 sobre los patrones de distribución de F-actina (d) y migración (e) de trofozoítos de *E. histolytica*. dsRNA-GFP, células incubadas con RNA de doble cadena específico para la proteína GFP, utilizadas como control negativo de silenciamiento; dsRNA-EhABP16, células incubadas con RNA de doble cadena específico para la proteína EhABP16.

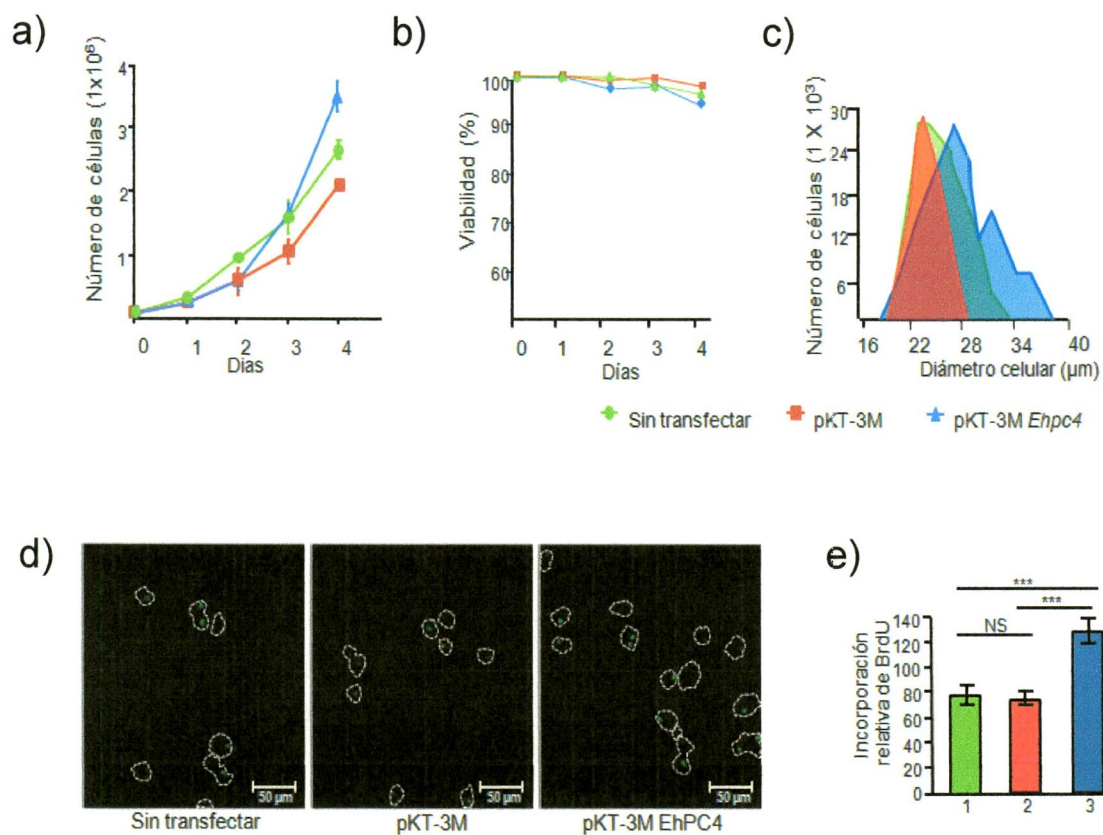


Figura 24. Efecto de la sobreexpresión de EhPC4 en la tasa de crecimiento, viabilidad, tamaño celular e incorporación de BrdU de trofozoítos de *E. histolytica*. Comparación de la proliferación celular (a), viabilidad (b) y tamaño (c) de trofozoítos sin transfectar, transfectados con el plásmido vacío y transfectados con el plásmido pKT-3M. Análisis de la incorporación de BrdU mediante microscopía de fluorescencia usando un anticuerpo anti-BrdU conjugado con Cy2 en trofozoítos sin transfectar, transfectados con el plásmido vacío y transfectados con el plásmido pKT-3M. Las líneas punteadas perfilan el contorno celular. e) Cuantificación de la incorporación de BrdU, correspondiente al panel d, de 250 células elegidas al azar en cada experimento.

8.9 La expresión incrementada de EhPC4 resulta en multinucleación y defectos en la citocinesis.

Durante nuestros experimentos con cultivos de células Myc-EhPC4 descubrimos accidentalmente que éstos exhibían una mayor proporción de células multinucleadas, en comparación con las células sin transfectar y transfectadas con el plásmido vacío. Se ha descrito que bajo condiciones de crecimiento axénico y durante la proliferación celular, los trofozoítos de *E. histolytica* contienen cantidades heterogéneas de DNA, que puede estar en un sólo núcleo o distribuido en múltiples núcleos ^[63,76]. Un método para reducir el número de núcleos y la inherente heterogeneidad en el contenido de DNA de los trofozoítos en cultivo consiste en sincronizarlos privándolos de suero durante 12-13h ^[77]. Para corroborar de manera experimental nuestra observación, primero sincronizamos los cultivos por ausencia de suero, esto es para poder partir de cultivos más homogéneos y comparables. Después de la sincronización, se analizó el contenido de DNA por citometría de flujo de los trofozoítos sincronizados, para verificar la efectividad del tratamiento (Figura 25a, pKT-3M 0h y pKT-3M-EhPC4 0h). Después de la sincronización se adicionó medio completo, y a diferentes tiempos (0, 24, 48, 72 y 96 h) los trofozoítos fueron cosechados para hacer un análisis del número de núcleos por célula.

Los resultados mostraron que existe un incremento gradual en la aparición de células multinucleadas conforme al tiempo post-sincronización (Figura 25b). La aparición de células con tres o más núcleos (referidas aquí como células multinucleadas) fue observada desde las 24 y 48 h post-sincronización en las células Myc-EhPC4 (con un porcentaje del 0.7 y 4.7%, respectivamente), en comparación con las células sin transfectar (1.3% a las 72 h) y transfectadas con el plásmido pKT-3M (2.0% a las 48 h). Después de 96 h post-sincronización, el número de células gigantes multinucleadas fue del 27.4% en las células Myc-EhPC4, y de manera sobresaliente se observó que varias alcanzaron hasta 16 núcleos por célula (Figura 25c). Es poco probable que estas diferencias observadas se debieran a un retardo en la aparición de células multinucleadas o a diferencias en la confluencia de los cultivos control, ya que no se detectaron diferencias significativas en tamaño y número de núcleos por células cuando los trofozoítos control fueron cultivados hasta 120 h, alcanzando una confluencia del 100%.

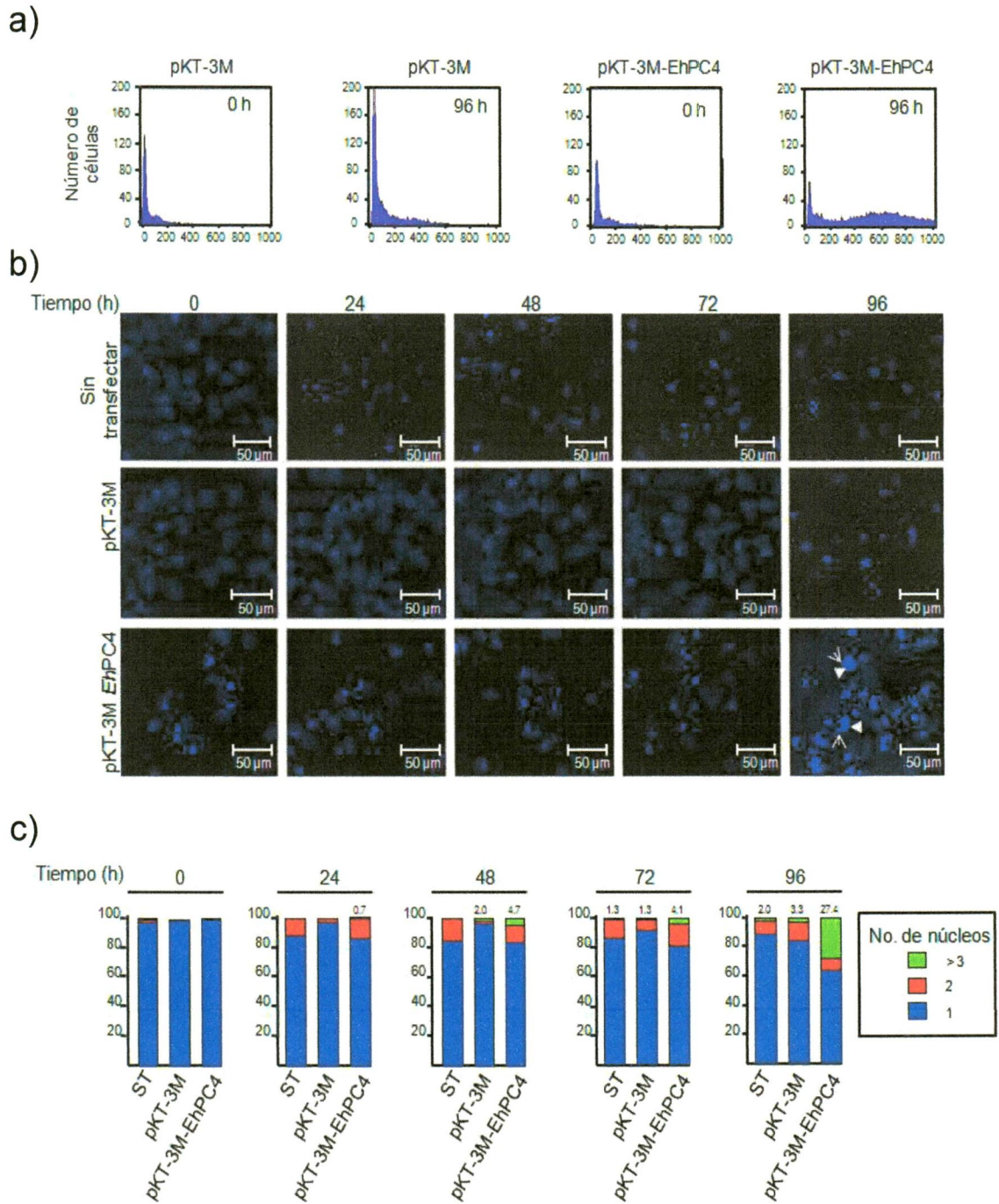


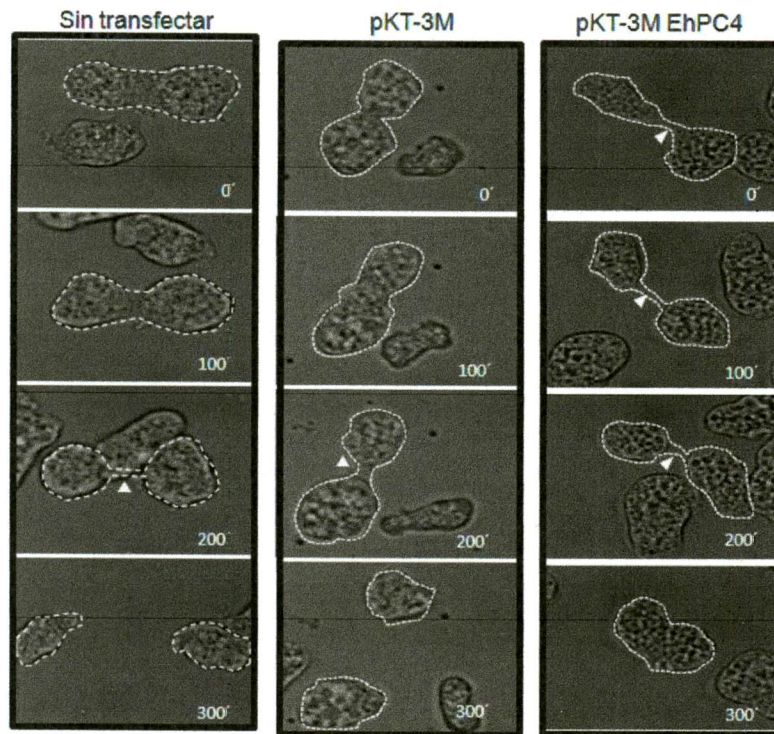
Figura 25. Análisis del contenido de DNA y multinucleación de células Myc-EhPC4. a) Comparación de la intensidad de yoduro de propidio (contenido de DNA) de los cultivos de *E. histolytica* transfectados con el plásmido pKT-3M y pKT3M EhPC4 a las 0 y 96 h post-sincronización por escasez de suero. b) Análisis del número de núcleos por célula a diferentes tiempos (0, 24, 48, 72, 96 h) post-sincronización, en cultivos de *E. histolytica* sin transfectar, transfectados con el plásmido pKT-3M y transfectados con el plásmido pKT3M EhPC4. c) Cuantificación de número de núcleos por célula, correspondiente al panel b.

El fenotipo de multinucleación observado en las células Myc-EhPC4 puede ser resultado de la fusión de varias células que dan lugar a la formación de sincitios celulares, o bien, por fallas en la citocinesis. Para analizar estas posibilidades, se adquirieron videos de células vivas, de los diferentes cultivos, que pasaran por división celular. Los resultados revelaron que en promedio, el 7 de 10 células no transfectadas y 8 de 10 células pKT-3M analizadas mostraron la secuencia normal de eventos que concluyen en la formación de dos células hijas (Figura 26a). En la Figura 26a se observa una secuencia de imágenes representativas de la citocinesis en células sin transfectar. Al principio se forma un surco de división que separa el citoplasma en dos partes (0-100 s), cada una de las partes tira en dirección opuesta causando tensión en la constricción y formando un delgado puente citoplásmico (200 s) el cual eventualmente se estira y se rompe mecánicamente para dar lugar a dos claramente distinguibles células hijas (300 s). En los cultivos Myc-EhPC4 se observó que una gran porcentaje, 9 de 10 trofozoítos analizados no concluyeron su división celular (Figura 26b). La Figura 26a muestra imágenes representativas de la citocinesis en células pKT-3M EhPC4, donde se observa la formación del surco de división (0 s), que comienza a adelgazarse para dar lugar al puente citoplásmico (100-200 s), sin embargo, el puente citoplásmico eventualmente se contrae nuevamente sin que se lleve a cabo la citocinesis (300 s). Estas células intentaron dividirse de manera repetida varias veces sin éxito (al menos hasta una hora después de la grabación de los videos). Estos análisis sugieren que la formación de células multinucleadas se lleva a cabo por fallas en la citocinesis, y no por fusión celular, y que la sobreexpresión de EhPC4 promueve la aparición frecuente de células con fallas en la citocinesis.

8.10 EhPC4 modula genes involucrados en el metabolismo de carbohidratos, de ácidos nucleicos, replicación del DNA y segregación de cromosomas.

Para investigar los efectos de la sobreexpresión de EhPC4 en la expresión global de genes de *E. histolytica*, comparamos mediante microarreglos de cDNA los perfiles de expresión génica de células pKT-3M y pKT-3M EhPC4. Sólo genes con valores de cambio >1.5 ($P < 0.05$) fueron considerados como modulados en las células Myc-EhPC4. El perfil transcripcional mostró que 328 genes se modularon significativamente (204 se sobreexpresaron y 124 disminuyeron su expresión) en células Myc-EhPC4 (Apéndice A y B, respectivamente). El gen *Ehpc4* se sobreexpresó 2.2 veces en las células Myc-EhPC4.

a)



b)

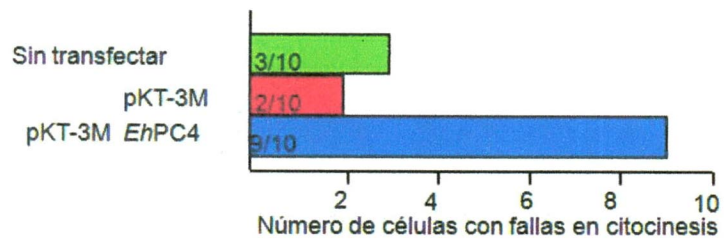


Figura 26. Análisis de la citocinesis de células Myc-EhPC4. a) Serie de imágenes representativas de los videos de células en cultivo que pasan por división celular. b) Cuantificación del número de trofozoítos con fallas en la citocinesis en cultivos de *E. histolytica* sin transfectar, transfectadas con el plásmido pKT-3M y transfectadas con el plásmido pKT-3M *Ehpc4*.

La clasificación de los genes sobreexpresados en categorías funcionales, hizo evidente que varios participan en la organización del citoesqueleto de actina (en concordancia con los análisis de proteómica) y en diversos procesos biológicos y rutas metabólicas tales como degradación y plegamiento de proteínas, transducción de señales, metabolismo de carbohidratos y ácidos nucleicos, traducción, transcripción, entre otros (Figura 27a). Además, encontramos que las células Myc-EhPC4 además sobreexpresan un grupo de genes que participan en replicación, recombinación y reparación del DNA, así como en división celular y segregación de cromosomas.

Para investigar si la proteína EhPC4 se une directamente a promotores de algunos de estos genes llevamos a cabo ensayos de inmunoprecipitación de la cromatina. Los resultados mostraron que la proteína EhPC4 se une *in vivo* a los promotores de los genes *Ehnudc*, *Ehcdc48*, *Ehstg1*, *Ehsmc*, *Ehcwf2*, *Ehodc1*, *Ehskip1* and *Ehdusp1*, sugiriendo que pueden ser blancos transcripcionales directos de EhPC4 (Figura 27b).

Interesantemente, nueve genes (*EhPGM*, *EhHK*, *EhGPI*, *EhALDO*, *EhTPI*, *EhGAP*, *EhPGK*, *EhENO* y *EhADH*) que codifican proteínas involucradas en la utilización de glucosa, fructuosa y manosa se sobreexpresan de manera significativa en las células. Esta observación sugiere que existe un incremento en el metabolismo de carbohidratos, lo cual puede ser necesario para soportar el aumento en proliferación celular observado previamente en las células Myc-EhPC4 (Figura 28). Cuatro genes (*EhNDK*, *EhDPD*, *EhPNP* y *EhPAPSS2*), que sus productos participan en el metabolismo de nucleótidos, se sobreexpresan también de manera significativa. Estos factores pueden intervenir para cubrir las demandas celulares de los trofozoítos Myc-EhPC4, los cuales presentan un incremento en la replicación del DNA (Figura 29).

8.11 La sobreexpresión de EhNUDC, promovida por la sobreexpresión de EhPC4, recapitula los defectos en la citocinesis y el fenómeno de multinucleación en *E. histolytica*.

NUDC es una proteína necesaria para el movimiento nuclear en *Aspergillus nidulans*, es parte del complejo dineina/NUDF que regula la organización de los microtúbulos y la formación del huso mitótico ^[78]. NUDC en mamíferos es importante para la proliferación en tejidos normales y tumorales, y su expresión es elevada en varios tipos celulares que están en división o que su proliferación ha sido estimulada ^[79]. De manera interesante, se ha observado previamente que su sobreexpresión en HeLa induce fallas en la citocinesis

y multinucleación ^[80]. A través de los análisis de microarreglos identificamos que el gen homólogo de *nudc* en *E. histolytica*, *Ehnudc*, estaba sobreexpresado en células Myc-EhPC4, lo cual abre la posibilidad de que esta proteína pudiera explicar el fenotipo de multinucleación observado en las células Myc-EhPC4. *EhNUDC* (C4M7J1) muestra 28% de identidad y 50% de similitud con su homólogo humano (Q9Y266). Al igual que hNUDC, contiene un dominio p23-NUDC-like (residuos 19-109) (Figura 30a). Para analizar la contribución de *EhNUDC* en la multinucleación, expresamos una proteína de fusión Myc-*EhNUDC* en trofozoítos de *E. histolytica*. Para esto, clonamos el gen *Ehnudc* completo en el plásmido pKT-3M y transfectamos con él trofozoítos de *E. histolytica*. Ensayos de western blot e inmunofluorescencia confirmaron la expresión de la proteína de fusión en las células Myc-*EhNUDC* (Figura 30, paneles b y c, respectivamente).

Notablemente, los cultivos Myc-*EhNUDC* presentaron trofozoítos más grandes con contornos irregulares (Figura 28d), y la proporción de células multinucleadas fue mayor en comparación con las células control pKT-3M (Figura 28e), aunque menor en comparación con las células Myc-EhPC4. La examinación de células Myc-*EhNUDC* que pasan por división celular reveló que el 30% muestra una secuencia normal de eventos que concluyen en una citocinesis exitosa, el 70% restante aborta la división celular después de varios intentos (Figura 28f). Estos resultados sugieren que el fenotipo de multinucleación observado en las células Myc-EhPC4 puede ser parcialmente explicado por la activación transcripcional de *EhNUDC* a través de EhPC4.

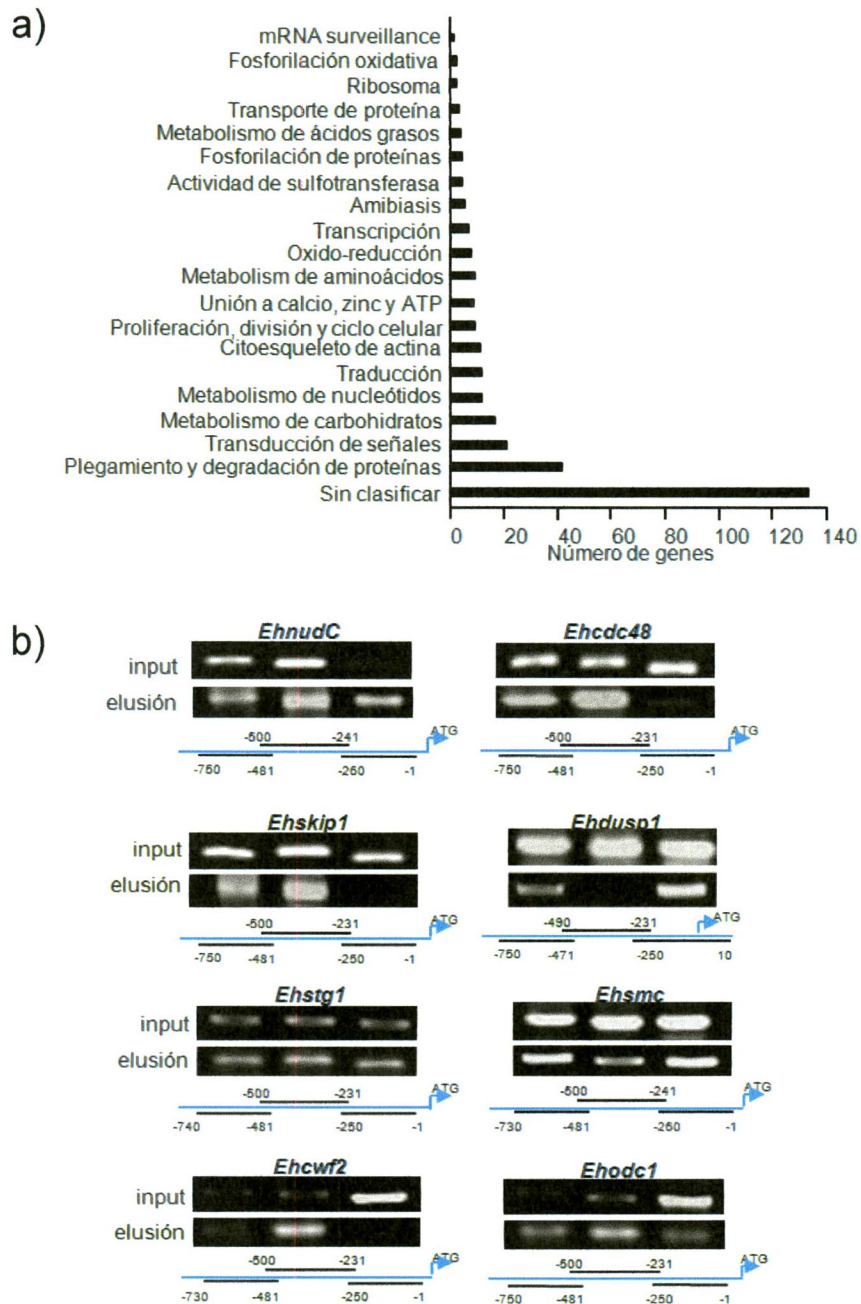
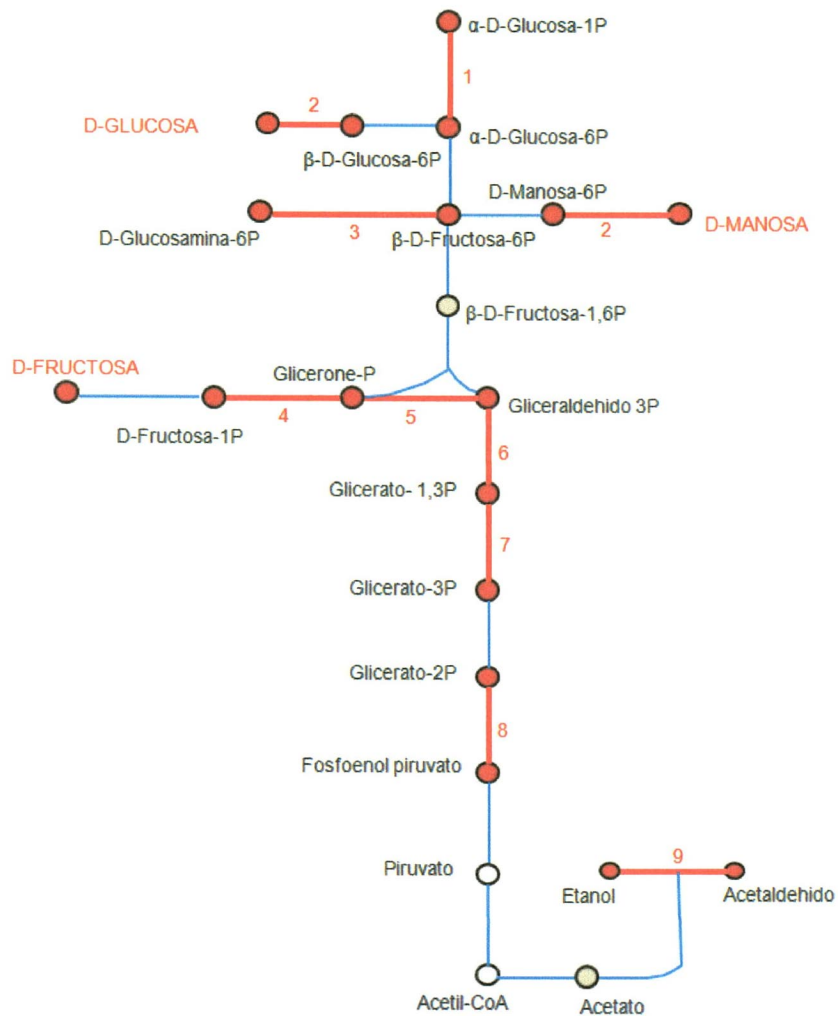
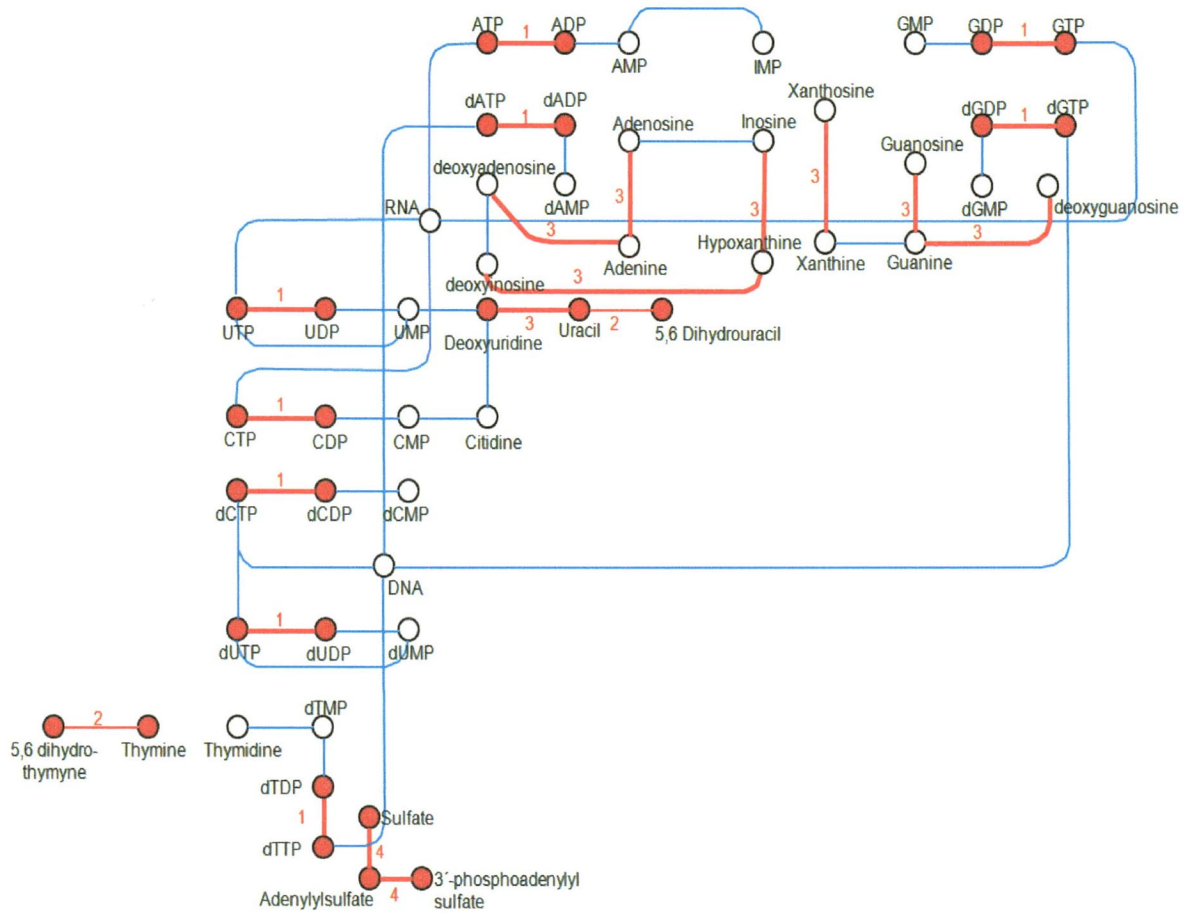


Figura 27. Clasificación GO de los genes sobreexpresados en las células Myc-EhPC4 en categorías funcionales (a) y análisis de la interacción de EhPC4 a los promotores de algunos de los genes implicados en división, ciclo celular y segregación de cromosomas (b) mediante inmunoprecipitación de la cromatina.



No.	Enzimas del metabolismo de carbohidratos	Gen	FC
1	Phosphoglucomutase (PGM)	EHI_110120	1.6
2	Hexokinase (HK)	EHI_098290	1.5
3	Glucosamine-6-phosphate isomerase (GPI)	EHI_174640	1.86
4	Fructose 1,6 bisphosphate aldolase (ALDO)	EHI_098570	2.04
5	Triosephosphate isomerase (TPI)	EHI_056480	2.04
6	Glyceraldehyde 3 phosphate dehydrogenase (GAP)	EHI_187020, EHI_00820	3.04 2.9
7	Phosphoglycerate kinase (PGK)	EHI_188180	2.45
8	Enolase (ENO)	EHI_130700	2.3
9	NADP-dependent alcohol dehydrogenase (ADH)	EHI_02311	2.01

Figura 28. Enzimas del metabolismo de carbohidratos sobreexpresadas en las células Myc-EhPC4. La predicción de la vía se hizo en KEGG (<http://www.genome.jp/kegg/>), usando los genes sobreexpresados en las células Myc-EhPC4 .



No.	Enzimas del metabolismo de nucleótidos (purinas y pirimidinas)	Genes	FC
1	Nucleoside diphosphate kinase (NDK)	EHL_104360	1.72
2	Purine nucleoside phosphorylase (PNP)	EHL_200080	1.59
3	Dihydropyrimidine dehydrogenase (DPD)	EHL_012980	1.95
4	Sufate adenylyltransferase	EHL_197160	3.17

Figura 29. Enzimas del metabolismo de nucleótidos sobreexpresadas en las células Myc-EhPC4. La predicción de la vía se hizo en KEGG (<http://www.genome.jp/kegg/>), usando los genes sobreexpresados en las células Myc-EhPC4 .

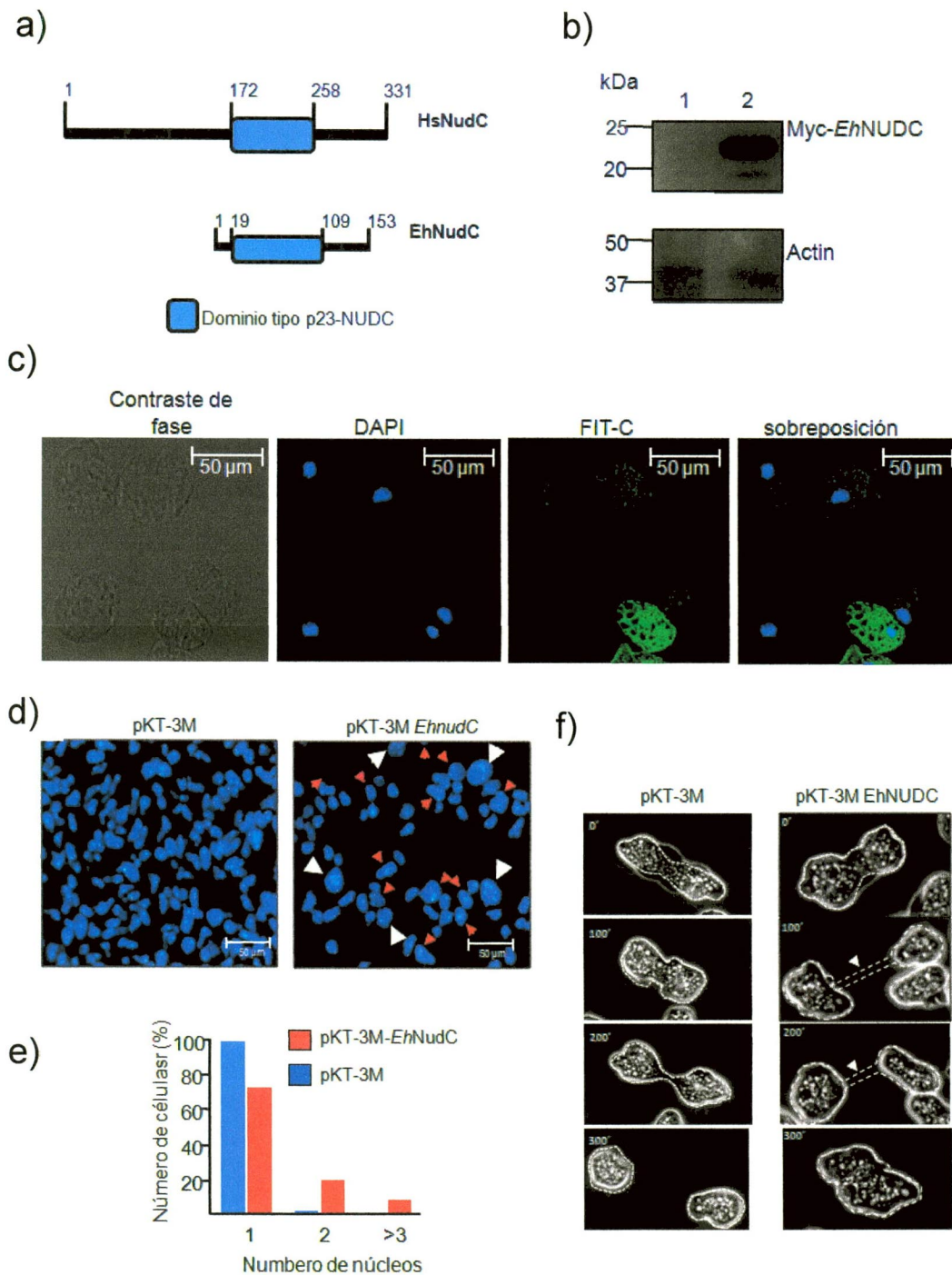


Figura 30. a) Comparación de la estructura molecular de NUDC de humano (hNUDC) y EhNUDC. Análisis de la expresión de la proteína *Myc-EhNUDC* mediante inmunodetección usando un anticuerpo α -Myc (b) e inmunofluorescencia empleando un α -myc de ratón y un α -ratón acoplado a FITC (c) en células *Myc-EhNUDC*. (d) Comparación del número de núcleos por célula a 96h post-sincronización por escasez de suero, de células transfectadas con el plásmido pKT-3M y transfectadas con pKT-3M *EhNUDC*. (e) Cuantificación del número de núcleos por célula, correspondiente al panel d. f) Serie de imágenes representativas de células en división transfectadas con el plásmido pKT-3M y pKT-3M *EhNUDC*.

9. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

PC4 es una proteína muy conservada a través de la escala evolutiva, lo que sugiere que ha tenido un papel importante en la biología de los organismos. Mediante análisis *in silico* observamos que EhPC4 comparte una alta similitud (76-61%) e identidad (30-46%) con proteínas PC4 de bacterias y de eucariontes, siendo el dominio de unión al DNA la región más conservada entre todas las proteínas ortólogas. Proponemos que esta proteína se originó en bacterias (el dominio PC4 bacteriano es más sencillo a nivel de estructura primaria) y posteriormente evolucionó y se diversificó en los organismos eucariontes (protistas, algas, hongos, plantas y animales).

El análisis de la estructura primaria de EhPC4 hizo evidente que esta proteína contiene en su extremo C-terminal un dominio de unión al DNA, constituido por una hoja- β de cuatro cadenas, y un dominio de dimerización conformado por una α -hélice. Dicha estructura es muy similar a PC4 de humano, lo que apoya la idea de que EhPC4 pudiera participar en funciones biológicas parecidas, tal como transcripción, procesamiento de los extremos 3'UTR de los pre-mRNAs, replicación y reparación de DNA, entre otros.

Previamente demostramos que EhPC4 es una proteína de unión al DNA, con la capacidad de unirse a un fragmento de promotor del gen *EhAdh112* de *E. histolytica*. En este trabajo identificamos que dentro del dominio de unión al DNA de EhPC4 y sus ortólogos, existe un motivo altamente conservado (Fx₈RxFx₍₇₋₁₀₎Px₂KG) que parece ser relevante para la actividad de unión al DNA de las proteínas. Específicamente, la sustitución del residuo K (en la posición 127 de EhPC4) por una A dentro del motivo, induce una drástica reducción de su habilidad para formar complejos con el DNA *in vitro*. En ensayos de retardamiento de la movilidad electroforética, y a bajas concentraciones de la proteína, se observa la formación de barridos que son característicos de proteínas de unión al ADN que no presentan sitios específicos de interacción. Estas observaciones refuerzan la hipótesis de que EhPC4 es una proteína que estimula la transcripción de sus genes blanco a través de su unión al DNA de manera no específica, y que podría estar siendo reclutada a las regiones promotoras por otros componentes del PIC, como se ha descrito para sus homólogos^[8].

Se ha reportado que la proteína PC4 de humano participa en diversos procesos celulares, esto puede deberse a su capacidad de interactuar con el DNA de manera no

específica. Por ejemplo, durante el daño al DNA de doble cadena, PC4 reconoce los sitios de ruptura a lo largo del genoma y facilita el reclutamiento de factores que estimulan los subsecuentes pasos de reparación del DNA ^[81]. Durante el inicio de la transcripción Sub1 (el homólogo de EhPC4 de *S. cerevisiae*) se une a la región promotora de los genes y juega un papel importante en el inicio y elongación de la transcripción. Después de que las cadenas de DNA han sido parcialmente abiertas Sub1 interactúa con el templado de DNA, estabiliza la apertura del complejo y estimula la transcripción ^[89].

EhPC4 es una proteína nuclear que se agrupa formando grandes y abundantes *foci* con tendencia a polarizarse y acumularse en la proximidad de la membrana nuclear, tal como se espera para una proteína que funge como factor de transcripción. Recientemente se ha acumulado evidencia que indica que la periferia de los núcleos proporciona una plataforma para almacenar factores de transcripción ^[83]. Se ha reportado que los factores de transcripción tienen la capacidad de interactuar físicamente con componentes de la membrana nuclear interna cuando estos no se encuentran unidos a sus genes blanco, de tal manera que, esta distribución podría ser parte de un mecanismo de regulación de la expresión génica que incluye a EhPC4. Así mismo, se ha reportado que la lámina nuclear, que es una estructura fibrosa que sirve como interfase entre la envoltura nuclear y el nucleoplasma y donde sus principales componentes son las lamininas, es requerida para la elongación de la replicación del DNA ^[84]. La colocalización de EhPC4 con la laminina B1 y su capacidad de unirse a una región promotora, puede apoyar la hipótesis de que EhPC4 puede estar involucrado en la transcripción y replicación del DNA, tal como se ha reportado para su homólogo PC4 de humano.

En este trabajo utilizamos varias aproximaciones proteómicas y genómicas para disectar las funciones moleculares de EhPC4 en trofozoítos de *E. histolytica*. La comparación de los perfiles de expresión proteicos mediante electroforesis en dos dimensiones, de células que sobreexpresan la proteína EhPC4 con células control, permitió identificar 17 proteínas expresadas diferencialmente de manera significativa, 11 sobreexpresadas y 6 subexpresadas. Cuatro de las 11 proteínas sobreexpresadas participan en la organización y dinámica del citoesqueleto de actina: Ehactin, EhLimA, EhMAEBL y una proteína de unión a actina de la familia cofilina/tropomiosina de 16 kDa (EhABP16).

E. histolytica requiere de múltiples mecanismos para diseminarse y establecer infección en su hospedero humano. La migración celular es un factor importante para la virulencia del parásito, ya que puede favorecer la invasión y destrucción de tejidos, el cual requiere rápidos y dramáticos cambios en el citoesqueleto de actina. El inicio de la migración se caracteriza por la formación de protrusiones en la membrana celular, las cuales son estructuras hechas de F-actina y que promueven la formación de pequeños puntos de adhesión próximas a la periferia celular. Los cambios en el comportamiento físico y la morfología de las células migrantes son determinados en su mayoría por la dinámica de los filamentos de actina (F-actina) del citoesqueleto, y se ha descrito que en células altamente móviles la tasa de movimiento celular es casi proporcional a la tasa de formación de protrusiones ^[85]. El análisis del citoesqueleto de actina de células Myc-EhPC4, mediante la tinción de F-actina con faloidina rodaminada y su posterior análisis por inmunofluorescencia, mostró que estas células presentan una alta polarización celular, observándose un número elevado de estructuras relacionadas con motilidad, tales como pseudópodos. En concordancia con estos resultados, mediante ensayos con cámaras transwell, observamos que las células pKT-3M EhPC4 tuvieron una mayor capacidad de migración celular en comparación con las células control, lo que sugiere que pueden poseer una mayor capacidad citopática. Los análisis de citopatogenicidad muestran que las células que sobreexpresan EhPC4 presentan un ligero, aunque significativo, incremento en su capacidad de destrucción células de colon humano SW480.

Las cofilinas son proteínas de unión a F-actina y responsables del ensamble y desensamble de los filamentos, por lo que son esenciales en procesos dependientes de la dinámica de actina: tal como citocinesis, fagocitosis, endocitosis, migración, entre otros. Como se mencionó anteriormente, la sobreexpresión de EhPC4 promueve a su vez la sobreexpresión de una proteína de unión a actina de la familia cofilina/tropomiosina (EhABP16). El silenciamiento de *EhABP16* en trofozoítos de *E. histolytica* a través de RNA de doble cadena, afectó dramáticamente la polimerización de actina y la formación de pseudópodos, promoviendo alteraciones en la morfología celular y una disminución de la migración celular. Estos datos en su conjunto sugieren que EhPC4 puede estar involucrada en la regulación de la polarización y migración celular, posiblemente a través de la regulación de proteínas que modulan la dinámica del citoesqueleto de actina, tal como EhABP16 ^[86].

La estabilidad genómica de un organismo se consigue mediante la regulación altamente coordinada de mecanismos que controlan el ciclo celular, la replicación y reparación del ADN, la segregación cromosómica, entre otros. En humano, un cariotipo anormal con múltiples aberraciones numéricas y estructurales conduce a células multinucleadas, poliploides, aneuploides, que pueden resultar cáncer ^[87]. En parásitos protozoarios el fenómeno de multinucleación y poliploidía son frecuentemente observados en los trofozoítos en cultivo. En *E. histolytica* la multinucleación y la poliploidia pueden resultar benéficos para el parásito, ya que pueden contribuir con su diversidad genética, y desarrollar respuestas rápidas específicas a los cambios del medio ambiente. Así mismo, pueden proporcionar a los trofozoítos una mejor adaptación ante las condiciones altamente cambiantes dentro del hospedero, durante la invasión de tejidos en una infección aguda ^[88-91]. Sin embargo, el funcionamiento de la poliploidía y multinucleación, sus implicaciones biológicas, así los mecanismos moleculares subyacentes no son claros, y la mayoría de las moléculas que regulan a estos acontecimientos celulares no han sido aún identificadas. Por lo tanto, *E. histolytica* representa un modelo adecuado para los estudios de plasticidad del genoma.

Interesantemente, en las células que sobreexpresan EhPC4 se observó un significativo incremento en proliferación celular, tamaño celular y replicación del DNA, resultando en la formación de trofozoítos gigantes multinucleados. Estos cambios morfológicos pueden estar vinculados con el incremento en la virulencia de los parásitos. Una asociación similar entre patogenicidad, tamaño celular y poliploidia ha sido reportado en *Cryptococcus neoformans*. Durante la infección, este hongo unicelular incrementa su tamaño produciendo células enormes poliploides de hasta 100 μm (llamadas células Titanes). Su incremento en el contenido de DNA puede deberse a un aumento en la replicación del DNA. El incremento en el tamaño celular puede ayudar al parásito a presentar una mayor resistencia a la fagocitosis, producida por las células mononucleares del hospedero, y a la resistencia al estrés oxidativo, los cuales resultan en una mayor sobrevivencia y permanencia del patógeno en su hospedero, y por lo tanto en un incremento en su patogenicidad ^[92].

Por otro lado, la formación de policariontes ha sido previamente reportada en células en cultivo de *E. histolytica* ^[93], sin embargo su significancia biológica aún sigue siendo un problema por resolver. En este trabajo observamos que los trofozoítos Myc-EhPC4

experimentan un incremento en la poliploidía, evidenciado por los núcleos gigantes y mayor contenido de DNA, seguida por la producción de células policariontes polimórficas y de diferente tamaño nuclear. Nuestros datos indican que estos eventos pueden ser el resultado de un retraso o ausencia en la citocinesis, asociado con tasas asincrónicas de divisiones nucleares y citoplásmicas, en respuesta a la sobreexpresión de EhPC4.

Los cambios morfológicos observados en los trofozoítos Myc-EhPC4 requieren la activación de un programa genético preciso para poder mantener células policariontes más grandes, con mayores tasas de replicación celular y del DNA. Los microarreglos de DNA revelaron la modulación de genes implicados en la modulación del citoesqueleto de actina, proliferación celular, metabolismo de carbohidratos y nucleótidos, replicación del ADN, citocinesis segregación de cromosomas, entre otros. La función coordinada de estos genes es compatible con el fenotipo observado en trofozoítos Myc-EhPC4.

Los perfiles de expresión y los ensayos de inmunoprecipitación de la cromatina sugieren que la proteína EhNUDC es un blanco directo de EhPC4. NUDC es una proteína de movimiento nuclear que regula la organización de microtubulos durante la mitosis y citocinesis en células de mamífero ^[94]. En *Aspergillus nidulans*, NUDC es necesaria para el movimiento nuclear, forma parte de un complejo dineína/NUDF que regula la organización de los microtubulos y la formación del huso mitótico ^[95]. En mamíferos, NUDC es esencial para la proliferación celular en células normales y tumorales, su expresión incrementada en varios tipos celulares estimula la mitosis y la proliferación celular ^[96], así mismo, se ha demostrado que la sobreexpresión de NUDC humano induce fallas en citocinesis y la producción de células multinucleadas ^[94]. Interesantemente, la sobreexpresión ectópica de EhNUDC en trofozoítos de *E. histolytica* parcialmente recapitula el fenotipo de multinucleación. Es importante señalar que los eventos multinucleación observados aquí son específicos de EhPC4 y EhNUDC ya que la sobreexpresión de la deadenilasa CAF1 no produjo el mismo fenotipo. Esto sugiere que EhPC4 puede estimular la aparición de células policariontes en los cultivos de *E. histolytica* a través de proteínas como EhNUDC, sin embargo estas observaciones merecen una mayor investigación.

En conclusión, nuestros resultados sugieren por primera vez un papel inesperado para el factor de transcripción PC4 en la regulación del citoesqueleto de actina, citocinesis, multinucleación y heterogeneidad genética en *E. histolytica*. También sugieren que los

mecanismos que contribuyen a la poliploidia fueron originados desde las tempranas ramas de los eucariontes y posteriormente se diversificaron hacia los eucariontes superiores. La identificación de una proteína altamente conservada que participa en la citocinesis y proliferación celular puede ser de valiosa ayuda en la búsqueda de nuevos blancos de drogas que permitan mitigar la proliferación y supervivencia del patógeno humano *E. histolytica*.

10. BIBLIOGRAFÍA

- [1] Cummings M., Klug W., and Spencer C. (2006). *Conceptos de genética* (8ª Ed). Edit. Pearson Education.
- [2] Parent A., Benzaghoul I., Bougie I., and Bisailon M. (2004). Transcription and mRNA Processing Events: the Importance of Coordination. *Journal of Biological Sciences* 4 (5): 624-637.
- [3] Calvo O. and Manley J. (2003). Strange bedfellows: polyadenylation factors at the promoter. *Genes and Dev.* 17: 1321-1327.
- [4] Maniatis T. and Reed R. (2002). An extensive network of coupling among gene expression machines. *Nature* 4;416(6880):499-506.
- [5] Akimoto Y., Yamamoto S., Lida S., Hirose Y., Tanaka A., Hanaoka F. and Ohkuma Y. (2014). Transcription cofactor PC4 plays essential roles in collaboration with the small subunit of general transcription factor TFIIE. *Genes Cells*, 19 (12):879-90.
- [6] Fukuda A., Tokonabe S., Hamada M., Matsumoto M., Tsukui T., Nogi Y. and Hisatake K. (2003). Alleviation of PC4-mediated Transcriptional Repression by the ERCC3 Helicase Activity of General transcription Factor TFIIH. *J. Biol. Chem.*, Vol. 278, Issue 17, 14827-14831.
- [7] Hendrik R., Wechselberger R., Boelens R., Kaptein R. and Folkers G. (2006). The intrinsically Unstructured Domain of PC4 Modulates the Activity of the Structured core through Inter- and Intramolecular Interactions. *Biochemistry*, 45 (15), 5067-5081.
- [8] Werten S., Stelzer G., Goppelt A., Langen F., Gros P., Timmers H., Nan der Vliet P. and Meisterernst M. (1998). Interaction of PC4 with melted DNA inhibits transcription. *The EMBO Journal*, Vol. 17, No. 17, 5103-5111.

- [9] Calvo O. and Manley J. (2001). Evolutionary conserved interaction between CstF-64 and PC4 links transcription, polyadenylation, and termination. *Mol. Cell.* 7(5): 1013-1023.
- [10] Henry N., Bushnell D. and Kornberg R. (1996). A yeast transcriptional stimulatory protein similar to Human PC4. *The Journal of biological chemistry.* Vol 271, No. 36, 21842-21847.
- [11] Das C., Hizume K., Batta K., Kumar P., Gadad S., Ganguly S., Lorain S., Verreault A., Sadhale P., Takeyasu K., and Kundu T. (2006). Transcriptional Coactivator PC4, a Chromatin-Associated Protein, Induces Chromatin Condensation. *Molecular and Cellular Biology* 26, 22; 8303–8315.
- [12] Das C., Gadad S., and Kundu T. (2010). Human positive coactivator 4 controls heterochromatinization and silencing of neural gene expression by interacting with REST/NRSF and CoREST. *J Mol Biol* 19; 397(1):1-12.
- [13] Wang J., Sarker A., Cooper P., and Volkert M. (2004). The single-strand DNA binding activity of human PC4 prevents mutagenesis and killing by oxidative DNA damage. *Mol Cell Biol.* 24(13):6084-93.
- [14] Pan Z., Ge H., Amin A., and Hurwitz J. (1996). The single-strand Transcription-positive cofactor 4 forms complexes with HSSB (RPA) on single-stranded DNA and influences HSSB-dependent enzymatic synthesis of simian virus 40 DNA. *J. Biol. Chem.* 6;271(36):22111-6.
- [15] Batta K., Yokokawa M., Takeyasu K., and Kundu T. (2009). Human transcriptional coactivator PC4 stimulates DNA end joining and activates DSB repair activity. *J. Mol. Biol.* 23; 385(3):788-99.

- [16] Peng Y., Yang J., Zhang E., Sun H., Wang Q., Wang T., Su Y., and Shi C. (2012). Human positive coactivator 4 is a potential novel therapeutic target in non-small cell lung cancer. *Cancer Gene Therapy* 19, 690-696.
- [17] Martínez-Palomo A. (1989). The biology of *Entamoeba histolytica*. Research studies Press. Jhon Wyley.
- [18] Martínez-Palomo A. (1987). The pathogenesis of amoebiasis. *Parasitol Today*. 3:111-118.
- [19] Ravdin J. and Petri M. (1988). Mechanisms of adherence by *Entamoeba histolytica*. En: Amebiasis. Human infection by *Entamoeba histolytica*. J. I. Ravdin (ed.) John Wiley and Sons. EUA. p. 205-218.
- [20] Walsh J. (1988). Problems in recognition and diagnosis of amebiasis. Estimation of the global magnitude of morbidity and mortality. *Rev. Infect. Dis.* 8, 228-238.
- [21] Sánchez-Guillén M., Pérez-Fuentes, Salgado-Rosas, Ruíz-Argüelles, Ackers J., Shire A. and Talamás-Rohana (2002). Differentiation of *Entamoeba histolytica/Entamoeba dispar* by PCR and their correlation with humoral and cellular immunity in individuals with clinical variants of amoebiasis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 66(6), pp. 731-737.
- [22] Ali I., Clark C., and Petri W. (2008). Molecular epidemiology of amebiasis. *Infect Genet Evol.* 8(5):698-707.
- [23] Petri W. (1996). Recent advances in amebiasis. *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.* 33, 1-37.

- [24] Shibayama M., Dolabella S., Silva E., and Tsutsumi. (2007). A Brazilian species of *Entamoeba dispar* (ADO) produces amoebic liver abscess in hamsters. *Ann. Hepatol.* 6, 117–118.
- [25] Sepúlveda B. (1982). Amebiasis: host-pathogen biology. *Rev. Infect. Dis.* 4: 836-842
- [26] Conde-Bonfil M., and De la Mora (1992). *Entamoeba histolytica*: a standing threat. *Salud Pública, México.* 34: 335-341.
- [27] Caballero-Salcedo A., Viveros-Rogel M., Salvatierra B., Tapia-Conyer R., Sepulveda-Amor J., Gutierrez G., and Ortiz-Ortiz L. (1994). Seroepidemiology of amebiasis in Mexico. *Am J Trop Med Hyg.* 50(4):412-9.
- [28] Van der Giezen, Cox S., and Tovar J. (2004). The iron-sulfur cluster assembly genes *iscS* and *iscU* of *Entamoeba histolytica* were acquired by horizontal gene transfer. *BMC Evol Biol.* 20; 4:7.
- [29] Sogin M. (1989). Evolution of eukaryotic microorganisms and their small subunit ribosomal RNAs. *Am. Zool.* 29: 487-499.
- [30] Hasegawa M., Hashimoto T., Adachi J., Iwabe N. and Miyata T. (1993). Early branchings in the evolution of eukaryotes: ancient divergence of *Entamoeba* that lacks mitochondria revealed by protein sequence data. *J. Mol. Evol.* 36: 380-388.
- [31] Clark C. (1999). The effect of secondary loss on our views of eukaryotic evolution. *Bid. Bull.* 196: 385-388.
- [32] Bakker-Gunwald T., and Wotsman T. (1993). *Entamoeba histolytica* as a model for the primitive eukaryotic cell. *Parasitology Today.* 9: 27-31.

[33] Clark C. and Diamond L. (1997). Intraspecific variation and phylogenetic relationship in the genus *Entamoeba* as revealed by riboprinting. *J. Euk. Microbial.* 44: 142-154.

[34] Loftus B., Anderson I., Davies R., Alsmark U., Samuelson J., Amedeo P., Roncaglia P., Berriman M., Hirt R., Mann B., Nozaki T., Suh B., Pop M., Duchene M., Ackers J., Tannich E., Leippe M., Hofer M., Bruchhaus I., Willhoeft U., Bhattacharya A., Chillingworth T., Churcher C., Hance Z., Harris B., Harris D., Jagels K., Moule S., Mungall S., Ormond D., Squares R., Whitehead S., Quail M., Rabinowitsch E., Norbertczak H., Price C., Wang Z., Guillen N., Gilchrist C., Stroup S., Bhattacharya S., Lohia A., Foster P., Sicheritz-Ponten T., Weber C., Singh U., Mukherjee C., El-Sayed N., Petri W., Clark C., Embley T., Barrell B., Fraser C., and Hall N. (2005). The genome of the protist parasite *Entamoeba histolytica*, *Nature*. Feb 24;433(7028):865-8.

[35] Battacharya A., Satish S., Bagchi A. and Bhattacharya S (2000). The genome of *Entamoeba histolytica*. *International Journal for Parasitology*. Vol. 30, No. 4. pp 401-410.

[36] Lorenzi H., Puiu D., Miller J., Brinkac L., Amedeo P., Hall N., and Caler E. (2010). New assembly, reannotation and analysis of the *Entamoeba histolytica* genome reveal new genomic features and protein content information. *PLoS Negl Trop Dis.* 15; 4(6):e716. doi: 10.1371/journal.pntd.0000716.

[37] Clark C., Alsmark U., Tazreiter M., Saito Y., Nakano, Ali V., Marion S., Weber C., Mukherjee C., Bruchhaus I., Tannich E., Leippe M., Sicheritz-Ponten T., Foster P., Samuelson J., Noël C., Hirt R., Embley T.M., Gilchrist C.A., Mann B.J., Singh U., Ackers J.P., Bhattacharya S., Bhattacharya A., Lohia A., Guillén N., Duchêne M., Nozaki T. and Hall C N. (2007). Structure and Content of the *Entamoeba histolytica* genome. *Advances in Parasitology*, Volume 65, páginas 51-190.

- [38] Gilchrist C., Holm C., Hughes M., Schaenman J., Mann B. and Petri W. (2001). Identification and characterization of an *Entamoeba histolytica* upstream regulatory element 3 sequence-specific DNA-binding protein containing EF-hand motifs. *The Journal of biological chemistry*. Vol 276, No. 15, pp 11838-11843.
- [39] Schaenman J., Gilchrist C., Mann B., and Petry W. (2001) Identification of two *Entamoeba histolytica* sequence-specific URE4 enhancer-binding proteins with homology to the RNA-binding motif RRM. *J. Biol. Chem.* Vol. 276, pp 1602-1609.
- [40] Marchat L., Gómez C., Pérez D., López C. and Orozco E. Possible role of the CCAAT/Enhancer Binding Protein in the expression regulation of the *EhPgp1* multidrug resistance gene in *Entamoeba histolytica*. *Arch Med Res*. 2000 Jul-Aug; 31 (4 Suppl):S291-3.
- [41] Mendoza L., Orozco E., Rodríguez M., García-Rivera G., Sánchez T., García E. and Gariglio P. (2003). *Ehp53*, an *Entamoeba histolytica* protein, ancestro of the mammalian tumor suppressor p53. *Microbiology* 143, pp. 885-893.
- [42] Dios-Bravo G., Luna-Arias J., Riverón A., Olivares-Trejo J., López-Camarillo C., Orozco E. (2005). *Entamoeba histolytica* TATA-box binding protein binds to different TATA variants *in vitro*. *FEBS Journal* 272 1354-1366.
- [43] Castañon-Sanchez C., Luna-Arias J., de Dios-Bravo M., Herrera-Aguirre M., Olivares-Trejo J., Orozco E, and Hernández J. (2010). *Entamoeba histolytica*: a unicelular organism containing twop active genes encoding for members of the TBP family. *Protein Expr Purif*; 70(1):48-59.

- [44] Azuara-Liceaga E., Sanchez-Buena S., Meneses E., Brieba L. and Orozco E. (2007). Identification of myb transcription factors in *Entamoeba histolytica*. The FASEB Journal 21:914.9
- [45] Meneses E., Cardenas H., Zárate S., Brieba L., Orozco E., López-Camarillo C., and Azuara-Liceaga E. (2010). The R2R3 Myb protein family in *Entamoeba histolytica*. Gene 1:455(1-2):32-42.
- [46] Ramakrishnan G., Gilchrist C., Musa H., Torok M., Grant P., Mann B., and Petri W. (2004). Histone acetyltransferases and deacetylase in *Entamoeba histolytica*. Molecular and Biochemical Parasitology 138. pp. 205-216.
- [47] Fisher O., Siman-Tov R., and Ankri S. (2004). Characterization of cytosine methylated regions and 5-cytosine DNA methyltransferase (Ehmeth) in the protozoan parasite *E. histolytica*. Nucleic Acids Research. Vol. 32, No. 1, pp. 287-297.
- [48] Singh U., Gilchrist C., Schaenman J., Rogers J., Hockensmith J., Mann B., and Petri W. (2002). Context-dependent roles of the *Entamoeba histolytica* core promoter element GAAC in transcriptional activation and protein complex assembly. Mol Biochem Parasitol. 120(1):107-16.
- [49] Lioutas C., and Tannich E. (1995). Transcription of protein-coding genes in *Entamoeba histolytica* is insensitive to high concentrations of α -amanitin. Molecular and Biochemical Parasitology. 73,1-2;259-261
- [50] López-Camarillo C., Orozco E., and Marchat L. (2005). *Entamoeba histolytica*: Comparative genomics of the pre-mRNA 3'end processing machinery. Experimental Parasitology 110, 184-190.

- [51] García-Vivas J., López-Camarillo C., Azuara-Liceaga E., Orozco E. and Marchat L. (2005). *Entamoeba histolytica*: Cloning expression of the poly(A) polymerase *EhPAP*. *Experimental Parasitology* 110, 226-232.
- [52] Pezet-Valdez M., Fernández-Retana J., Ospina-Villa J., Ramírez-Moreno M., Orozco E., Charcas-López S., et al. (2013) The 25 kDa Subunit of Cleavage Factor Im Is a RNA-Binding Protein That Interacts with the Poly(A) Polymerase in *Entamoeba histolytica*. *PLoS ONE* 8(6): e67977. doi:10.1371/journal.pone.0067977
- [53] Ospina-Villa J., Zamorano-Carrillo A., Lopez-Camarillo C., Castañon-Sanchez C., Soto-Sanchez J., Ramirez-Moreno E., and Marchat L. (2015). Amino acid residues Leu135 and Tyr236 are required for RNA binding activity of CFIm25 in *Entamoeba histolytica*. *Biochimie*.115:44-51.
- [54] Santi-Rocca J., Weber C., Guigon G., Sismeiro O., Coppée J., and Guillén N. (2008). The lysine- and glutamic acid-rich protein KERP1 plays a role in *Entamoeba histolytica* liver abscess pathogenesis. *Cell Microbiol.* 10(1):202-17.
- [55] Schreiber E., Matthias P., Müller M., and Schaffner W. (1989). Rapid detection of octamer binding proteins with 'mini-extracts', prepared from a small number of cells. *Nucleic Acids Res.* 11;17(15):6419.
- [56] Saito-Nakano Y., Yasuda T., Nakada-Tsukui K., Leippe M., and Nozaki T. (2004). Rab5-associated vacuoles play a unique role in phagocytosis of the enteric protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. *J Biol Chem.* 19;279(47):49497-507
- [57] Sambrook J., Fritsch E., and Maniatis T. (1989). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.

- [58] Azuara-Liceaga E., Flores-Soto E., López-Camarillo C., and Orozco E. (2005). *Entamoeba histolytica*: structural and functional analysis of the Ehadh112 gene promoter. *Exp Parasitol.* 110(3):280-5. Epub 2005 Apr 11
- [59] Dios-Bravo, Luna-Arias, Riverón, Olivares-Trejo, López-Camarillo and Orozco E. (2005). *Entamoeba histolytica* TATA-box binding protein binds to different TATA variants in vitro. *FEBS Journal* 272:1354–1366
- [60] Nickel R. and Tannich E. (1994). Transfection and transient expression of chloramphenicol acetyltransferase gene in the protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 91(15): 7095–7098
- [61] Solis C., Santi-Rocca J., Perdomo D., Weber C., and Guillen N. (2009) Use of Bacterially Expressed dsRNA to Downregulate *Entamoeba histolytica* Gene Expression. *PLoS ONE* 4(12): e8424. doi:10.1371/journal.pone.0008424
- [62] Santi-Rocca J., Smith S., Weber C., Pineda E., Hon C., et al. (2012) Endoplasmic Reticulum Stress-Sensing Mechanism Is Activated in *Entamoeba histolytica* upon Treatment with Nitric Oxide. *PLoS ONE* 7(2): e31777. doi:10.1371/journal.pone.0031777].
- [63] Das S. and Lohia A. (2002). Delinking of S phase and cytokinesis in the protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. *Cellular Microbiology* 4(1), 55–60.
- [64] Anbar M., Bracha R., Nuchamowitz Y., Li Y., Florentin A., and Mirelman D. (2005). Involvement of a short interspersed element in epigenetic transcriptional silencing of the amoebapore gene in *Entamoeba histolytica*. *Eukaryot Cell.* 4(11):1775-84].
- [65] Sikorski T., Ficarro S., Holik J., Kim T., Rando O., Marto J., and Buratowski S. (2011). Sub1 and RPA associate with RNA polymerase II at different stages of transcription. *Mol Cell.* 4;44(3):397-409.

- [66] Allard J., and Mogilner A. (2012). Traveling waves in actin dynamics and cell motility. *Current Opinion in Cell Biology* 25:1-9.
- [67] Tavares P., Rigother M., Khun H., Roux P., Huerre M., and Guillén, N. (2005). Roles of cell adhesion and cytoskeleton activity in *Entamoeba histolytica* pathogenesis: a delicate balance. *Infection and Immunity* 200573:1771-78.
- [68] Voigt H., and Guillén N. (1999) New insights into the role of the cytoskeleton in phagocytosis of *Entamoeba histolytica*. *Cellular Microbiology* 1:195-203.
- [69] Wender N., Villalobo E., and Mirelman D. EhLimA, a novel LIM protein, localizes to the plasma membrane in *Entamoeba histolytica*. *Eukaryotic Cell* 2007; 6:1646-55.
- [70] Saenz F., Balu B., Smith J., Mendonca S., and Adams J (2008). The transmembrane isoform of *Plasmodium falciparum* MAEBL is essential for the invasion of *Anopheles* salivary glands. *PLoS ONE* 3(5): e2287.
- [71] Maciver S., and Hussey P. (2007). The ADF/cofilin family: actin-remodeling Proteins. *Genome Biology* 3(5):reviews3007.
- [72] Popow-Woźniak A., Mazur, A., Mannherz H., Malicka-Błaszkiwicz M., and Nowak D. Cofilin overexpression affects actin cytoskeleton organization and migration of human colon adenocarcinoma cells. *Histochemistry and cell biology* 2012; 138:725-36.
- [73] Thomas H., Howard and William H. (1984). Chemotactic peptide modulation of actin assembly and locomotion in neutrophils. *J Cell Biology*; 98: 1265-1271.
- [74] Cooper J. (1987). Effects of cytochalasin and phalloidin on actin. *J. Cell biology.* 105(4):1473-8..
- [75] Brian A., Brian P., Ricardo A., Cintia M, Young-min Woo, and Yan Liu. (2000). Investigating the hows and whys of DNA endoreduplication. *J Exp. Botany*; 52 (355): 183-92.

- [76] Gangopadhyay S., Ray S., Kennady K., Pande G., and Lohia A. (1997). Heterogeneity of DNA content and expression of cell cycle genes in axenically growing *Entamoeba histolytica* HM1:IMSS clone A. *Mol Biochem Parasitol.* 1;90(1):9-20.
- [77] Mukherjee C., Majumder S., and Lohia A. (2009). Inter-Cellular Variation in DNA Content of *Entamoeba histolytica* Originates from Temporal and Spatial Uncoupling of Cytokinesis from the Nuclear Cycle. *PLoS Negl Trop Dis* 3(4): e409. doi:10.1371/journal.pntd.0000409.
- [78] Helmstaedt K., Laubinger K., Vosskuhl K., Bayram O., Busch S., Hoppert M., Valerius O., Seiler S., and Braus GH. (2008). The nuclear migration protein NUDF/LIS1 forms a complex with NUDC and BNFA at spindle pole bodies. *Eukaryot Cell.*; 7(6):1041-52.
- [79] Gocke C., Osmani S., and Miller B. (2000). The human homologue of the *Aspergillus* nuclear migration gene *nudC* is preferentially expressed in dividing cells and ciliated epithelia. *Histochem Cell Biol.* 114(4):293-301.
- [80] Aumais J., Williams S., Luo W., Nishino M., Caldwell K., Caldwell G., Lin S., and Yu-Lee L. (2003) Role for *NudC*, a dynein-associated nuclear movement protein, in mitosis and cytokinesis. *J Cell Sci.* 15;116(Pt 10):1991-2003. Epub 2003 Apr 1.
- [81] Mortusewicz O. (2008). Recruitment of RNA polymerase II cofactor PC4 to DNA damage sites. *J. Cell. Biol.* 183, 769-776.
- [82] García A., Collin A. and Calvo O (2012). Sub1 associates with Spt5 and influences RNA polymerase II transcription elongation rate. *Mol. Biol. Cell.* 23, 4297-312.
- [83] Stijn H. and Maarten F. (2007). The inner nuclear envelope as a transcription factor resting place. *EMBO Rep.* 8(10): 914–919.

- [84] Spann T., Moir R., Goldman A., Stick R., and Goldman R. (1997). Disruption of nuclear lamin organization alters the distribution of replication factors and inhibits DNA synthesis. *J Cell Biol.* 24;136(6):1201-12.
- [85] Margaret L., Ian C., Aratyn-Schaus Y., and Clare M. (2010). Mechanical integration of actin and adhesion dynamics in cell migration. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 26: 315–333.
- [86] Bamburg J., McGough A., and Ono S. (1999). Putting a new twist on actin: ADF/cofilins modulate actin dynamics. *Trends Cell Biol.* 9(9):364-70
- [87] Potapova T., Zhu J. and Li R. (2013). Aneuploidy and chromosomal instability: a vicious cycle driving cellular evolution and cancer genome chaos. *Cancer Metastasis Rev.* 32, 377-389.
- [88] Guillén N., Boquet P., and Sansonetti P. (1998). The small GTP-binding protein RacG regulates uroid formation in the protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. *J. Cell. Sci.* 111, 1729-1739.
- [89]. Arias-Romero L., de Jesús Almáraz-Barrera M., and Díaz-Valencia J., Rojo-Domínguez A., Hernandez-Rivas R., Vargas M. (2006). EhPAK2, a novel p21-activated kinase, is required for collagen invasion and capping in *Entamoeba histolytica*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 149, 17-26.
- [90] Fisher O., Siman-Tov R. and Ankri S. (2006). Pleiotropic phenotype in *Entamoeba histolytica* overexpressing DNA methyltransferase (Ehmeth). *Mol. Biochem. Parasitol.* 147, 48-54.
- [91] Majumder S. and Lohia A. (2008). *Entamoeba histolytica* encodes unique formins, a subset of which regulates DNA content and cell division. *Infect. Immun.* 76, 2368-78.

- [92] Okagaki L., Strain A., Nielsen J., Charlier C., Baltés N., Chrétien F., et al. (2010). Cryptococcal Cell Morphology Affects Host Cell Interactions and Pathogenicity. *PLoS Pathog.* 6: e1000953. doi:10.1371/journal.ppat.1000953.
- [93] Márquez-Monter H., Becker I. and Carrillo-Farga J. (1990). Mitosis and polykaryon formation of *Entamoeba histolytica* in axenic cultures. *Arch. Invest. Med.* 21, 69-73.
- [94] Aumais J., Williams S., Luo W., Nishino M., Caldwell K., Caldwell G., Lin S., and Yu-Lee L. (2003). Role for NudC, a dynein-associated nuclear movement protein, in mitosis and cytokinesis. *J. Cell. Sci.* 15, 1991-2003.
- [95] Helmstaedt K., Laubinger K., Vosskuhl K., Bayram O., Busch S., Hoppert M., Valerius O., Seiler S., and Braus G. (2008). The Nuclear Migration Protein NUDF/LIS1 Forms a Complex with NUDC and BNFA at Spindle Pole Bodies. *Eukaryotic Cell.* 7, 1041–1052 (2008).
- [96] Gocke C., Osmani S., and Miller B. (2000). The human homologue of the *Aspergillus* nuclear migration gene nudC is preferentially expressed in dividing cells and ciliated epithelia. *Histochem. Cell. Biol.* 114, 293-301.

11. APÉNDICES

Apéndice A: Lista de genes sobreexpresados en las células Myc-EhPC4.

Description	Gene.ID	FC	BY	rawp
Heat shock protein, Hsp20 family	EHI_055680	8.76773	1.06E-04	4.43E-07
Heat shock protein 101	EHI_178230	7.248758	1.13E-04	4.81E-07
Heat shock protein, putative	EHI_156560	6.937912	5.16E-05	1.58E-07
Heat shock protein 101	EHI_076480	6.906415	9.61E-05	3.85E-07
EhCP A4	EHI_050570	6.824281	2.51E-05	5.58E-08
Heat shock protein 101	EHI_094470	6.655094	6.51E-05	2.27E-07
ALG1 family protein	EHI_180390	6.050634	1.38E-05	1.98E-08
Chaperone clpB	EHI_155060	5.935963	1.32E-04	5.84E-07
Heat shock protein70, hsp70A2	EHI_192440	5.685829	1.87E-04	9.01E-07
Chaperone clpB	EHI_094680	5.453589	7.17E-05	2.57E-07
Heat shock protein 101	EHI_183680	5.300941	7.02E-05	2.49E-07
Chaperone clpB	EHI_090840	5.245448	2.00E-05	3.80E-08
Calcium binding protein	4.m00695	5.090119	9.29E-06	1.01E-08
Calcium-binding protein 2	EHI_010020	4.911769	8.40E-06	7.32E-09
DnaJ family protein	EHI_187000	4.68556	7.20E-05	2.59E-07
Heat shock protein 70	EHI_026590	4.640024	1.52E-05	2.33E-08
Heat shock protein70, hsp70A2	EHI_061640	4.564673	3.85E-05	1.05E-07
20 kDa antigen related protein	EHI_056490	4.293106	1.71E-05	2.71E-08
Cysteine synthase A (cysK)	EHI_060340	4.193991	1.87E-05	3.36E-08
EhCP A6	EHI_151440	4.10936	1.36E-05	1.89E-08
Heat shock protein 101	EHI_063440	4.090962	9.71E-06	1.11E-08
Heat shock protein 90	EHI_196940	4.083139	5.27E-06	2.63E-09
Heat shock protein70, hsp70A2	EHI_132530	4.071865	2.18E-05	4.43E-08
Ubiquitin	EHI_083410	3.910963	2.19E-06	4.32E-10
Helix-turn-helix, EDF1	EHI_093330	3.866882	2.31E-05	4.83E-08
Heat shock protein 101	EHI_013550	3.513846	4.96E-05	1.49E-07
Translation initiation factor eIF 5A (eif5A)	EHI_177460	3.487082	1.22E-05	1.54E-08
Sgt1	EHI_117820	3.445039	3.07E-05	7.64E-08
Sulfotransferase	EHI_197340	3.371605	1.87E-05	3.40E-08
Sulfate adenylyltransferase	EHI_197160	3.178127	5.94E-06	4.06E-09
Heat shock protein70, hsp70A2	EHI_108130	3.171272	3.21E-05	8.31E-08
DnaJ family protein	EHI_151260	3.152776	4.14E-05	1.19E-07
Heat shock protein70, hsp70A2	EHI_132540	3.14286	9.68E-05	3.89E-07
Myb like DNA binding domain containing	EHI_129790	3.119383	6.88E-06	5.34E-09
Hsp90-like protein	EHI_136350	3.07375	5.60E-06	3.22E-09
Rab family GTPase	EHI_164900	3.056108	4.00E-05	1.12E-07
Glyceraldehyde 3 phosphate dehydrogenase	EHI_187020	3.041685	1.25E-06	1.65E-11

Dual specificity protein phosphatase	EHI_175490	3.039278	2.11E-06	2.84E-10
Iron sulfur flavoprotein	EHI_022600	3.031907	2.11E-06	2.39E-10
Glyceraldehyde 3 phosphate dehydrogenase	EHI_008200	2.986676	2.11E-06	1.61E-10
Eukaryotic translation initiation factor 6	EHI_006170	2.981978	2.11E-06	3.51E-10
SMC-domain containig protein	EHI_187190	2.975095	5.86E-05	1.89E-07
Cyst wall specific glyco protein Jacob	EHI_136360	2.935446	3.52E-05	9.38E-08
Heat shock protein70, hsp70A2	EHI_015390	2.92836	2.64E-05	6.22E-08
DadA family oxidoreductase	EHI_028940	2.895756	4.35E-06	1.72E-09
BAR/SH3 domain containing protein	EHI_035790	2.877904	1.06E-05	1.27E-08
Iron sulfur flavoprotein	EHI_067720	2.852429	2.74E-06	6.12E-10
Rab family GTPase	EHI_180410	2.838496	2.41E-04	1.28E-06
Malate dehydrogenase	EHI_092450	2.824192	2.47E-05	5.44E-08
Cyst wall specific glycoprotein Jacob	EHI_028930	2.816447	4.13E-05	1.18E-07
SGS domain protein	EHI_050290	2.816141	5.60E-06	3.55E-09
Ubiquitin conjugating enzyme family	EHI_048700	2.749335	2.91E-05	7.12E-08
NudC	EHI_023890	2.736238	6.51E-05	2.26E-07
Fes1-domain containing protein	EHI_061760	2.649043	3.01E-06	7.13E-10
NAD-dependent epímerase/Dehydratase	EHI_017660	2.643872	1.64E-06	4.32E-11
Ubiquitin conjugating enzyme family	EHI_160740	2.587297	8.89E-06	8.77E-09
Heat shock protein, Hsp20 family	EHI_125830	2.563051	2.34E-05	4.96E-08
Hsp70	EHI_192510	2.536149	5.37E-05	1.67E-07
Proline synthetase associated protein	EHI_188790	2.523961	1.36E-05	1.90E-08
Ubiquitin	EHI_178340	2.506538	5.55E-06	2.92E-09
Copine 9	EHI_137110	2.498739	2.11E-06	3.15E-10
Actin binding protein, cofilin/tropomyosin family	EHI_186840	2.488925	8.40E-06	7.08E-09
Ras family GTPase	EHI_093760	2.480369	2.11E-06	3.75E-10
Ubiquitin conjugating enzyme family	EHI_070750	2.480125	4.03E-06	1.27E-09
Iron-sulfur flavoprotein	EHI_022270	2.470803	6.20E-05	2.09E-07
Ubiquitin like,	EHI_103510	2.451989	3.72E-06	1.12E-09
Phosphoglycerate kinase (pgk)	EHI_188180	2.451013	6.31E-06	4.60E-09
Ornithine decarboxylase	EHI_100430	2.421524	4.35E-06	1.78E-09
Hypothetical protein	EHI_009900	2.375187	8.40E-06	7.50E-09
Carbonic anhydrase	EHI_073380	2.37082	5.60E-06	3.28E-09
Thioredoxin (TRX)	EHI_004490	2.36349	1.32E-05	1.73E-08
Hydroxylamine reductase	EHI_004600	2.335483	2.39E-05	5.18E-08
Gal/GalNAc lectin Igl2	EHI_183000	2.330014	5.30E-06	2.72E-09
Iron sulfur flavoprotein	EHI_103260	2.320236	4.53E-06	2.08E-09
Enolase	EHI_130700	2.316064	2.56E-05	5.75E-08
Chemoreceptor glutamine deamidase CheD	EHI_192430	2.30639	4.35E-06	1.94E-09
MSF transporter	EHI_009500	2.296668	2.43E-06	5.10E-10
Sulfotransferase	EHI_031640	2.295526	9.89E-05	4.02E-07
Heat shock protein, Hsp20 family	EHI_193390	2.285371	1.17E-05	1.46E-08
RNA 3' terminal phosphate cyclase	EHI_177570	2.266218	2.35E-05	5.08E-08
Malic enzyme	EHI_050330	2.232511	1.94E-06	8.56E-11
Heat shock protein 70	EHI_052860	2.230587	3.21E-05	8.37E-08

EhPC4	EHI_192520	2.22746	1.10E-04	4.68E-07
Helicase SWR1	EHI_124540	2.212942	2.86E-05	6.93E-08
Pyrophosphate dependent phosphofructokinase	EHI_000730	2.203685	4.35E-06	1.81E-09
Cell surface protein	EHI_114770	2.199277	5.84E-05	1.86E-07
Lipopolysaccharide-induced transcription factor regulating TNF-alpha	EHI_003260	2.182988	2.17E-04	1.12E-06
High mobility group protein	EHI_098750	2.151992	6.20E-05	2.08E-07
Calcium-binding protein 1	EHI_120900	2.149705	5.60E-06	3.63E-09
Hypothetical protein	EHI_010260	2.126326	5.60E-06	3.32E-09
Periplasmic beta-glucosidase	EHI_066750	2.126204	2.35E-05	5.07E-08
Aspartate ammonia lyase	EHI_150390	2.115875	8.40E-06	7.50E-09
EMB2261	EHI_023150	2.113032	6.31E-06	4.53E-09
Surface antigen ariel1	EHI_080200	2.111899	1.39E-04	6.24E-07
GRIP domain-containing protein, RUD3	EHI_169670	2.088252	1.78E-04	8.48E-07
Aspartyl tRNA synthetase (aspS)	EHI_175050	2.088124	4.08E-06	1.38E-09
Sulfotransferase	EHI_166030	2.07592	1.79E-05	3.11E-08
Hypothetical protein	EHI_135600	2.075443	2.17E-04	1.12E-06
AMMECR1 family	EHI_143570	2.053269	1.06E-04	4.45E-07
Acetyl CoA synthetase	EHI_178960	2.051847	3.06E-06	7.64E-10
Fructose 1,6 bisphosphate aldolase	EHI_098570	2.046977	9.45E-05	3.74E-07
Triosephosphate isomerase	EHI_056480	2.045719	4.35E-06	1.93E-09
Surface antigen BspA-like	EHI_056350	2.040988	1.52E-05	2.33E-08
Hypothetical protein	EHI_163490	2.016749	5.11E-06	2.48E-09
Leucine rich repeat protein, BspA family	EHI_024580	2.013854	5.05E-06	2.39E-09
NADP dependent alcohol dehydrogenase	EHI_023110	2.010902	1.86E-05	3.31E-08
Alcohol dehydrogenase	EHI_125950	1.995815	3.25E-06	8.55E-10
Aspartate ammonia lyase	EHI_082270	1.989946	8.69E-06	8.22E-09
Copine 8	EHI_096790	1.984381	1.51E-05	2.29E-08
Ribosomal protein S30	EHI_023400	1.970073	2.78E-05	6.64E-08
Dihydropyrimidine dehydrogenase	EHI_012980	1.958907	9.87E-06	1.15E-08
Synaptic glycoprotein SC2	EHI_135110	1.939545	7.02E-05	2.49E-07
Sulfotransferase	EHI_140740	1.939407	2.69E-05	6.40E-08
Hsc70 interacting protein	EHI_158050	1.929658	1.54E-05	2.41E-08
Asparaginyl tRNA synthetase (asnS)	EHI_126920	1.915217	2.21E-04	1.14E-06
EhCP1	EHI_074180	1.914549	1.04E-04	4.28E-07
Surface antigen ariel1	EHI_131360	1.904506	3.06E-05	7.57E-08
Calmodulin	EHI_100270	1.899032	2.98E-05	7.33E-08
Filamin-binding LIM protein 1	EHI_069060	1.890248	1.38E-03	1.28E-05
70 kDa peptidyl prolyl isomerase	EHI_178850	1.874912	2.60E-05	5.92E-08
Surface antigen ariel1	EHI_172850	1.869849	7.62E-05	2.82E-07
Glucosamine 6 phosphate isomerase	EHI_174640	1.868506	1.74E-05	2.90E-08
Ras family GTPase	EHI_154240	1.850227	1.79E-05	3.09E-08
Cysteine desulfurase	EHI_136380	1.847157	1.96E-04	9.68E-07
Ubiquitin conjugating enzyme family	EHI_083560	1.844057	1.71E-05	2.75E-08
Dcn1p	EHI_152590	1.841838	1.93E-04	9.48E-07
Skp1A	EHI_134960	1.840115	6.88E-06	5.25E-09

PH domain containing protein	EHI_117920	1.835931	2.60E-04	1.44E-06
E3 ubiquitin protein ligase BRE1	EHI_074070	1.814448	3.14E-05	8.02E-08
Actophorin	EHI_197480	1.806128	3.72E-06	1.12E-09
Ubiquitin	EHI_166800	1.8061	1.37E-05	1.92E-08
Proteasome alpha subunit	EHI_163650	1.801178	1.36E-05	1.89E-08
tRNA-splicing ligase RtcB homolog 2	EHI_184560	1.788487	3.77E-05	1.02E-07
TFIID subunit	EHI_137090	1.784791	1.09E-05	1.33E-08
Leucine rich repeat protein, BspA family	EHI_082060	1.781716	2.20E-05	4.55E-08
Proteasome alpha subunit	EHI_090000	1.778393	6.30E-06	4.39E-09
Glutamyl tRNA synthetase	EHI_155570	1.756698	1.51E-04	6.92E-07
Rab family GTPase	EHI_114210	1.753429	4.34E-05	1.25E-07
Methionine gamma lyase	EHI_144610	1.751452	5.39E-04	3.73E-06
F actin capping protein subunit alpha EF hand calcium binding domain containing protein	EHI_140640	1.749724	1.40E-03	1.30E-05
Chaperone protein dnaK	EHI_197510	1.749023	1.04E-05	1.23E-08
Grainin 2	EHI_037230	1.742242	2.41E-04	1.28E-06
Nucleoside diphosphate kinase	EHI_111720	1.73186	8.96E-06	8.95E-09
Methionine gamma lyase	EHI_104360	1.72778	1.99E-05	3.76E-08
Methionine gamma lyase	EHI_057550	1.723721	9.05E-05	3.55E-07
Proteolipid membrane potential modulator	EHI_022900	1.722794	2.55E-05	5.69E-08
Rho family GTPase	EHI_129750	1.721769	3.21E-05	8.35E-08
Cysteine rich surface protein Glucosamine 6 phosphate N acetyltransferase	EHI_197360	1.719703	3.21E-05	8.31E-08
Galactose specific adhesin light subunit	EHI_080280	1.709959	4.27E-04	2.73E-06
Ras family GTPase	EHI_049690	1.706383	8.40E-06	7.18E-09
Obg-like ATPase 1	EHI_137700	1.701221	8.66E-05	3.32E-07
Actin	EHI_148270	1.699307	1.38E-05	2.04E-08
Actin	EHI_107290	1.698642	7.38E-04	5.73E-06
Actin	EHI_159150	1.695353	5.85E-05	1.87E-07
Actin	EHI_182900	1.684555	1.71E-05	2.70E-08
Pyruvate phosphate dikinase (ppdK)	EHI_009530	1.68369	1.86E-05	3.30E-08
Actinin like protein	EHI_164440	1.682636	3.07E-04	1.80E-06
Ubiquitin fusion degradation protein 1	EHI_125920	1.680541	1.39E-04	6.25E-07
Ubiquitin conjugating enzyme E2 6	EHI_082280	1.668011	6.47E-05	2.23E-07
Metal dependent phosphohydrolase	EHI_195060	1.667516	3.37E-04	2.03E-06
Histone H4	EHI_023230	1.659423	2.83E-03	3.21E-05
Zinc finger protein 622	EHI_154230	1.656656	4.87E-04	3.28E-06
RAD23 protein	EHI_001400	1.654035	3.55E-04	2.16E-06
Cell division cycle protein 48	EHI_045120	1.653682	9.29E-06	9.95E-09
(2r) phospho 3 sulfolactate synthase	EHI_026480	1.649916	1.17E-05	1.46E-08
ARIEL1	160.m00087	1.649043	4.04E-04	2.56E-06
Proteasome beta subunit	EHI_011870	1.646393	7.10E-04	5.44E-06
Cullin	EHI_118180	1.643174	7.60E-05	2.80E-07
Actin	EHI_163750	1.640469	1.14E-03	9.97E-06
Actin 2 protein	EHI_161200	1.635811	4.59E-05	1.36E-07
Phosphoglucomutase	EHI_110120	1.628724	4.08E-05	1.15E-07
TBP2	EHI_112050	1.61979	6.13E-04	4.41E-06

EhMP24 1 methionine aminopeptidase	EHI_126880	1.616879	1.73E-04	8.23E-07
Memo-like protein	EHI_024510	1.6127546	2.20E-05	4.56E-08
Calcium dependent protein kinase 2	EHI_137120	1.610936	1.03E-03	8.85E-06
Pyruvate:ferredoxin oxidoreductase	EHI_051060	1.608403	3.55E-04	2.17E-06
	EHI_050270	1.607109	2.65E-05	6.28E-08
Ribosomal protein S30	EHI_088600	1.604312	6.20E-05	2.10E-07
COP-9 SigNalosome subunit family member (csn-5)	EHI_050500	1.599101	4.19E-04	2.66E-06
High mobility group protein B3	EHI_087410	1.599027	2.54E-04	1.39E-06
Purine nucleoside phosphorylase	EHI_200080	1.596369	2.64E-05	6.20E-08
Rap GTPase-activating protein	EHI_137690	1.594249	9.67E-04	8.13E-06
Translation initiation factor eIF 5A (eif5A)	EHI_186480	1.593164	1.52E-05	2.36E-08
Peptidyl prolyl cis trans isomerase	EHI_125840	1.593091	9.75E-03	1.50E-04
3 oxoacyl (acyl carrier protein) reductase	EHI_186920	1.587006	1.73E-04	8.21E-07
Enhancer binding protein 1	EHI_121780	1.584608	2.11E-05	4.27E-08
Proteasome subunit beta Type 4 precursor	EHI_137970	1.583067	2.58E-04	1.43E-06
SRPK1	EHI_035500	1.57812	2.06E-05	4.08E-08
High mobility group protein	EHI_086110	1.570097	9.01E-03	1.36E-04
SCAI	EHI_186790	1.566906	6.47E-05	2.22E-07
Diacylglycerol kinase	EHI_117800	1.556544	6.97E-04	5.29E-06
Molybdenum cofactor synthesis protein3	EHI_118040	1.548053	4.00E-05	1.13E-07
Endoribonuclease L_PSP	EHI_087570	1.546821	5.16E-05	1.58E-07
Hexokinase	EHI_098290	1.542745	6.42E-04	4.66E-06
Poly (A) binding protein	EHI_177560	1.537549	2.00E-05	3.84E-08
26S protease regulatory subunit 7	EHI_080890	1.534371	2.88E-04	1.65E-06
Rho GTPase activating protein	EHI_187110	1.534321	1.07E-04	4.53E-07
Fe S cluster assembly protein NifU	EHI_049620	1.529576	3.73E-05	1.00E-07
Seryl tRNA synthetase	EHI_000690	1.525414	6.52E-04	4.76E-06
40S ribosomal protein S13	EHI_112880	1.509673	4.21E-02	9.28E-04
TPR repeat protein, STIP1	EHI_023300	1.509121	2.14E-04	1.09E-06
60S acidic ribosomal protein P2	EHI_186830	1.504835	2.79E-05	6.70E-08
Inorganic pyrophosphatase	EHI_124880	1.504483	1.35E-04	6.02E-07
Cell cycle control protein cwf12	EHI_187260	1.503032	8.41E-05	3.21E-07

Apéndice B: Lista de genes subexpresados en las células Myc-EhPC4.

Descripción	Gene.ID	FC	BY	Rawp
N system aminoacid transporter 1	EHI_050900	-9.43	2.62E-05	6.06E-08
Nonpathogenic pore forming peptide precursor	EHI_169350	-3.98	4.00E-04	2.52E-06
Probably a phosphatidate cytidylytransferase family	EHI_163240	-3.17	2.11E-06	3.06E-10
D 3 phosphoglycerate dehydrogenase	EHI_060860	-2.85	1.95E-05	3.60E-08
S adenosylmethionine syntase	EHI_004920	-2.72	6.93E-06	5.56E-09
Hypotetical protein	EHI_143070	-2.66	8.69E-06	8.17E-09
S adenosylmethionine syntase	EHI_174250	-2.65	7.38E-04	5.72E-06
Cysteine proteinase 2 precursor	EHI_132650	-2.62	2.11E-06	3.32E-10
Ganglioside gm2 activator protein	EHI_151800	-2.54	4.38E-04	2.85E-06
Ribonuclease putative	EHI_156310	-2.52	2.11E-06	3.09E-10
D phosphoglycerate dehydrogenase	EHI_116830	-2.44	1.95E-05	3.62E-08
Integral membrane protein	EHI_131130	-2.39	5.80E-06	3.89E-09
Topoisomerase	EHI_048140	-2.32	3.42E-06	9.44E-10
EhCP A7 cysteine proteinase	EHI_039610	-2.32	8.73E-06	8.41E-09
Protein kinase similar to intersectin 2 isoform 3	EHI_012020	-2.31	6.31E-06	4.64E-09
Hypotetical protein	EHI_079280	-2.3	8.28E-06	6.75E-09
Cysteine proteinase, putative	EHI_144040	-2.29	4.08E-06	1.40E-09
DEAD/DEAH box helicase	EHI_036900	-2.28	8.65E-06	7.85E-09
Lysozyme	EHI_096570	-2.27	5.92E-05	1.93E-07
Methionine gamma lyase	EHI_142250	-2.26	8.73E-06	8.49E-09
Cysteine proteinase, putative	EHI_144050	-2.21	5.60E-06	3.59E-09
Hypotetical protein	EHI_093740	-2.14	1.94E-06	1.02E-10
Long chain fatty acid CoA ligase	EHI_079300	-2.13	5.60E-06	3.68E-09
Ribonuclease	EHI_169300	-2.12	1.27E-04	5.54E-07
Cysteine proteinase, putative	EHI_010850	-2.1	4.27E-06	1.57E-09
Merozoite surface protein-1	EHI_053850	-2.06	1.71E-05	2.77E-08
Fe hydrogenase	EHI_005060	-2.05	1.71E-05	2.79E-08
M protein, serotype 5 precursor	EHI_188170	-2.03	6.88E-06	5.32E-09
Rab family GTPase	EHI_127380	-2.02	3.48E-05	9.18E-08
Hypothetical protein	EHI_058110	-1.99	5.60E-06	3.19E-09
Polyadenylate binding protein, putative	EHI_033250	-1.96	2.03E-05	3.97E-08
Rho family GTPase	EHI_192450	-1.94	2.11E-06	3.87E-10
S adenosylmethionine synthetase, putative	EHI_195110	-1.94	6.20E-05	2.11E-07
Hypothetical protein	EHI_136410	-1.93	4.08E-06	1.45E-09
Hypothetical protein, conserved	EHI_191770	-1.92	1.46E-05	2.17E-08
Hypothetical protein	EHI_096360	-1.91	5.60E-06	3.44E-09
Hypothetical protein	EHI_151390	-1.91	1.86E-05	3.32E-08
Hypothetical protein	EHI_194550	-1.9	9.29E-06	9.83E-09
Hypothetical protein	EHI_020080	-1.89	1.07E-05	1.30E-08
Hypothetical protein, conserved	EHI_030790	-1.87	8.03E-05	3.00E-07
RNA binding protein, putative	EHI_196590	-1.87	1.76E-05	2.95E-08
choline/ethanolamine kinase, putative	EHI_148580	-1.86	1.30E-05	1.67E-08

Fatty acid elongase, putative	EHI_111000	-1.86	2.61E-05	5.97E-08
Hypothetical protein, conserved	EHI_095850	-1.86	8.69E-06	8.14E-09
Hypothetical protein	EHI_097960	-1.84	3.96E-05	1.10E-07
Hypothetical protein, conserved	EHI_092620	-1.84	4.83E-05	1.43E-07
Hypothetical protein	EHI_125150	-1.82	8.40E-06	7.38E-09
Hypothetical protein	EHI_166360	-1.82	2.47E-05	5.43E-08
Hypothetical protein	EHI_155550	-1.81	1.78E-05	3.03E-08
NAD(P) transhydrogenase subunit alpha, putative	EHI_014030	-1.8	4.35E-06	1.94E-09
V type ATPase, C subunit, putative	EHI_059840	-1.8	2.23E-04	1.15E-06
Hypothetical protein	EHI_037160	-1.79	6.20E-05	2.10E-07
Hypothetical protein	EHI_181570	-1.78	9.60E-06	1.07E-08
Hypothetical protein	EHI_021190	-1.78	1.38E-05	1.98E-08
Hypothetical protein, conserved	EHI_160010	-1.77	1.49E-05	2.23E-08
Hypothetical protein	EHI_096340	-1.76	1.38E-05	2.01E-08
Hypothetical protein	EHI_160980	-1.76	5.09E-05	1.55E-07
Hypothetical protein	EHI_069200	-1.76	2.43E-03	2.65E-05
Short chain dehydrogenase family protein	EHI_165070	-1.76	2.90E-04	1.68E-06
Hypothetical protein	EHI_068260	-1.75	9.29E-06	1.00E-08
Hypothetical protein, conserved	EHI_014070	-1.75	1.73E-05	2.86E-08
Hypothetical protein	EHI_152800	-1.74	9.29E-06	9.70E-09
Apyrase, putative	EHI_103690	-1.72	9.29E-06	9.52E-09
Hypothetical protein	EHI_125720	-1.72	4.55E-04	2.99E-06
Hypothetical protein	EHI_180780	-1.72	1.29E-02	2.12E-04
Hypothetical protein	EHI_107130	-1.72	1.86E-05	3.28E-08
Myosin 2 heavy chain, putative	EHI_014010	-1.71	3.10E-05	7.78E-08
Hypothetical protein	EHI_115280	-1.69	1.84E-03	1.86E-05
Hypothetical protein	EHI_189460	-1.68	1.02E-03	8.77E-06
Hypothetical protein	EHI_177640	-1.67	3.25E-04	1.92E-06
Hypothetical protein	EHI_154690	-1.66	2.32E-05	4.89E-08
Hypothetical protein	EHI_022970	-1.65	4.62E-03	5.99E-05
Hypothetical protein	EHI_188720	-1.65	1.24E-04	5.40E-07
Hypothetical protein	EHI_152510	-1.63	1.58E-04	7.26E-07
Hypothetical protein	EHI_158130	-1.63	6.38E-05	2.18E-07
Hypothetical protein	EHI_017750	-1.63	1.73E-04	8.12E-07
40S ribosomal protein S11, putative	EHI_155410	-1.62	3.76E-05	1.01E-07
Hypothetical protein	EHI_181610	-1.62	2.10E-05	4.22E-08
Hypothetical protein	EHI_170150	-1.62	1.71E-05	2.81E-08
Hypothetical protein	EHI_012000	-1.62	3.12E-03	3.66E-05
Hypothetical protein	EHI_044220	-1.61	8.81E-05	3.42E-07
RhoGAP domain containing protein	EHI_153150	-1.61	1.35E-05	1.80E-08
Vacuolar proton ATPase subunit, putative	EHI_074020	-1.61	1.78E-05	3.04E-08
EhCP A5 EhCP5 cysteine proteinase, putative	EHI_168240	-1.6	6.14E-05	2.04E-07
Hypothetical protein	EHI_108710	-1.6	1.00E-03	8.50E-06
Hypothetical protein	EHI_168330	-1.6	5.80E-05	1.84E-07
Hypothetical protein	EHI_117580	-1.6	6.20E-05	2.10E-07
ALG1 family protein, putative	EHI_176700	-1.59	2.01E-05	3.88E-08

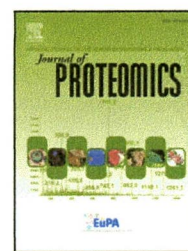
Hypothetical protein	EHI_154450	-1.59	1.63E-03	1.58E-05
Hypothetical protein	EHI_144710	-1.59	1.02E-03	8.77E-06
Protein kinase domain containing protein	EHI_048710	-1.59	4.51E-05	1.32E-07
Translation initiation factor eIF 5A, putative (eif5A)	EHI_151810	-1.59	1.44E-02	2.40E-04
Hypothetical protein	EHI_007930	-1.57	2.60E-05	5.92E-08
Nucleoside transporter, putative	EHI_169580	-1.57	5.85E-05	1.88E-07
Hypothetical protein	EHI_156330	-1.56	1.88E-04	9.09E-07
Hypothetical protein	EHI_099780	-1.56	5.25E-04	3.58E-06
Hypothetical protein	EHI_056680	-1.56	5.49E-05	1.72E-07
Hypothetical protein	EHI_010030	-1.56	5.50E-04	3.82E-06
Hypothetical protein, conserved	EHI_097630	-1.56	8.01E-05	2.98E-07
Galactose inhibitable lectin 35 kDa subunit Precursor, putative	EHI_183400	-1.55	8.13E-05	3.08E-07
Hypothetical protein	EHI_095830	-1.55	6.61E-04	4.84E-06
Hypothetical protein	EHI_031380	-1.55	5.23E-05	1.61E-07
Hypothetical protein	EHI_138470	-1.55	7.10E-04	5.45E-06
Hypothetical protein, conserved	EHI_050950	-1.54	2.51E-04	1.37E-06
Mob1/phocein family protein	EHI_065750	-1.54	2.41E-04	1.28E-06
Beta N acetylhexosaminidase, beta subunit (hexB)	EHI_007330	-1.53	9.76E-03	1.50E-04
Hypothetical protein	EHI_015010	-1.53	6.62E-04	4.85E-06
Hypothetical protein	EHI_165300	-1.53	2.86E-04	1.62E-06
Hypothetical protein	EHI_013900	-1.53	1.81E-04	8.70E-07
Hypothetical protein	EHI_146110	-1.53	6.06E-05	2.00E-07
Hypothetical protein, conserved	EHI_179920	-1.53	1.36E-03	1.26E-05
Molybdopterin cofactor sulfurase, putative	EHI_027700	-1.53	2.65E-03	2.96E-05
Gal/GalNAc lectin light subunit	EHI_148790	-1.52	3.37E-04	2.02E-06
Hypothetical protein	EHI_109920	-1.52	2.47E-05	5.45E-08
Methylene fatty acyl phospholipid synthase, putative	EHI_153710	-1.52	4.24E-04	2.71E-06
Acid sphingomyelinase like phosphodiesterase, putative	EHI_125660	-1.51	4.13E-05	1.18E-07
Amino acid transporter, putative	EHI_194200	-1.51	3.44E-03	4.17E-05
Hypothetical protein	EHI_140290	-1.51	2.02E-04	1.01E-06
Hypothetical protein, conserved	EHI_142370	-1.51	9.61E-05	3.85E-07
Serine/threonine protein phosphatase 2A catalytic subunit alpha isoform, putative	EHI_011950	-1.51	1.62E-04	7.46E-07
Hypothetical protein	EHI_164450	-1.5	4.50E-05	1.31E-07
Hypothetical protein	EHI_159520	-1.5	6.71E-05	2.35E-07

Apéndice C. Artículo 1: "Proteomic profiling reveals that EhPC4 transcription factor induces cell migration through up-regulation of the 16-kDa actin-binding protein EhABP16 in *Entamoeba histolytica*".

Apéndice D. Artículo 2: "Multinucleation and Polykaryon Formation is Promoted by the EhPC4 Transcription Factor in *Entamoeba histolytica*".

Available online at www.sciencedirect.com

ScienceDirect

www.elsevier.com/locate/jprot

Proteomic profiling reveals that EhPC4 transcription factor induces cell migration through up-regulation of the 16-kDa actin-binding protein EhABP16 in *Entamoeba histolytica*☆



Olga Hernández de la Cruz^a, Marcos Muñoz-Lino^a, Nancy Guillén^{b,c}, Christian Weber^{b,c}, Laurence A. Marchat^d, Itzel López-Rosas^a, Erika Ruíz-García^e, Horacio Astudillo-de la Vega^f, Lizeth Fuentes-Mera^g, Elizabeth Álvarez-Sánchez^a, Guillermo Mendoza-Hernández^h, César López-Camarillo^{a,*}

^aGenomics Sciences Program, Autonomous University of Mexico City, Mexico City 03100, Mexico

^bUnit of Cellular Biology of Parasitism, Pasteur Institute, 75724 Paris, France

^cINSERM U786, Paris, France

^dMultidisciplinary Program in Molecular Biomedicine, Biotechnology Program, National Polytechnic Institute, 07320 Mexico City, Mexico

^eTranslational Medicine Laboratory, National Institute of Cancerology, Mexico City, Mexico

^fLaboratory of Translational Cancer Research and Cellular Therapy, Oncology Hospital, Medical Center Siglo XXI, Mexico City, Mexico

^gDepartment of Biochemistry and Molecular Medicine, Faculty of Medicine, and Gene Therapy Unit, Center for Research and Development in Health Sciences (CIDICS), Autonomous University of Nuevo Leon, Mexico

^hMedicine Faculty, Autonomous National University of México, 04510, Mexico

ARTICLE INFO

Available online 8 April 2014

Keywords:

Entamoeba histolytica

Amoebiasis

EhPC4

SW480 monolayers destruction

Cell migration

EhABP16

ABSTRACT

Actin cytoskeleton is an essential structure involved in cell migration and invasion in parasites. In *Entamoeba histolytica*, the protozoan parasite causing human amoebiasis, the mechanisms underlying the expression of migration-related genes are poorly understood. Here, we investigated the biological effects of ectopic overexpression of EhPC4 (positive coactivator 4) in cell migration of *E. histolytica* trophozoites. Using differential in gel two-dimensional electrophoresis, 33 modulated proteins were detected in EhPC4-overexpressing cells. By electrospray ionization tandem mass spectrometry (ESI-MS/MS) analysis, 16 of these proteins were identified. Interestingly, four up-regulated proteins involved in cytoskeleton organization and cell migration were identified. Particularly, we found the up-regulation of a 16-kDa actin-binding protein (EhABP16) which is a putative member of the cofilin/tropomyosin family involved in actin polymerization. EhPC4 overexpression induced a significant increase in migration of trophozoites and in the destruction of human SW480 colon cells. Consistently, silencing of gene expression by RNA interference of EhABP16 significantly impairs cell migration. These changes were associated to alterations in the organization of actin cytoskeleton, and suppression of uropod-like structure formation in EhABP16-deficient cells. In summary, we

☆ This article is part of a Special Issue entitled: Proteomics, mass spectrometry and peptidomics, Cancun 2013. Guest Editors: César López-Camarillo, Victoria Pando-Robles and Bronwyn Jane Barkla.

* Corresponding author. Tel.: +52 5488 6661x15307.

E-mail address: genomicas@yahoo.com.mx (C. López-Camarillo).

have uncovered novel proteins modulated by EhPC4, including EhABP16, with a potential role in cell migration, cytopathogenicity and virulence in *E. histolytica*.

Biological significance

The human pathogen *Entamoeba histolytica* infects around 50 million people worldwide resulting in 40,000–100,000 deaths annually. Cell motility is a complex trait that is critical for parasites adaptation, spread and invasion processes into host tissues; it has been associated with virulence. In this study, we used a differential proteomic approach to demonstrate that *E. histolytica* EhPC4 induces changes in the expression of actin cytoskeleton proteins, including EhABP16, promoting a significant increase in cell motility and destruction of intestinal human cells. Particularly, we demonstrated for the first time that abrogation of EhABP16 impairs cell migration by altering the actin cytoskeleton dynamics and uropod-like structure formation in trophozoites. These data contribute to the understanding of molecular mechanisms that regulate virulence properties in this neglected protozoan parasite.

This article is part of a Special Issue entitled: Proteomics, mass spectrometry and peptidomics, Cancun 2013. Guest Editors: César López-Camarillo, Victoria Pando-Robles and Bronwyn Jane Barkla.

© 2014 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Regulation of actin polymerization is fundamental to mediate many cellular processes including cell motility, morphology, phagocytosis, cytokinesis, and vesicle and organelle transport. During cell motility a rapid assembly of actin filaments (F-actin) at the leading edge of cells is generated, which determines the direction of movement [1,2]. Actin-associated proteins and upstream signaling molecules regulate actin cytoskeleton dynamics and functions in response to intracellular and extracellular stimuli. In particular, ADF (actin depolymerizing factor)/cofilins are essential proteins in the rapid turnover of polymeric (F-) and monomeric (G-) actin ratio, which impacts in the control of actin-based motility processes [2]. ADF/cofilins are localized in ruffling membranes and at the leading edge of locomoting cells. Remarkably, ADF/cofilin overexpression stimulates cell movement in *Dictyostelium discoideum* [2]. In addition, extracellular guidance cues may locally alter actin dynamics by regulating the activity of LIM kinase and ADF/cofilin phosphatases via the Rho GTPases during nervous system development [3]. Ghosh M. and colleagues reported that actin polymerization generates free barbed ends and dictates the direction of cell migration [4]. In addition, it has been reported that cofilin also increases the bending flexibility of actin filaments, which reduces protrusion efficiency, contributing to motility by facilitating (lamellipodial) actin-bending [5]. Other studies showed that depletion of mouse cofilin-1 by siRNA promotes an increase in cell size and defects in both cell motility and cytokinesis [6]. In metastatic mammary tumor cells, cofilin knockdown leads to alterations in cell motility and directionality by changing the “random walking” behavior [7].

Human amoebiasis is an endemic infectious disease in developing countries caused by the protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. This intestinal pathogen establishes invasive infections and induces tissue destruction, producing amoebic colitis, dysentery and liver abscesses that affect 50 million people around the world annually [8]. Although transcriptional and posttranscriptional regulations are important to modulate the expression of virulence factors and

consequently the pathogenic potential of parasites, the underlying mechanisms are poorly understood. Today only few transcription factors have been identified and characterized in this parasite [9–14]. In addition, the potential role of pre-mRNA polyadenylation proteins in infection to host cells has not been established. Previously, we identified an *Ehpc4* gene in *E. histolytica* genome, which seems to participate in transcription and pre-mRNA polyadenylation [15]. In human cells, positive coactivator 4 (PC4) is a multifunctional nuclear protein with prominent roles in transcriptional activation, pre-mRNA 3'-end polyadenylation, chromatin condensation, DNA replication and repair [16,17]. Interestingly in a genomic-wide study using DNA microarrays it was reported that *Ehpc4* and its potential partner *EhCstf-64* were both significantly up-regulated in virulent trophozoites harvested from hamster liver abscesses after seven days of inoculation [18]. These data raise the possibility that EhPC4 may play a role in the regulation of genes participating in virulence and survival-related processes during liver abscess formation. In this study, we performed the proteomic analysis of EhPC4-overexpressing trophozoites in order to identify potential targets involved in virulence. Our data showed that EhPC4 modulates proteins with key functions in cytoskeleton dynamics, cell migration and invasion. The relevance of these findings and the role of the 16-kDa actin-binding protein EhABP16 in virulence are discussed.

2. Materials and methods

2.1. Cell cultures

E. histolytica trophozoites (strain HMI:IMSS) were axenically grown at 37 °C in Diamond's TYI-S-33 medium supplemented with 100 U/ml penicillin (Lakeside Pharma) and 100 µg/ml streptomycin and harvested during exponential growth phase. SW480 human colon adenocarcinoma cells were grown in Dulbecco's modified Eagle's media supplemented with 10% serum and penicillin/streptomycin at 37 °C in a CO₂ humidified chamber.

2.2. Cloning of *Ehpc4* gene and expression of recombinant EhPC4 protein

The 453-bp full-length *Ehpc4* gene (EHI_192520 locus) was amplified by PCR from *E. histolytica* genomic DNA using *Ehpc4*-S (5'-CCC GGA TCG ATG TCA GAT AAA AAA CCT-3') and *Ehpc4*-AS (5'-CCC AAG CTT TGC TTA TTT AAT CCA CTT-3') primers. PCR product was directionally cloned into *Bam*HI/*Hind*III restriction sites of pRSET-A expression vector (Invitrogen), which enables insert the gene downstream and in frame with a sequence that encodes an N-terminal fusion peptide. This sequence includes an ATG translation initiation codon, a polyhistidine tag, a transcript stabilizing sequence from gene 10 of phage T7, the Xpress epitope and the enterokinase cleavage recognition sequence. Sequence identity was confirmed by automatic sequencing. For recombinant EhPC4 protein expression, *Escherichia coli* BL21(DE3) pLysS bacterial strain was transformed with the pRSET-*Ehpc4* plasmid and expression of EhPC4-6xHis tagged protein was induced with 1 mM IPTG for 3 h. Bacteria were disrupted, and EhPC4-6xHis tagged protein was purified through Ni²⁺-NTA affinity chromatography (Qiagen) with an imidazol gradient. Western blot assays were performed using the His-probe H-15 (Santa Cruz Biotechnology) antibody (dilution 1:2000), and immunodetected bands were revealed by the Amersham ECL™ Prime Western Blotting Detection Reagent (GE Healthcare).

2.3. Generation of EhPC4 antibodies

Purified EhPC4 was used as antigen to inoculate a New Zealand male rabbit. An initial dose of 200 µg protein in complete Freund's adjuvant (Sigma) was subcutaneously inoculated into the scapular area. Three additional doses of 150 µg in incomplete Freund's adjuvant were injected every 15 days. IgG's from immune serum were purified through protein G sepharose affinity chromatography. EhPC4 antibodies were tested for reactivity against EhPC4 by Western blot assays. Non-transformed, transformed and IPTG-induced *E. coli* protein extracts and purified recombinant EhPC4 protein were separated through 12% SDS-PAGE and electrotransferred to a nitrocellulose membrane 0.2 µm (Bio-Rad) using standard methods. EhPC4 was detected using the α-EhPC4 polyclonal antibody (1:2000), followed by anti-rabbit immunoglobulin conjugated to HRP (1:8000, Jackson ImmunoResearch). Proteins were revealed by the Amersham ECL™ Prime Western Blotting Detection Reagent (GE Healthcare).

2.4. Transfection assays

The *Ehpc4* gene was cloned into the pKT-3 M expression vector, which is able to drive the expression of Myc-tagged fusion proteins in *E. histolytica* [19]. The full-length *Ehpc4* gene was amplified by PCR from *E. histolytica* genomic DNA using pKT-*Ehpc4*-S (5'-CCC CCC GGG ATG TCA GAT AAA AAA CCT-3') and pKT-*Ehpc4*-AS (5'-CCC CTC GAG TGC TTA TTT AAT CCA CTT-3') primers. PCR product was cloned into *Sma*I/*Xho*I restriction sites of pKT-3 M vector and confirmed by automatic sequencing. For transfection studies, pKT-3 M empty vector and pKT-3 M-*Ehpc4* plasmid were transfected into HM1:IMSS trophozoites by electroporation as previously

described [20]. Two subsequent pulses were applied using a Gene Pulser (Bio-Rad), each with an exponential discharge of 1200 V/cm and a capacitance of 25 µF. Drug selection was started 48 h after transfection with G418 (2.5 µg/ml) and the drug concentration was increased gradually up to 60 µg/ml.

2.5. Immunodetection of EhPC4 and EhPC4-Myc

For Western blot studies, total protein extracts (50 µg) from pKT-3 M and pKT-3 M *Ehpc4* transfected trophozoites were separated through 15% SDS-PAGE and electrotransferred to a nitrocellulose membrane 0.2 µm (Bio-Rad). Endogenous EhPC4 and ectopically expressed Myc-tagged EhPC4 were detected using the EhPC4 polyclonal antibody (1:2000), and anti-rabbit immunoglobulin conjugated to HRP (1:8000, Jackson ImmunoResearch). For immunofluorescence assays, trophozoites were fixed with 4% (v/w) paraformaldehyde for 1 h, permeabilized with 100% acetone for 15 s and blocked for 1 h with 1% (v/v) fetal bovine serum (FBS) in PBS 1×. Cells were incubated with a mixture of rabbit α-EhPC4 (1:100) and mouse α-Myc (1:200) antibodies during 2 h at room temperature. Thereafter, cells were incubated during 1 h at room temperature with a mixture of α-rabbit Alexa 546 (1:500) and α-mouse FITC (1:500) secondary antibodies, in order to identify simultaneously endogenous EhPC4 (red channel) or exogenous Myc-tagged EhPC4 (green channel), respectively. DNA was counterstained with 2.5 µg/ml DAPI (Invitrogen) during 1 min. Light optical sections were obtained through a Nikon inverted microscope attached to a laser confocal scanning system (TCS SP2, Leica Microsystems) and analyzed by Confocal Assistant software Image J.

2.6. Two-dimensional (2D) electrophoresis

The pKT-3 M and pKT-3 M EhPC4 cultures in mid-log phase were chilled on ice, harvested by centrifugation 5 min at 1200 rpm, and washed twice in cold PBS 1× pH 6.8 buffer. 15 × 10⁶ cells were suspended in 1 ml of lysis buffer (100 mM Tris-HCl, 2 mM PMSF and complete inhibitors coctel (Roche)) and lysed by three freeze-thaw cycles. The protein concentration was determined by the Bradford method using bovine serum albumin as standard. The proteins were further purified using the ReadyPrep 2-D Cleanup Kit (BIO-RAD), according to manufacturer's instructions. 500 µg of total proteins were resuspended in 4% (v/w) CHAPS, 80 mM DTT and 8 M urea. Samples were loaded on 11 cm IPG strips, pH gradient 4–7 (BIO-RAD). Total protein extracts (500 µg) obtained from pKT-3 M and pKT-3 M-*Ehpc4* transfected trophozoites were resuspended in 4% (v/w) CHAPS, 80 mM DTT and 8 M urea. Samples were loaded on 11 cm IPG strips, pH gradient 4–7 (Bio-Rad). Isoelectric focusing was performed in three steps: 250 V for 0.5 h, 8000 V for 2.5 h, and 8000 V for 3.0 h. Strips were equilibrated and reduced for 20 min in a buffer containing 0.375 M Tris-HCl pH 8.6, 6 M urea, 2% (v/w) SDS, 20% (v/v) glycerol and 2% (v/w) DTT. Equilibration and alkylation were performed for 20 min at room temperature in a buffer containing 0.375 M Tris-HCl pH 8.6, 6 M urea, 2% (v/w) SDS, 20% (v/v) glycerol and 2.5% (v/w) iodoacetamide. For second dimension, proteins were further separated on a 13% SDS-PAGE of 16 × 16 cm. Electrophoresis was carried out for 5 h at 200 V. Gels were stained with Sypro-Ruby dye (Invitrogen) according to

manufacturer's protocol; then images from gels were documented in a FLA-5100 Fuji Film scanner and adjusted using the Multigauge software. Protein extraction and analysis were carried out in triplicate. Melanie software version 7.0 (Genebio) was used for comparative analyses of images. Spot detection, spot boundary tool and matching were manually edited.

2.7. Electrospray ionization tandem mass spectrometry (ESI-MS/MS) analysis

Selected protein spots were washed with 50% (v/v) methanol, 5% (v/v) acetic acid for 2 h. Gels were soaked for 10 min in 100 mM ammonium bicarbonate, cut into small pieces, dehydrated with 100% acetonitrile and vacuum-dried. In gel digestion was performed by adding 30 μ l modified porcine trypsin solution (Promega, Madison, WI, USA) containing 20 ng/ μ l in 50 mM ammonium. Peptides were extracted with 50% (v/v) acetonitrile, 5% (v/v) formic acid, twice for 30 min.

Mass spectrometric analysis was carried out on a 3200 Q TRAP hybrid tandem mass spectrometer (Applied Biosystems/MDS Sciex, Concord, ON, Canada), equipped with a nano electrospray ion source (NanoSpray II) and a MicroIonSpray II head. The instrument was coupled on-line to a nanoAcquity Ultra Performance LC system (Waters Corporations, Milford, MA). Mass calibration of the hybrid triple quadrupole linear ion trap spectrometer was done with polypropylene glycol standard solutions. The instrument was then tuned and tested using [Glu1]-fibrinopeptide B (Sigma). Peptides were separated on a BEH, C₁₈ UPLC column (1.7 μ m, 75 μ m \times 100 mm, Waters Corporations) equilibrated with 2% (v/v) acetonitrile, 0.1% (v/v) formic acid using a linear gradient of 2–70% (v/v) acetonitrile, and 0.1% (v/v) formic acid over a 60 min period. Spectra were acquired in automated mode using Information Dependent Acquisition (IDA), which involves switching from MS to MS/MS mode on detection of +2 to +4 charged species. The precursor ions were fragmented by collisionally-activated dissociation

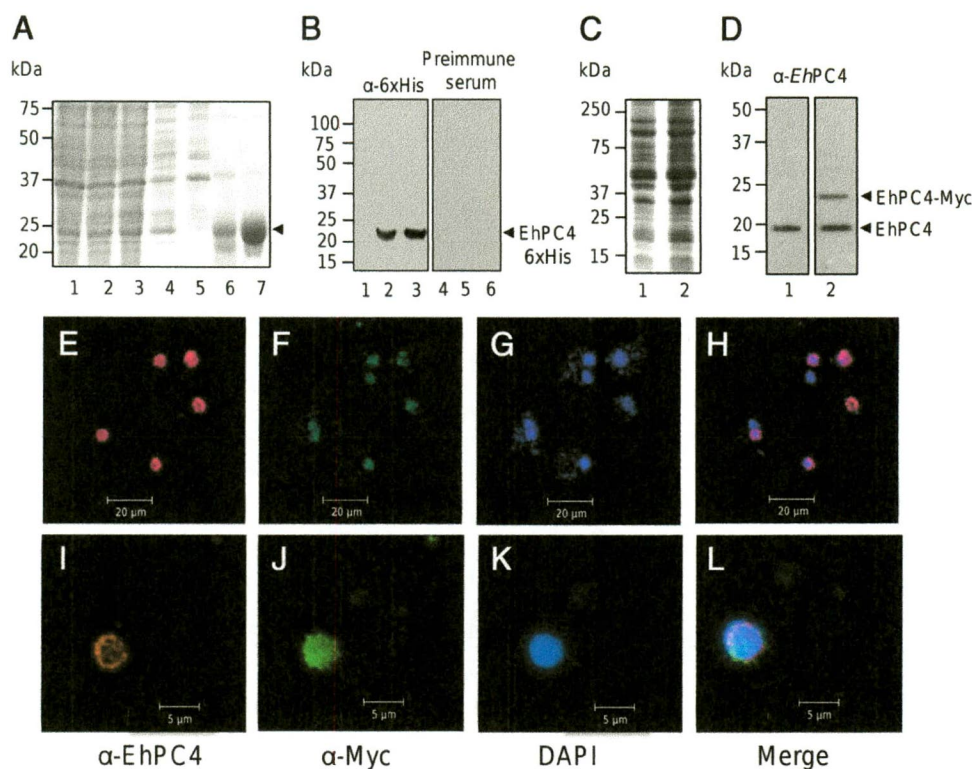


Fig. 1 – Expression of recombinant EhPC4-6xHis protein, and detection of EhPC4 in EhPC4-overexpressing cells. (A) Expression of recombinant EhPC4 6xHis-tagged protein in *E. coli*. Bacterial proteins were separated by 15% SDS-PAGE and gels were stained with Coomassie blue. Lane 1: non-transformed bacterial extracts; lane 2: pRSET-EhPC4 transformed and non-induced bacterial extracts; lane 3: IPTG-induced bacterial extracts (3 h); lane 4: soluble purified fraction; lane 5: insoluble purified fraction; lane 6: elution fraction 1; lane 7: elution fraction 2. (B) Western blot assay of bacterial EhPC4 6xHis-tagged protein using anti-6xHis tag antibodies (lanes 1–3) or preimmune serum (lanes 4–6). Lanes 1 and 4: non-transformed bacterial extracts; lanes 2 and 5: pRSET-EhPC4 transformed and non-induced bacterial extracts; lanes 3 and 6: pRSET-EhPC4 transformed and IPTG-induced bacterial extracts (3 h). (C) 15% SDS-PAGE of total protein extracts from pKT-3 M and pKT-3 M-EhPC4 transfected trophozoites. (D) Western blot of endogenous EhPC4 and EhPC4-Myc fusion protein using total protein extracts from pKT-3 M (lane 1) and pKT-3 M-EhPC4 (lane 2) transfected trophozoites, and α -EhPC4 (1:2000) and α -rabbit secondary antibodies (1:5000). (E–L) Immunofluorescence and confocal microscopy. pKT-3 M-Ehpc4 transfected cells were fixed and incubated with EhPC4 (1:100) and Myc-tag (1:100) specific primary antibodies. Secondary antibodies included and TRITC-conjugated anti-mouse IgG (1:200) and FITC-conjugated anti-rabbit IgG (1:200). Images showed the immunodetection of EhPC4 (panels E and I) and Myc-EhPC4 (panels F and J) in pKT-3 M-EhPC4 transfected cells. (G and K) Panels correspond to DAPI counterstaining. (H and L) Merged images. (I–L) Magnifications of single cells showed to enhance the visibility of nuclear staining.

(CAD) in the Q2 collision cell. Collision voltages were automatically adjusted based upon the ion charge state and mass using rolling collision energy. Data interpretation and protein identification were performed with the MS/MS spectra data sets using the MASCOT algorithm. Trypsin was used as the protease and one missed cleavage was allowed with tolerances of 0.5 Da for the precursor and 0.3 Da for the fragment ion masses. Carbamidomethyl-cysteine and methionine oxidation were used as the fixed and variable modifications, respectively. A protein "hit" was accepted as a valid identification when at least two MS/MS spectra matched at the 95% level of confidence ($p < 0.05$). Ion score is $-10 \cdot \log(P)$, where P is the probability that the observed match is a random event. The threshold ion score in the above conditions was 41 for $p < 0.05$.

2.8. Validation by semi quantitative RT-PCR

pKT-3 M and pKT-3 M EhPC4 cells were harvested by centrifugation 5 min at 1200 rpm and washed twice in cold PBS 1 × pH 6.8 buffer. Total RNA was extracted using TRIzol reagent

(Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. The extracted RNA was treated during 1 h with RQ1 RNase-Free DNase (Promega). Total RNA quantity was determined using the Nano Drop 2000 spectrophotometer (Thermo Scientific). One microgram of each DNA-free RNA sample was reverse transcribed to cDNA (in a final reaction of 20 μ l) using oligo (dT)_{12–18} primers and Superscript II reverse transcriptase (Invitrogen). 4 μ l of cDNA was utilized for PCR amplification and specific primers were used to each gene. PCR products were resolved on 1% agarose in 0.5 × TBE buffer. Densitometric analysis was performed using the myImageAnalysis software (Thermo Scientific).

2.9. Cell migration assays

Migration rates of trophozoites were assessed by cell motility assays using 5 mm transwell chambers Costar (8 μ m pore size polycarbonate membranes) within 24-well plates and bovine serum as a chemoattractant. Briefly, trophozoites were incubated in serum-free TYI-S-33 medium for 3 h, and

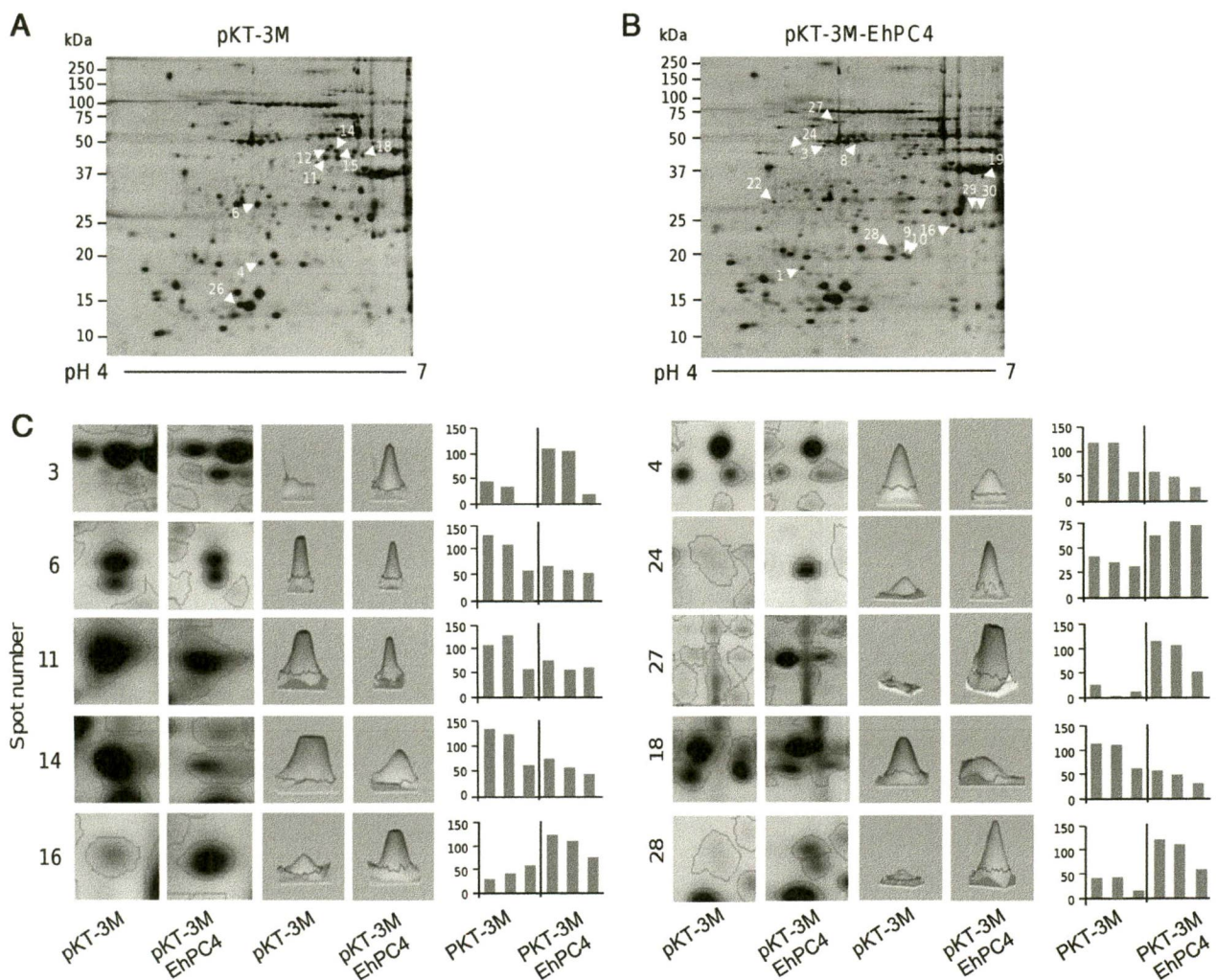


Fig. 2 – Proteomic profiles of pKT-3 M and pKT-3 M-EhPC4 transfected trophozoites. (A and B) Representative images showing the differentially expressed protein spots from pKT-3 M (A), and pKT-3 M-EhPC4 (B) transfected cells. White arrows denote some protein spots identified by ESI-MS/MS. (C) Representative densitometric analysis of selected protein that were significantly modulated in EhPC4-overexpressing trophozoites. The histograms show relative protein spot quantities from three independent gels. Spots were determined as significantly differentially-expressed according to Student's t-test ($p < 0.05$).

washed three times with TBS-CaCl₂ buffer (50 mM Tris pH 7.2, 150 mM NaCl, 1 mM CaCl₂). 10,000 cells were resuspended in 100 µl TBS-CaCl₂ buffer and dispensed in the upper chamber, while 600 µl bovine serum was loaded into the lower chamber. Plates were incubated at 37 °C for 3 h. Cells that migrated into the lower chamber were harvested and amoeba number was determined by microscopic counting. Assays were performed twice by triplicate.

2.10. Destruction of SW480 colon cell monolayers

Cytopathogenic effect of EhPC4 overexpression in trophozoites was assessed using SW480 cell line (human colon carcinoma). Confluent SW480 cells were washed three times with PBS 1× pH 6.8 and incubated at 37 °C for 45 min with non-transfected cells, and pKT-3 M or pKT-3 M-Ehpc4 treated cells in TYI-S-33 medium (1:10 ratio amoeba:SW480 cells). SW480 cells incubated with TYI-S-33 medium were included as mock control. To evaluate cellular destruction by trophozoites, the remaining monolayers were washed and stained for 10 min at 37 °C with 1% (v/w) methylene blue in 0.1 M borate buffer. The dye was extracted from the cells with 1 ml 0.1 N HCl and measured in a spectrometer at 660 nm. Experiments were performed three times by duplicate.

2.11. Double-stranded RNA (dsRNAs)-based gene silencing

For the construction of dsRNA-expression vector (pL4440-EhABP16), the 441-bp full-length EhABP16 gene (EHI_186840, amoebaDB) was amplified by PCR from *E. histolytica* genomic DNA using pL4440EhABP-S (5'-CCC AAG CTT ATG GTT GAA GTA GAA-3') and pL4440EhABP-AS (5'-CCC CTC GAG AAC ACC AGT CTT TTG-3') primers. PCR product was cloned into *Hind*III and *Xho*I restriction sites of pL4440 vector that are bidirectionally flanked by T7 promoters. The resulting plasmid was verified by PCR, restriction analysis and DNA sequencing. Double-stranded RNAs were obtained as described [21]. Briefly, competent *E. coli* HT115 cells (RNaseIII-deficient) were transformed with pL4440-EhABP16 plasmid by heat shock pulse at 42 °C for 90 s. After recovery on 2TY medium at 37 °C for 1 h, transfected bacteria were spread onto LB-agar plates containing ampicillin and tetracycline. Isolated bacterial colonies were obtained after overnight culture at 37 °C. Double-stranded RNA synthesis was induced in HT115 cells transformed with pL4440-EhABP16 by incubation with 2 mM IPTG for 4 h at 37 °C. The purification of dsRNA was performed with a mixture of phenol-chloroform-isoamyl alcohol (25:24:1) and precipitation with isopropanol. The nucleic acid pellet was washed with 70% ethanol and resuspended with boiling nuclease-free water. Nucleic acid solution was quantified by spectrophotometry and treated with RQ1 RNase-free DNase (Promega) and RNase A during 1.5 h. Then, dsRNA was treated again with a mixture of phenol-chloroform-isoamyl alcohol (25:24:1) and precipitated with ammonium acetate and isopropanol overnight. The pellet was washed with 70% ethanol, air-dried and resuspended in TE buffer. dsRNA integrity was analyzed by agarose gel electrophoresis and concentration was determined by spectrophotometry. For EhABP16 silencing assays, trophozoites (1 × 10⁴) were seeded in tubes with TYI-S-33 complete medium. Then, dsRNAs were

directly added into culture media to a final concentration of 100 µg/ml and cultures were incubated at 37 °C during 72 h. As control, dsRNAs for green-fluorescent protein (GFP) gene were used in all experiments as described previously [21].

2.12. Immunodetection of F-actin in trophozoites

EhABP16-deficient trophozoites were fixed with 4% (v/w) paraformaldehyde for 30 min and permeabilized with 100% acetone during 15 s. Then, trophozoites were blocked with 1% (v/v) fetal bovine serum (FBS) in PBS 1× during 1 h. Cells were incubated with rhodamine-phalloidin (Invitrogen) in a 1:50 dilution during 1 h at room temperature. DNA was counterstained with DAPI and trophozoites were analyzed through confocal microscopy (Leica).

2.13. Statistical analysis

Each experiment was performed three times by duplicate and results were presented as mean ± standard deviations (S.D.). Means, S.D. and p-values of the differences between means were calculated using Prism version 5 Software (GraphPad Software; CA, USA) using the paired t-test. A p-value <0.05 was considered as statistically significant.

3. Results

3.1. Ectopic expression of EhPC4 in *E. histolytica* trophozoites

In order to analyze the expression of EhPC4 in trophozoites, and because no commercial EhPC4 antibodies are available, we first generated polyclonal antibodies against the recombinant EhPC4-6xHis fusion protein produced in bacteria. EhPC4-6xHis expression was detected at 3 h after induction with IPTG mainly in the bacterial soluble fraction (Fig. 1A). The identity of EhPC4-6xHis protein was confirmed by Western blot assays using commercial anti-6xHis antibodies, which recognized a single band (21.8 kDa) in purified fractions, which corresponds to the predicted molecular weight for recombinant EhPC4. In contrast, preimmune serum did not give any signal (Fig. 1B). Then, recombinant EhPC4-6xHis was inoculated into rabbits and antibodies were obtained as described in the [Materials and methods](#) section. In Western blot assays, these antibodies recognized the same 21.8 kDa band corresponding to recombinant EhPC4, confirming their specificity (data not shown).

In order to overexpress EhPC4 in trophozoites, the *ehpc4* gene was cloned into the pKT-3 M vector and the pKT-3 M-Ehpc4 plasmid was introduced in cells by electroporation-mediated transfection as described [14]. As negative control, pKT-3 M empty vector was used. In order to evaluate the expression of EhPC4-Myc protein in pKT-3 M EhPC4 cells, we obtained total extracts of these cells and verified their integrity through SDS-PAGE following by Coomassie blue staining (Fig. 1C). Western blot assays using the specific home-made EhPC4 antibodies and total extracts from transfected cells confirm the expression of Myc-EhPC4 and endogenous EhPC4 proteins in pKT-3 M-Ehpc4 transfected trophozoites, whereas only the endogenous EhPC4 was detected in pKT-3 M control cells (Fig. 1D). These data corroborate the overexpression of exogenous EhPC4

Table 1 – Modulated proteins in EhPC4-overexpressing trophozoites identified by mass spectrometry (ESI-MS/MS).

Protein (spot number)	Molecular mass/pI	Accession number ^a (locus ID ^b)	Mascot score	Matched peptides	Coverage (%)	MS/MS peptide sequence (ion scores)	Described function in other eukaryotes
<i>Up-regulated proteins</i>							
S-phase kinase associated protein 1A (1)	18.8/4.98	C4M0Y3 (EHI_134960)	125	4	30	TTFTVTEACANQSVLVQSLMK (33), EIMEQIIR (33), EYLNEQD EYTPPEELEELKK (42)	Degradation of proteins, signals transduction and transcription
Hypothetical protein (3)	41.57/5.31	B1N569 (EHI_201420)	139	3	8	NEVFEIK (29), SQETINQIEIMK (73), ISIEEMIMK (44)	Unknown
Actin (8)	42.0/5.26	Q9TYD6 (EHI_163750)	654	16	35	AVFP SIVGRPR (38), VAPEEHPVLLTEAPMNP (94), TTGIV MDSGDGVSHSTVPIYEGFSLPHAILR (109), DLTDYLMK (38), GYAFTTTAER (29), LCYVAEDFNEEMQK (66), SYELPDGGQVITVGN (110), LEKEMIQ LAPPTMK (22), EYDESGPAIVHR (118)	Cytoskeleton, cell motility, cell division, cytokinesis and cell signaling
Bacterial transferase hexapeptide (9)	19.33/5.41	C4M079 (EHI_004840)	228	5	32	SSQQFIPHNGNVPK (51), TVIPDNSLVMGSPAK (94), EKE FEYLK (51), ENIKEYDDIK (44), QGYHLEQPQNNQ (48)	Unknown
LIM zinc finger domain containing protein (10)	16.3/5.36	C4LWF5 (EHI_096420)	172	3	30	NFFFQGTQAVYCK (62), ATATAVTD SIAIK (83), GAGGKPHSV VFGDSSER (29)	Membrane protein interacts with actin
N-acetyl muraminidase (16)	24.37/6.06	C4MAZ9 (EHI_176820)	365	9	35	HALAALVAFTNDGK (98), FNFNSLK (36), VRTEDLPHHG VILEI R (23), TLNQQT FNELMGATINLGEPIMILTGK (80), NVPVAVC DASIK (58)	Bacteriolytic enzymes
MAEBL (19)	33.59/6.18	C4LYU4 (EHI_010570)	489	8	28	FGFDPENHADGCSLDELNIHR (72), ILEHYNEHQTIQQFR-(95), LINAP QGAQSAEMQK (107), AQEMVDQVSVLLNEAVK (95), KMEEAEEYLNQK (64)	Plasmodium erythrocyte -binding protein
Eukaryotic translation initiation factor 6 (22)	26.26/4.71	C4M2Q1 (EHI_006170)	550	12	54	AEYENSTDIGVFTK (82), YCITAPGGSSSYK (32), IIEQEVSPK (57), GLLLPNTCNDQELLHLR (78), NSLPDDVVVQR (80), HTVGGNPLVGTYSVITNK (109), GAMLAPNTTQQEQEEIGTILQVPLVAGTVNR (53), LRNETDVQFASVMELMK (54)	Translation
Actin-binding protein, cofilin/tropomyosin family, EhABP16 (26)	16.49/5.23	C4LVQ1 (EHI_186840)	425	14	79	MVEVEIVEKEK (59), FQEIMSK (27), KLVIAGSGEGGVDELK (113), DTGIYFAPAR (54), DFDKIDDSICVK (79), FAFIEFIGDKSPR (52), AGVGMQLSSIQDQFGQFHITHMCS DLEDVSAEHLAK (55), NASGSASHVL (10)	Actin polymerization, interacts with actin

Transcription factor BTF3, putative (28)	19.35/6.69	C4M2W9 (EHI_048560)	60	1	6	AAQAQIEEITK (62)	Transcription
Triosephosphate isomerase (29 y 30)	28.18/5.89	O02611 (EHI_056480)	489	8	23	GVAASVDAELAK (83), KVEVIVGVFFIYIPK (86), VIACIGETEAQR (78), IANQTEEVVAAQLK (101), TATPDQAQEVHQYIR (73), KADIDGFLVGGASLDAAK (46)	Glycolysis, energy production
<i>Down-regulated proteins</i> CP1 (6)	35.54/5.8	Q01957 (EHI_074180)	695	22	41	VTPIR DQGNCGSCYTFGSIAALEGR (89), LLIEKGGDSETLDLSEEHMVQCTR (23), EDGNNGCNGGLGSNVYNYIMENGIK (57), ESDYPYTGSDSTGRSDVK-198 (18), NNYFALNHEVCAVGYGVVDGK (95), ECWIVR (40), NSWGTGWGKEK (39)	Peptidase, protein degradation.
Fe-S cluster assembly protein NifU (11 y15)	39.58/5.71	Q8MU40 (EHI_049620)	786	23	34	LIGGALWEHYSK (75), VIVADWGAECGDVAVR (72), MYWGVNPK (49), ITNLDVER (54), DSPDVPVAVPPQK (68), MHCSVMSYDVVK (29), GVNVEDLDDEEIVCSCAR (112), TVEDITHYTK (50), KYLEDILR (48), KDGGSVVEYEVK (59), KIIVIPVDLPHTHDDDLIEQLENETTLNIK (74)	Metabolism, DNA repair and transcription.
Cysteine desulfurase (12)	43.00/5.92	Q76917 (EHI_136380)	996	29	61	SVYLDNNAATTMVDPEVLNSMLPYFSEIYGNPNLSLHAFGQK (58), IIVSQIEHPSISESEK (103), MPVNEDGVVDPK (100), IAHDHGALFHSDATQAMGK (93), DVPVDYLTFTAHK (66), GVGALFIR (64), AGKPITPLLHGGEQMGGLR (50), SGTIDTPSVVGMVAVALK (39), ATHDINIENYVVR (98), DKLEAALR (35), TIPDVTIVGKPELR (101), VPNTILVAFK (81), HGIAASTGSACASESLQANPTFK (64), FGEDLSHTGIR (66), FNTEEEIDYTIIDIKK (21)	L-cysteine metabolism
Aspartate ammonia ligase (14)	40.24/5.75	C4LT17 (EHI_148470)	527	18	39	NLTYDLDLLR (17), GMNNSVVEVVHSLAK (64), TEEYICNEYSQ LKR (25), EITFLHTEDMEKEYPNLSPK (74), YGAVCVIGIGYPLPLSK (58), EKFMFHQMLLK (14), GELPLSIGGGIGQSR (84), LCMFYLQK (36), AHIGEIQASVWNHETK (34), EQLAQHNIFLL (19)	Translation
TolA-like protein (18)	38.27/6.2	C4M3R7 (EHI_052780)	217	7	12	VANAPQGDNTAELDK (24), IETAGLVAK (29), NAAIQELAK (49), LDEDDLPLRR (68)	Unknown

^a UniprotKnowledge database.

^b Pathema database.

in trophozoites. Then, we investigated the subcellular localization of endogenous EhPC4 and Myc-EhPC4 proteins in pKT-3 M-Ehpc4 transfected cells by immunofluorescence and confocal microscopy assays. Results showed that Myc-EhPC4 conserves a nuclear distribution (Fig. 1J) in a similar pattern as endogenous EhPC4 protein (Fig. 1I), indicating that Myc-tag does not affect the localization of the overexpressed protein.

3.2. Proteomic profiling of EhPC4-overexpressing trophozoites

In order to identify potential targets of EhPC4, we searched for differentially expressed proteins in EhPC4-overexpressing trophozoites through a proteomic-based approach. Differential in gel two-dimensional (2-D) electrophoresis of total protein extracts (500 µg) from pKT-3 M or pKT-3 M-Ehpc4 transfectants was performed as described in the [Materials and methods](#) section. Images from three independent biological samples were matched for each experimental set. Two representative 2-D gels from transfected trophozoites are shown in Fig. 2A and B. The spots area corresponding to differentially expressed proteins in independent gels was quantified, and spot ratios obtained from biological replicates were used for protein abundance comparisons (Fig. 2C). Results showed that the average numbers of spots detected in pKT-3 M and pKT-3 M-EhPC4 replicates were 488 and 493, respectively. Notably, all assays performed were highly reproducible. The comparison of images from both conditions led us to the detection of 33 proteins with a differential abundance between both conditions (fold change > 2.0; $p < 0.05$). We chose for protein identification those spots that exhibited the greatest definition, the highest intensity and/or did not overlap with other spots. Of these, 11 proteins were up-regulated and 6 proteins were down-regulated in EhPC4-overexpressing cells. Selected protein spots (16) were excised from Sypro Ruby-stained gels, digested with trypsin, and tryptic peptides identity was determined using tandem mass spectrometry analysis (ESI-MS/MS). An overview of identified proteins, Mascot scores, sequence coverage, and MS/MS peptide sequences (ion scores) is shown in [Table 1](#).

3.3. Overview of modulated proteins in EhPC4-overexpressing trophozoites

Bioinformatics analyses of modulated proteins showed that they participate in diverse cellular processes ([Table 1](#)). Interestingly, four factors involved in cytoskeleton organization represented by EhABP16 (spot 26), Ehactin (spot 8), EhLimA (spot 10), and EhMAEBL (spot 19), were up-regulated in response to EhPC4 overexpression. Actin is a multi-functional protein that participates in many cellular processes, including cytoskeleton organization, cell motility, cytokinesis, organelle movement and cell shape [22]. In *E. histolytica*, the role of Ehactin in cytoskeleton dynamics, cell motility, adhesion and phagocytosis has been well established [23,24]. EhMAEBL is the homologous of the *Plasmodium falciparum* transmembrane erythrocyte binding MAEBL protein, which has been reported as essential for invasion of erythrocytes and *Anopheles* salivary glands, the critical step for parasite transmission [25]. EhLimA is a LIM domain-containing protein which associates directly with actin-cytoskeleton and lipid rafts; thus it has been proposed to

be part of a molecular system connecting the actin cytoskeleton to membrane rafts in *E. histolytica* [26]. On the other hand, EhABP16 is a member of ADF/cofilin-like family of actin-depolymerizing factors involved in actin cytoskeleton dynamics, cell migration and cytokinesis in eukaryotic cells [27]. In human, ADF/cofilin is known to be a potent regulator of actin filament dynamics, and its ability to bind and depolymerize actin is abolished by phosphorylation by LIM-kinase 1, a serine/threonine kinase containing a LIM domain. Moreover, cofilin overexpression affects the organization of actin cytoskeleton and migration of human colon adenocarcinoma cells [28]. However, no ADF/cofilin homologues have been yet characterized in *E. histolytica*.

To validate changes in protein abundance detected in EhPC4-overexpressing cells, we performed quantitative RT-PCR as no commercial antibodies raised against *E. histolytica* detected proteins were available. As shown in Fig. 3, most changes in mRNA expression of selected genes were consistent with proteomic data, indicating that transcriptional modulation of genes was also reflected at protein levels. However, in some cases, mRNA expression levels do not correlate with protein abundance (for example, TolA gene), which suggests the existence of a translational regulation.

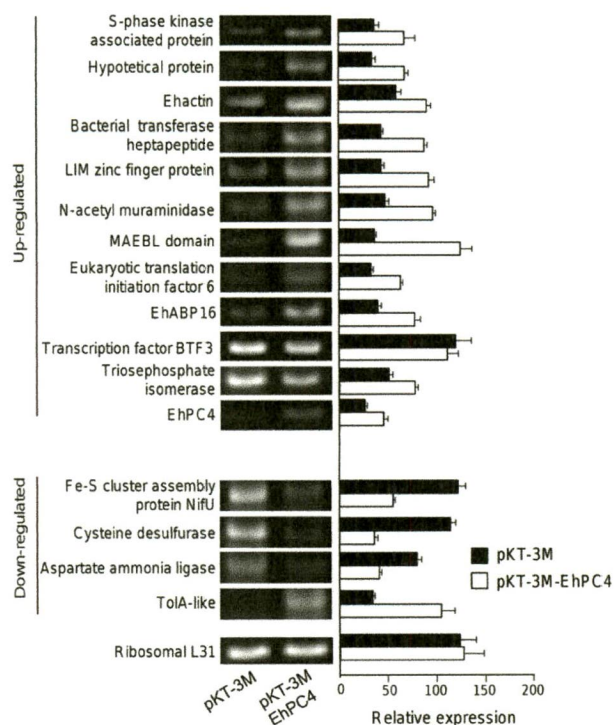


Fig. 3 – RT-PCR assays of modulated genes in EhPC4-overexpressing cells. Quantitative RT-PCR assays of up-regulated and down-regulated genes corresponding to differentially expressed proteins in EhPC4-overexpressing and control trophozoites. As loading control, L31-ribosomal transcript was amplified. Right panel corresponds to ethidium bromide stained agarose gels showing the amplified gene products. Left panel corresponds to densitometric quantification of amplified bands from three independent assays.

3.4. EhPC4 overexpression induces migration of trophozoites and destruction of intestinal host cells

Proteomics data evidenced the up-regulation of EhABP16, Ehactin, EhLimA and EhMAEBL proteins, which may have a potential impact in cellular processes related to actin-cytoskeleton dynamics, which in turn could affect cell motility and migration of trophozoites. To test this hypothesis, we analyzed migration of EhPC4-overexpressing trophozoites using transwell chambers assays. Results indicated that overexpression of EhPC4 induced a four-fold increase in the migration rates of cells transfected with pKT-3 M-Ehpc4 plasmid in comparison with controls (Fig. 4A). Because *E. histolytica* cell motility is crucial to induce damage in the mucosa epithelial layer, and to invade host tissues such as liver and brain, we next sought to investigate the destructive capability of EhPC4-overexpressing trophozoites on SW480 colon carcinoma cell monolayers. First, to discern the percentage of destruction of the monolayer by exposure to medium, SW480 cells were incubated in TYI-S-33 alone (mock control). Results indicated that trophozoites transfected with pKT-3 M-Ehpc4 plasmid showed a slightly but significant increase in destruction capacity on SW489 cell monolayers in comparison with pKT-3 M treated and non-transfected control cells (Fig. 4B and C).

3.5. EhABP16 knock-down alters actin-cytoskeleton and impairs cell migration

Proteomic analysis showed that EhABP16 was up-regulated in EhPC4-overexpressing trophozoites. EhABP16 is codified by an

intron less gene (441 nt), which predicts a protein of 146 amino acid residues. Bioinformatics analysis showed that EhABP16 protein is a member of actin-binding proteins of the ADF/cofilin family. It was annotated in AmoebaDB (EHI_186840) as an actin-binding protein member of the cofilin/tropomyosin family. EhABP16 predicted amino acid sequence contains the actin-depolymerizing factor homology domain ADF-H (3-136 residues) and cofilin-ADF (13-135 residues) motif (PF00241), as well as a region involved in F-actin binding in the C-terminal region (Fig. 5A). Predicted tertiary structure showed that these domains are folded in a similar manner as in human cofilin protein structure (PDB 4BEX). In order to understand the potential role of EhABP16 in cell migration in trophozoites, we silenced its expression by RNA interference. Results showed a significant decrease in the migration capacity of EhABP16-deficient trophozoites (dsEhABP16) in comparison to control cells represented by dsRNA GFP transfected trophozoites (Fig. 5B). Then we investigated the phenotypic effects of EhABP16 abrogation in actin cytoskeleton dynamics. F-actin was stained with rhodamine phalloidin and visualized by immunofluorescence and confocal microscopy (Fig. 5C). Results showed that the intensity and pattern of actin staining decreased in EhABP16 silenced trophozoites (dsRNA EhABP16) in comparison to control cells (dsRNA GFP). Moreover, control cells were characterized by sturdy dots of F-actin decorating cell body and a typical bright peripheral rim of lamellipodial actin network was observed. Likewise, special features at the surface represented by the pseudopod and uropod-like structures were observed, indicating a polarization process previous to migration in control cells. On the contrary, EhABP16 knockdown

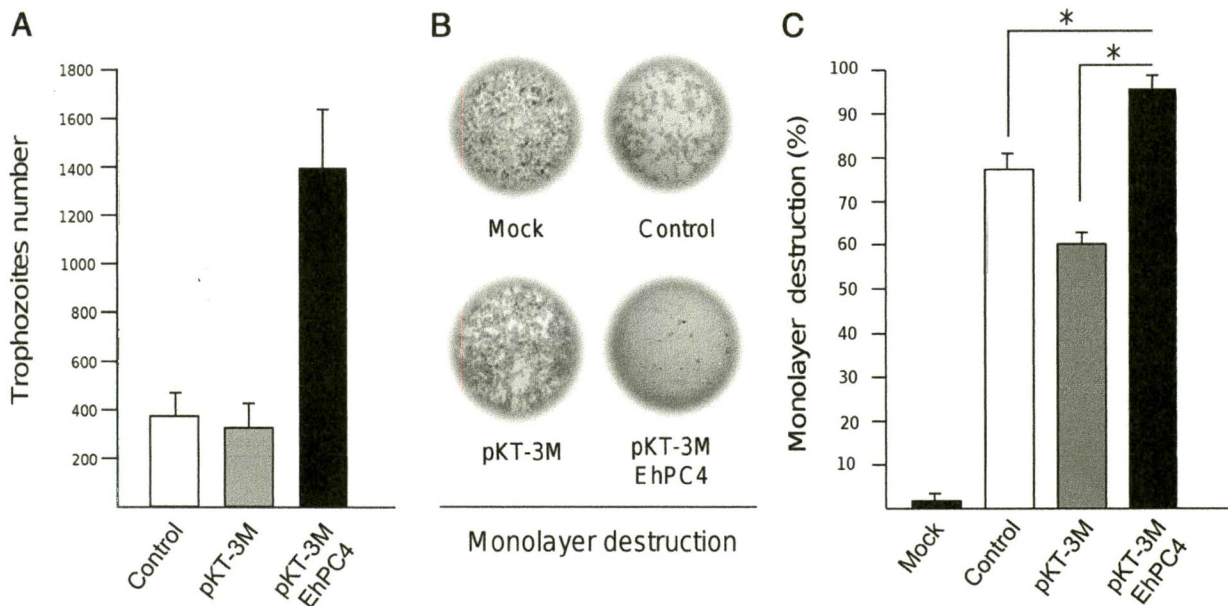


Fig. 4 – EhPC4-overexpressing trophozoites exhibit increased cell motility and destruction of SW480 colonic carcinoma monolayers. (A) Transwell motility assays. Non-transfected trophozoites (control), pKT-3 M and pKT-3 M-EhPC4 transfected cells were dispensed in the upper chamber of transwell system in serum-free and allowed to migrate into the lower chamber containing complete TYI-S-33 medium at 37 °C for 3 h. The average of cells migrating in the lower chamber was obtained from three independent experiments. **(B–C)** Cytotoxicity assays. SW480 colon carcinoma cells were incubated at 37 °C for 45 min with non-transfected (control), pKT-3 M or pKT-3 M-EhPC4 transfectants cells in TYI-S-33 medium (1:10 amoeba:SW480 cells). Mock, SW480 cells in TYI-S-33 medium. **(B)** Representative images of monolayer cell destruction by trophozoites. **(C)** Cell destruction quantification. Data correspond to the average of triplicate assays.

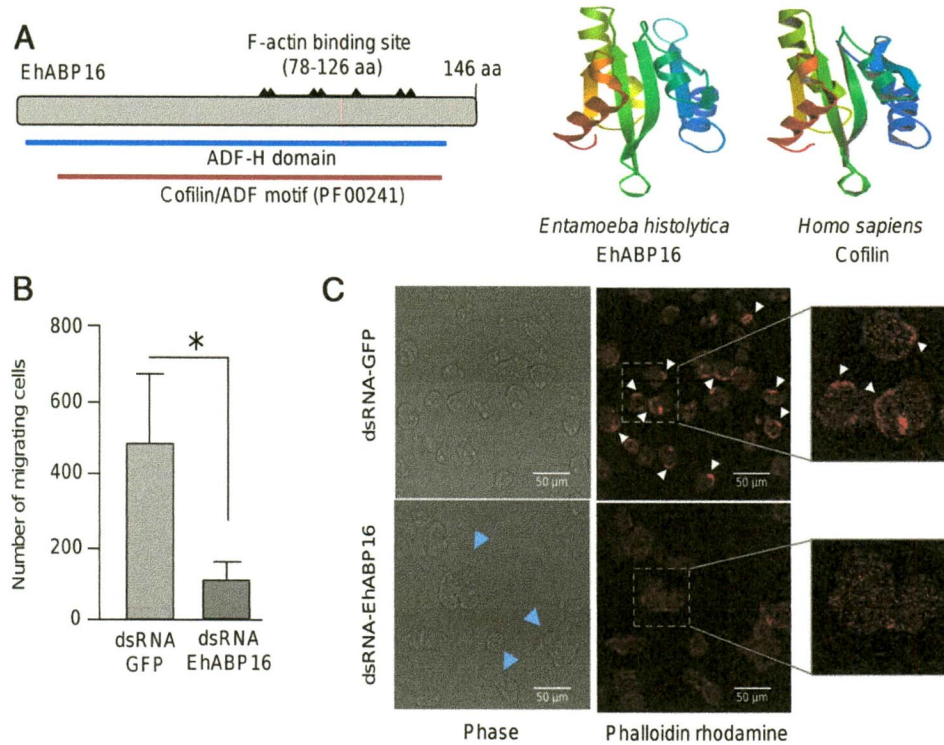


Fig. 5 – Effects of EhABP16 abrogation in cell migration and actin cytoskeleton dynamics. (A) Predicted motifs in EhABP16 protein and tertiary structure comparison with human cofilin. Three-dimensional conformation of amoeba EhABP16 was deduced by homology modeling, using data of the human cofilin protein structure (PDB 4BEX) as template and visualized with Swiss-model program. **(B)** Cell migration assays of EhABP16-silenced trophozoites. The graph shows the number of trophozoites that have migrated into the lower chamber at 3 h. The averages of three independent experiments, each with replicates are shown. **(C)** F-actin distribution in EhABP16-deficient and control trophozoites. Cells were transfected with dsRNA-GFP control or dsRNA-EhABP16, fixed and then F-actin was stained with TRITC-phalloidin (red). Analysis of actin distribution in trophozoites expressing dsRNA-GFP (top panel) or dsRNA-EhABP16 (bottom panel) was performed by confocal microscopy. White arrowheads show lamellipodial rim and uropod-like structure formation. Blue arrowheads denote EhABP16 trophozoites with alterations in morphology.

generates cells with non-uniform morphologies and irregular sizes. Moreover, F-actin was essentially dispersed throughout the cytoplasm and very few cytoskeleton structures were found (Fig. 5C). Altogether, these data indicated that EhABP16 abrogation greatly disturbs the cytoskeleton organization of trophozoites by impairing actin polymerization, which results in delocalization of F-actin and loss of polarity, resulting in diminished cell motility.

4. Discussion and conclusion

Cell migration and acquisition of cell polarity play important roles in multicellular and unicellular organisms. Notably, it is an important issue that contributes with parasite invasion and metastases in tumor cells. Therefore, the understanding of molecular mechanisms that regulate cell migration and invasiveness can help for the development of new strategies to disease control. The migration is a phenomenon initiated by the polarization of the cell, and the formation of protrusions at the cell front, called pseudopods, that serve as guidance structures indicating movement direction, followed by cell retraction at

the rear. Cell movement involves cytoskeleton remodeling by polymerization and depolymerization dynamics of actin. A plethora of proteins modulate actin cytoskeleton dynamics and cell motility during physiological process. Of these, ADF/cofilins have gained attention as they regulate actin polymerization and migration in response to environmental stimuli. These proteins contain an actin-binding module, the actin-depolymerizing factor homology (ADF-H) domain, which is present in each member of a newly identified, extensive protein family. This family consists of three distinct classes: the ADF/cofilins, the twinfilins, and the drebrin/Abp1s with essential role in actin cytoskeleton dynamics. Actin polymerization can generate forces that drive the formation of membrane protrusions, and induce the appearance of free barbed filament ends coupled with further remodeling of actin filament-containing cytoskeleton, which in turn generates protrusive structures, such as lamellipodia, invadopodia and filopodia that initiate cell movements and determine cell polarity [29]. These findings highlight the relevant role of cofilin pathway in actin-filament remodeling and cell movement.

In *E. histolytica*, diverse actin-binding proteins regulating actin-cytoskeleton, trophozoites migration, and invasion

have been reported [23,24,30–35]. However, ADF/cofilin-like proteins have not been studied yet in these processes in this parasite. Here we performed a proteomic-based approach and found that overexpression of EhPC4, a transcription/polyadenylation factor, results in the up-regulation of several proteins involved in actin-cytoskeleton organization. These initial results also suggested that some of these proteins, such as EhABP16 and Ehactin are involved in the regulation of cell migration and destruction of SW480 colon cell monolayers observed in EhPC4-overexpressing trophozoites. Consistently with this hypothesis, EhABP16 knockdown resulted in a decrease in trophozoites migration and in the F-actin distribution, which is in agreement with its participation in actin polymerization. Taken altogether, our results indicate that the increase in cell motility and pseudopods formation in EhPC4-overexpressing trophozoites may be due, at least in part, to the overexpression of EhABP16. Because EhPC4 was previously detected as up-regulated during the invasion of hamster liver, we hypothesize that EhPC4 may modulate, directly or indirectly, the expression of genes involved in cell migration and invasion in vivo. To our knowledge, this is the first report of a role for a related 3'-end pre-mRNA polyadenylation/transcription factor in the regulation of virulence properties in a protozoan parasite. Additional studies, currently in progress, will help us to better define the functions of EhPC4 transcription factor in the regulation of genes involved in virulence in *E. histolytica*.

Transparency document

The [Transparency document](#) associated with this article can be found, in the online version.

Acknowledgements

We thank the Autonomous University of Mexico City (UACM) and the Instituto de Ciencia y Tecnología del Distrito Federal, Mexico (ICyTDF/328/2011) for support. This work was supported by CONACYT (59481 and 178550 grants) and Mexico–France program (SEP-CONACYT-ANUIES; ECOS NORD grant M08-S02). Olga Hernández de la Cruz was a scholarship recipient from ECOS-NORD Mexico–France program (2008–2012).

REFERENCES

- [1] Carlier MF, Laurent V, Santolini J, Melki R, Didry D, Xia GX, et al. Actin depolymerizing factor (ADF/cofilin) enhances the rate of filament turnover: implication in actin-based motility. *J Cell Biol* 1997;136(6):1307–22.
- [2] Bravo-Cordero JJ, Magalhaes MA, Eddy RJ, Hodgson L, Condeelis J. Functions of cofilin in cell locomotion and invasion. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2013;14(7):405–15.
- [3] Gungabissoon RA, Bamburg JR. Regulation of growth cone actin dynamics by ADF/cofilin. *J Histochem Cytochem* 2003;51(4):411–20.
- [4] Ghosh M, Song X, Mouneimne G, Sidani M, Lawrence DS, Condeelis JS. Cofilin promotes actin polymerization and defines the direction of cell motility. *Science* 2004;304(5671):743–6.
- [5] McCullough BR, Blanchoin L, Martiel JL, De La Cruz EM. Cofilin increases the bending flexibility of actin filaments: implications for severing and cell mechanics. *J Mol Biol* 2008;381(3):550–8.
- [6] Hotulainen P, Paunola E, Vartiainen MK, Lappalainen P. Actin-depolymerizing factor and cofilin-1 play overlapping roles in promoting rapid F-actin depolymerization in mammalian nonmuscle cells. *Mol Biol Cell* 2005;16(2):649–64.
- [7] Sidani M, Wessels D, Mouneimne G, Ghosh M, Goswami S, Sarmiento C, et al. Cofilin determines the migration behavior and turning frequency of metastatic cancer cells. *J Cell Biol* 2007;179(4):777–91.
- [8] Stanley Jr SL. Amoebiasis. *Lancet* 2003;361(9362):1025–34.
- [9] Abhyankar MM, Hochreiter AE, Hershey J, Evans C, Zhang Y, Crasta O, et al. Characterization of an *Entamoeba histolytica* high-mobility-group box protein induced during intestinal infection. *Eukaryot Cell* 2008;7(9):1565–72.
- [10] Calixto-Gálvez M, Romero-Díaz M, García-Muñoz A, Salas-Casas A, Pais-Morales J, Galván JJ, et al. Identification of a polypeptide containing Tudor and staphylococcal nuclease-like domains as the sequence-specific binding protein to the upstream regulatory element 1 of *Entamoeba histolytica*. *Int J Parasitol* 2011;41(7):775–82.
- [11] de Dios-Bravo G, Luna-Arias JP, Riverón AM, Olivares-Trejo JJ, López-Camarillo C, Orozco E. *Entamoeba histolytica* TATA-box binding protein binds to different TATA variants in vitro. *FEBS J* 2005;272(6):1354–66.
- [12] Gilchrist CA, Baba DJ, Zhang Y, Crasta O, Evans C, Caler E, et al. Targets of the *Entamoeba histolytica* transcription factor URE3-BP. *PLoS Negl Trop Dis* 2008;2(8):e282.
- [13] Ehrenkauf GM, Hackney JA, Singh U. A developmentally regulated Myb domain protein regulates expression of a subset of stage-specific genes in *Entamoeba histolytica*. *Cell Microbiol* 2009;11(6):898–910.
- [14] Meneses E, Cárdenas H, Zárate S, Briebe LG, Orozco E, López-Camarillo C, et al. The R2R3 Myb protein family in *Entamoeba histolytica*. *Gene* 2010;455(1–2):32–42.
- [15] López-Camarillo C, López-Rosas I, Ospina-Villa JD, Marchat LA. Deciphering molecular mechanisms of mRNA metabolism in the deep-branching eukaryote *Entamoeba histolytica*. *Wiley Interdiscip Rev RNA* 2013;5(2):247–62. <http://dx.doi.org/10.1002/wrna.1205>.
- [16] Conesa C, Acker J. Sub1/PC4 a chromatin associated protein with multiple functions in transcription. *RNA Biol* 2010;7(3):287–90.
- [17] Calvo O, Manley JL. Evolutionarily conserved interaction between CstF-64 and PC4 links transcription, polyadenylation, and termination. *Mol Cell* 2001;7(5):1013–23.
- [18] Santi-Rocca J, Weber C, Guigon G, Sismeiro O, Coppée JY, Guillén N. The lysine- and glutamic acid-rich protein KERP1 plays a role in *Entamoeba histolytica* liver abscess pathogenesis. *Cell Microbiol* 2008;10(1):202–17.
- [19] Saito-Nakano Y, Yasuda T, Nakada-Tsukui K, Leippe M, Nozaki T. Rab5-associated vacuoles play a unique role in phagocytosis of the enteric protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. *J Biol Chem* 2004;279(47):49497–507.
- [20] Hamann L, Nickel R, Tannich E. Transfection and continuous expression of heterologous genes in the protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995;92(19):8975–9.
- [21] Solis CF, Santi-Rocca J, Perdomo D, Weber C, Guillén N. Use of bacterially expressed dsRNA to downregulate *Entamoeba histolytica* gene expression. *PLoS One* 2009;4(12):e842.
- [22] Allard J, Mogilner A. Traveling waves in actin dynamics and cell motility. *Curr Opin Cell Biol* 2013;25(1):107–15.
- [23] Tavares P, Rigotherier MC, Khun H, Roux P, Huerre M, Guillén N. Roles of cell adhesion and cytoskeleton activity in *Entamoeba*

- histolytica pathogenesis: a delicate balance. *Infect Immun* 2005;73(3):1771–8.
- [24] Voigt H, Guillén N. New insights into the role of the cytoskeleton in phagocytosis of *Entamoeba histolytica*. *Cell Microbiol* 1999;1(3):195–203.
- [25] Saenz FE, Balu B, Smith J, Mendonca SR, Adams JH. The transmembrane isoform of *Plasmodium falciparum* MAEBL is essential for the invasion of Anopheles salivary glands. *PLoS One* 2008;3(5):e2287.
- [26] Wender N, Villalobo E, Mirelman D. EhLimA, a novel LIM protein, localizes to the plasma membrane in *Entamoeba histolytica*. *Eukaryot Cell* 2007;6(9):1646–55.
- [27] Maciver SK, Hussey PJ. The ADF/cofilin family: actin-remodeling proteins. *Genome Biol* 2007;3(5) [reviews3007].
- [28] Popow-Woźniak A, Mazur AJ, Mannherz HG, Malicka-Błaszkiwicz M, Nowak D. Cofilin overexpression affects actin cytoskeleton organization and migration of human colon adenocarcinoma cells. *Histochem Cell Biol* 2012;138(5):725–36.
- [29] Wang W, Eddy R, Condeelis J. The cofilin pathway in breast cancer invasion and metastasis. *Nat Rev Cancer* 2007;7(6):429–40.
- [30] Bosch DE, Yang B, Siderovski DP. *Entamoeba histolytica* Rho1 regulates actin polymerization through a divergent, diaphanous-related formin. *Biochemistry* 2012;51(44):8791–801.
- [31] Campos-Parra AD, Hernández-Cuevas NA, Hernandez-Rivas R, Vargas M. EhNCABP166: a nucleocytoplasmic actin-binding protein from *Entamoeba histolytica*. *Mol Biochem Parasitol* 2010;172(1):19–30.
- [32] Ríos A, Hernández-Ramírez VI, Moguel M, Zárate Bahena AI, Rosales-Encina JL, Vargas MA, et al. Participation of Rho, ROCK-2, and GAP activities during actin microfilament rearrangements in *Entamoeba histolytica* induced by fibronectin signaling. *Cell Biol Int* 2008;32(8):984–1000.
- [33] Blazquez S, Guigon G, Weber C, Syan S, Sismeiro O, Coppée JY, et al. Chemotaxis of *Entamoeba histolytica* towards the pro-inflammatory cytokine TNF is based on PI3K signalling, cytoskeleton reorganization and the galactose/N-acetylgalactosamine lectin activity. *Cell Microbiol* 2008;10(8):1676–86.
- [34] Marion S, Laurent C, Guillén N. Signalization and cytoskeleton activity through myosin IB during the early steps of phagocytosis in *Entamoeba histolytica*: a proteomic approach. *Cell Microbiol* 2005;7(10):1504–18.
- [35] Welter BH, Powell RR, Leo M, Smith CM, Temesvari LA. A unique Rab GTPase, EhRabA, is involved in motility and polarization of *Entamoeba histolytica* cells. *Mol Biochem Parasitol* 2005;140(2):161–73.

SCIENTIFIC REPORTS



OPEN

Multinucleation and Polykaryon Formation is Promoted by the EhPC4 Transcription Factor in *Entamoeba histolytica*

Received: 22 January 2015
Accepted: 14 December 2015
Published: 21 January 2016

Olga Hernández de la Cruz¹, Laurence A. Marchat², Nancy Guillén^{3,4}, Christian Weber^{3,4}, Itzel López Rosas¹, José Díaz-Chávez⁵, Luis Herrera⁵, Arturo Rojo-Domínguez⁶, Esther Orozco⁷ & César López-Camarillo¹

Entamoeba histolytica is the intestinal parasite responsible for human amoebiasis that is a leading cause of death in developing countries. In this protozoan, heterogeneity in DNA content, polyploidy and genome plasticity have been associated to alterations in mechanisms controlling DNA replication and cell division. Studying the function of the transcription factor EhPC4, we unexpectedly found that it is functionally related to DNA replication, and multinucleation. Site-directed mutagenesis on the FRFPKG motif revealed that the K₁₂₇ residue is required for efficient EhPC4 DNA-binding activity. Remarkably, overexpression of EhPC4 significantly increased cell proliferation, DNA replication and DNA content of trophozoites. A dramatically increase in cell size resulting in the formation of giant multinucleated trophozoites (polykaryon) was also found. Multinucleation event was associated to cytokinesis failure leading to abortion of ongoing cell division. Consistently, genome-wide profiling of EhPC4 overexpressing trophozoites revealed the up-regulation of genes involved in carbohydrates and nucleic acids metabolism, chromosome segregation and cytokinesis. Forced overexpression of one of these genes, EhNUDC (nuclear movement protein), led to alterations in cytokinesis and partially recapitulated the multinucleation phenotype. These data indicate for the first time that EhPC4 is associated with events related to polyploidy and genome stability in *E. histolytica*.

Entamoeba histolytica is the protozoan responsible for human amoebiasis, a neglected parasitic disease that causes dysentery and liver abscesses in humans¹. This parasite exhibits some unusual features regarding cell and nuclear division in comparison with higher eukaryotes. In basal growth conditions, trophozoites can contain heterogeneous amounts of DNA. Nucleic acids can be within a single nucleus or distributed in multiple nuclei resulting in the formation of polyploidy cells^{2,3}. This genome plasticity is the consequence of DNA duplication events without karyokinesis or cytokinesis³. The nuclear membrane of trophozoites remains intact throughout successive mitotic processes, which contributes to the accumulation of multiple genomes in a single nucleus⁴. Moreover, *E. histolytica* lacks the typical checkpoints that participate in surveillance mechanisms of cell division in higher eukaryotes^{2,5,6}. Data mining of parasite genome confirmed the absence of known critical regulators of DNA replication and cell cycle that ensure alternation of genome duplication with chromosomes segregation in other organisms⁷. In addition, a delinking of S-phase with cytokinesis and unequal chromosomes segregation has been observed^{3,8}. Although advances in the understanding of biological events involved in control of cell division and DNA content have been reported^{6–8}, the regulation of these atypical cellular processes is poorly understood in this unicellular ancient eukaryote.

¹Universidad Autónoma de la Ciudad de México, Genomics Sciences Program, Mexico City, Mexico. ²National Polytechnic Institute, National School of Medicine and Homeopathy, Institutional Program of Molecular Biomedicine, Biotechnology Program, Mexico City, Mexico. ³Institut Pasteur, Cellular Biology of Parasitism Unit, Paris, France. ⁴INSERM U786, Paris, France. ⁵National Institute of Cancerology, Carcinogenesis Laboratory, Mexico City, Mexico. ⁶Metropolitan Autonomous University, Natural Sciences Department, Mexico City, Mexico. ⁷Center for Research and Advanced Studies of the National Polytechnic Institute, Department of Infectomics and Molecular Pathogenesis, Mexico City, Mexico. Correspondence and requests for materials should be addressed to C.L.-C. (email: genomicas@yahoo.com.mx)

The human positive coactivator 4 (PC4) is a DNA-binding protein that recognizes the promoter of class II genes and facilitates the recruitment of transcriptional activators and general transcription factors stimulating pre-initiation complex assembly^{9,10}. PC4 has additional roles in transcription termination, as well as in pre-mRNA cleavage and polyadenylation¹¹. Moreover, PC4 modulates gene expression by interacting with histones H3 and H2B to mediate chromatin organization and heterochromatin gene silencing^{12,13}. Recently, we identified an *EhPC4* orthologous gene in *E. histolytica*¹⁴, and showed that EhPC4 protein facilitates migration of trophozoites and destruction of epithelial colon host cells, indicating that EhPC4 has an impact on parasite virulence¹⁵. In this study, we further characterized the effects of overexpression of EhPC4 in trophozoites. Our results suggest that EhPC4 may represent a novel regulatory factor of genes related to multinucleation in the human pathogen *E. histolytica*.

Results

EhPC4 is conserved through evolutionary scale. Bioinformatic analyzes indicated that amino acids sequence of EhPC4 contains a single-strand DNA (ssDNA) binding region and a dimerization domain in the so-called PC4 domain at the C-terminus domain (CTD). Predicted tertiary structure revealed that these conserved regions fold into four β -sheets and one α -helix, respectively, as it has been described for the human PC4 (Fig. 1A). In order to define the most conserved residues in EhPC4 domains, we performed genomic searches of orthologous proteins. Multiple alignment of the amino acid sequences of 112 PC4 orthologues from 15 proteobacteria and 97 eukaryotes including protists, algae, fungi, plants, and animals showed that the ssDNA-binding domain represents the most conserved region (Fig. 1B, Supplementary Figure S1). Phylogenetic inference analysis revealed that the bacterial PC4 domains are highly divergent in comparison with eukaryotic proteins. Indeed, they only contain the ssDNA-binding domain and lack the dimerization domain, thus being clustered in a distinct clade from their eukaryotic counterparts (Supplementary Figure S2). These data indicate that *EhPC4* gene codifies for a conserved protein that appeared early in evolution and further diversified in higher eukaryotes. Using heuristic searches and the *E-value* threshold as a similarity measure, we found that EhPC4 and orthologous proteins share a sequence located in the ssDNA-binding domain denoted here as the $F_{x_8}RxF_{x(7-10)}Px_2KG$ motif (Fig. 1C). Therefore, we investigated if this motif is potentially involved in the interaction of EhPC4 with DNA. Molecular modeling of a ternary complex composed by the EhPC4-CTD dimer bound to an oligo-dT₍₁₈₎G predicted that F₁₀₄, R₁₁₃, and K₁₂₇ residues of the FRFPKG motif interact with DNA, indicating that they may be necessary for DNA-binding affinity (Fig. 1D). The aromatic residue F₁₀₄, could be contributing to EhPC4 DNA-binding activity via non-covalent stacking interactions with nitrogenous bases, whereas the R₁₁₃ and K₁₂₇ could be involved in the affinity of the protein through interactions with nitrogenous bases and DNA phosphate-backbone (Fig. 1D). *In silico* independent substitutions of these amino acid residues to alanine showed that the most significant increase in the interaction energy of ternary complex formation corresponds to the change of K₁₂₇ residue, suggesting that this amino acid could have an important role in DNA-binding activity (Supplementary Figure S3).

EhPC4 DNA-binding activity requires K₁₂₇ residue. To explore if EhPC4 is a DNA-binding protein, and define the importance of the K₁₂₇ residue in this activity, we performed site-directed mutagenesis to change the conserved K₁₂₇ to alanine resulting in EhPC4-K127A protein. Then, we expressed and purified the recombinant wild-type EhPC4 and mutant EhPC4-K127A proteins (Fig. 1E) to compare their DNA-binding ability by electrophoretic mobility shift assays (EMSA). It has been reported that Sub1 (*S. cerevisiae* PC4 orthologue) preferentially binds to DNA sequences close to the transcription initiation site¹⁶, but no specific DNA-binding consensus site has been identified. Therefore an *E. histolytica* EhADH112 gene promoter fragment (−151 to +24 nt position) that contains an experimentally mapped transcription initiation site¹⁷ was used as probe. Results showed that wild-type EhPC4 and DNA probe form a single complex which was supershifted by the addition of specific anti-EhPC4 antibodies¹⁵. Control assays without EhPC4, pre-incubating reaction mixture with anti-EhPC4 antibodies or with a protein that does not have affinity for DNA (BSA), did not form any complex (Fig. 1F). Interestingly, a slight smear in electrophoretic mobility was observed when EhPC4 concentration decreases (Fig. 1G, lane 5). Remarkably, the mutant EhPC4-K127A protein exhibited a dramatic decrease in DNA-binding ability, which resulted in a more pronounced electrophoretic mobility smear at lower protein concentrations in comparison with wild-type EhPC4 (Fig. 1G, lane 9). These data indicate that the K₁₂₇ residue is required for proper EhPC4 DNA-binding activity *in vitro*.

EhPC4 regulates cell proliferation and DNA replication. To investigate the subcellular localization of EhPC4 in trophozoites, we analyzed fractionated protein extracts in Western blot assays. Specific anti-EhPC4 antibodies recognized the endogenous EhPC4 in total and nuclear extracts while a weak signal was observed in the cytoplasmic fraction (Fig. 2A). Cross-contamination between cellular fractions was discarded using antibodies raised against the cytoplasmic EhCAF1 deadenylase as control¹⁸. These results were validated by immunofluorescence and confocal microscopy assays. EhPC4 signal was found in large punctuate nuclear structures with a tendency to accumulate near to nuclear membrane, whereas a very weak signal was observed in the cytoplasm (Fig. 2B). Coimmunolocalization assays of EhPC4 with lamin B1 protein confirmed that EhPC4 is also located in the nuclear membrane (Fig. 2C). Quantitative analysis of EhPC4 and lamin B colocalization using the WCIF ImageJ software, suggested that both proteins colocalized in great extent as indicates the Pearson's correlation coefficient (0.79) and Mander's overlap coefficient (0.63) (Fig. 2D).

To study EhPC4 cellular functions, we first performed knock-down assays to inhibit its expression using the pEh-hyg-TetR-O-EhPC4 tetracycline inducible vector. However, the inhibition of EhPC4 was not maintained over the days even at high tetracycline concentrations. In addition, viability of trophozoites was compromised (data not shown). Therefore, we decided to overexpress the EhPC4 protein in trophozoites and investigated the biological effects through diverse cellular approaches. A Myc-tagged EhPC4 protein was produced in

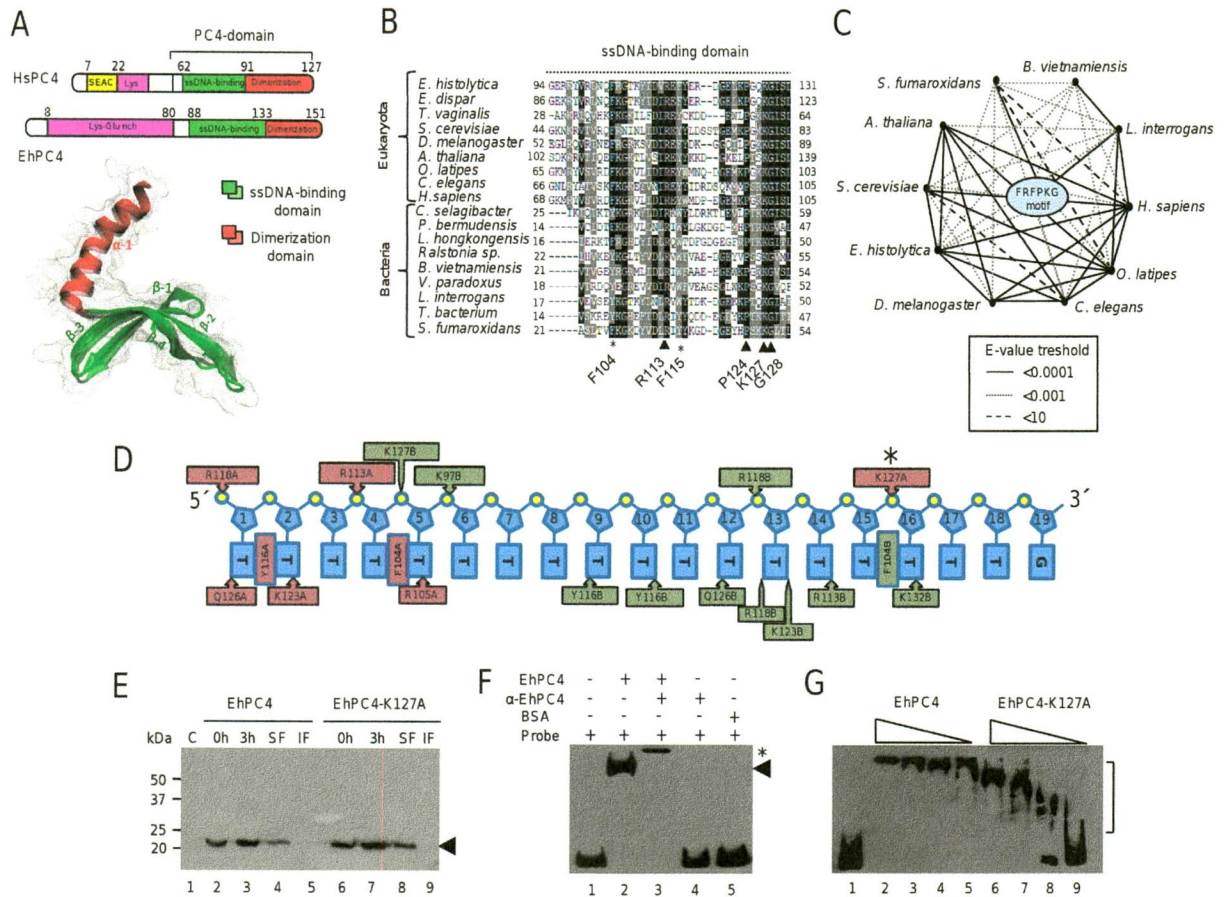


Figure 1. EhPC4 is an evolutionary conserved protein with DNA binding activity. **(A)** Molecular organization of human and *E. histolytica* PC4 proteins. Schematic representation of both proteins (upper panel) and superposition of human PC4-CTD (solid colors), and EhPC4-CTD (transparent colors) protein tertiary structures (bottom panel). EhPC4 3D model was deduced by homology using the structure of human PC4-CTD (PDB 1PCF) as template in Phyre program. The PDB files were used by the VMD (Visual Molecular Dynamics) viewer. Figure was drawn by O.H.C. **(B)** Multiple alignment of ssDNA binding domain from EhPC4 and representative orthologous proteins from bacteria and eukaryotes. Black boxes, identical residues; gray boxes, similar residues. Arrowheads indicate the most conserved residues in the FRFPKG motif. **(C)** Relationships between EhPC4 and orthologous proteins evaluated through PSI-BLAST analysis. The width of connecting lines indicates similarity level taking *E-value* as threshold. **(D)** Schematic representation that summarizes the more representative contacts between oligonucleotide dT₍₁₈₎G and amino acid residues of EhPC4-CTD dimer. Red and green residues correspond to EhPC4-CTD monomer chain A and chain B, respectively. Asterisk, lysine residue (K₁₂₇) selected for mutation. **(E)** Expression of recombinant EhPC4 and EhPC4-K127A proteins. Lane 1, non-transformed bacterial extract; lanes 2 and 6, non-induced bacterial extract; lanes 3 and 7, IPTG induced bacterial extract (3 h); lanes 4 and 8, soluble fraction (SF); lanes 5 and 9, insoluble fraction (IF). Arrowhead, recombinant protein. **(F)** Electrophoretic mobility shift assays (EMSA) of EhPC4 incubated with the biotin-labeled *EhADH112* promoter fragment. Lane 1, free *EhADH112* promoter fragment; lane 2, probe with EhPC4 (1 μg); lane 3, probe with EhPC4 (1 μg) and anti-EhPC4 antibody (2 μg); lane 4, probe with anti-EhPC4 antibody; lane 5, probe with BSA. Arrowhead, DNA-protein complex; asterisk, DNA-protein-EhPC4 antibody complex. **(G)** Comparison of DNA binding activity of wild-type EhPC4 and mutant EhPC4-K127A proteins through EMSA. Lane 1, free *EhADH112* probe; lanes 2 to 5, probe incubated with decreasing concentrations of wild-type EhPC4 (1.0, 0.5, 0.25 and 0.125 μg/lane, respectively); lanes 6 to 9, probe incubated with decreasing concentrations of EhPC4-K127A (1.0, 0.5, 0.25 and 0.125 μg/lane, respectively).

trophozoites via transfection of the pKT-3M-EhPC4 plasmid. Western blot assays using anti-Myc tag antibodies confirmed the overexpression of Myc-EhPC4 fusion protein in pKT-3M-EhPC4 transfectants (hereafter referred to as Myc-EhPC4 cells), but not in non-transfected and transfected with the pKT-3M empty vector cells (Fig. 2E, upper panel). These data were further validated using EhPC4 antibodies that recognized both the endogenous and Myc-tagged EhPC4 proteins (Fig. 2E, bottom panel). Using immunofluorescence and confocal microscopy assays, we showed that Myc-EhPC4 fusion protein conserves its nuclear localization (Fig. 2F). Notably, cell proliferation was significantly increased ($p < 0.005$) in Myc-EhPC4 cells from the third day of culture in comparison with control. Differences were even more evident at the fourth day (Fig. 2G), without significant alterations in cell viability (Fig. 2H). To investigate if differences in cell proliferation were due to an increase in DNA replication, we measured BrdU incorporation in mid-log phase trophozoites. Results showed that Myc-EhPC4 cells exhibit a

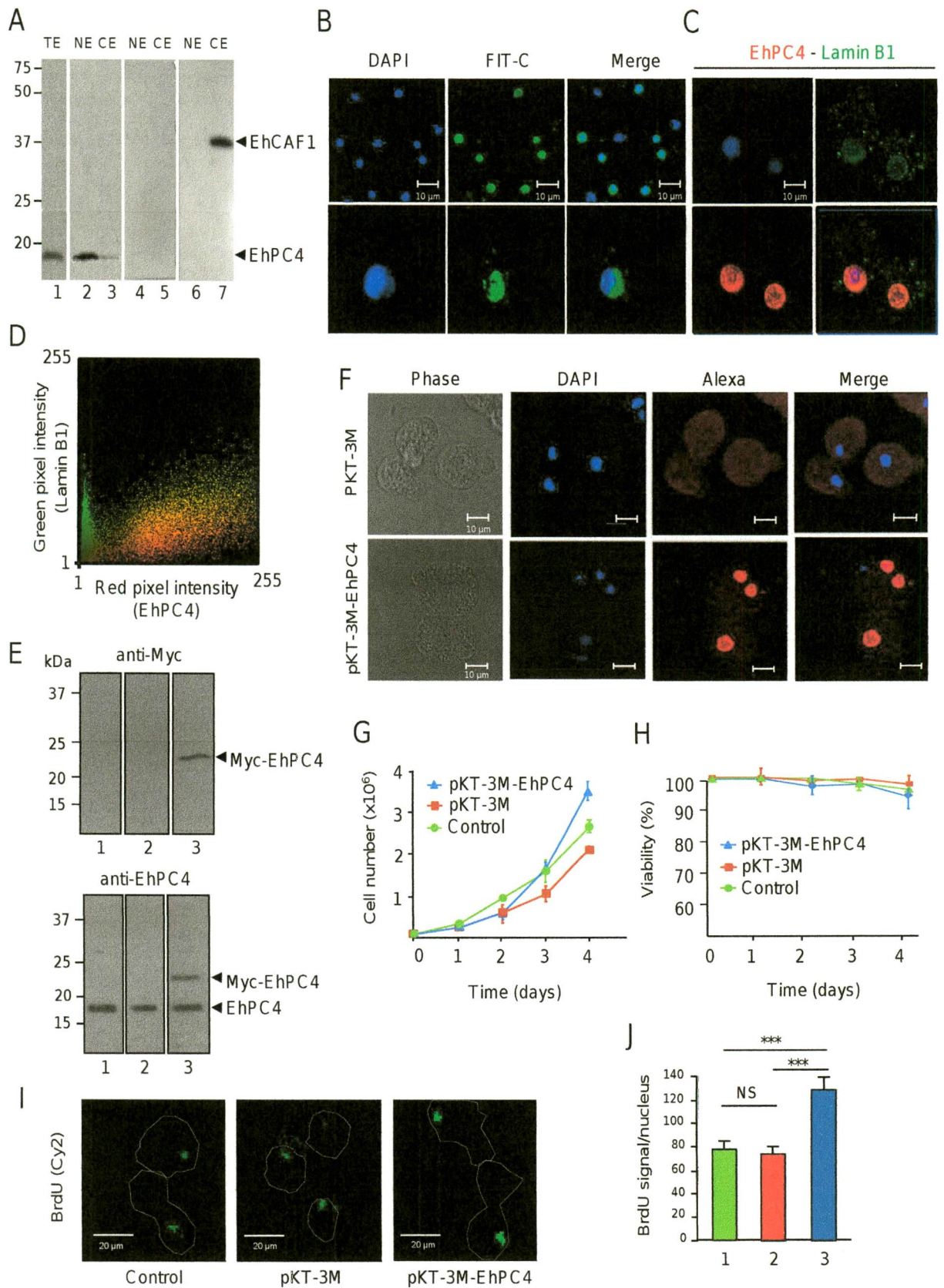


Figure 2. EhPC4 overexpression alters cell proliferation and DNA replication. (A) Immunodetection of EhPC4 in total (TE), nuclear (NE) and cytoplasmic (CE) extracts from *E. histolytica* by Western blot assays. Lanes 1 to 3, anti-EhPC4 antibodies; lanes 4 and 5, pre-immune serum; lanes 6 and 7, anti-EhCAF1 antibodies used as control. (B) Immunofluorescence and confocal microscopy assays showing the cellular localization of EhPC4 in trophozoites using anti-EhPC4 and FIT-C conjugated secondary antibodies. Phase contrast, DAPI stain, green channel (FIT-C) and merge are indicated. Bottom panels, single cell (100X magnification). (C) Coimmunolocalization of EhPC4 (Alexa 647-conjugated secondary antibodies) with lamin B1 (Alexa-488 conjugated secondary antibodies). Scale bar, 10 μ m. (D) Colocalization analysis of EhPC4 and Lamin B

proteins. Mander's scatter plot showing the pixel intensities of EhPC4 (red) and Lamin B (green) fluorescent signals. Analysis was performed using the WCIF ImageJ software. (E) Immunodetection of Myc tagged-EhPC4 and endogenous EhPC4 proteins in pKT-3M-EhPC4 transfected trophozoites using anti-Myc (upper panel), and anti-EhPC4 (bottom panel) antibodies by Western blot assays. Lane 1, untransfected cells; lane 2, pKT-3M transfected cells; lane 3, pKT-3M-EhPC4 transfected cells. (F) Immunofluorescence and confocal microscopy assays showing the cellular localization of Myc-tagged EhPC4 using anti-Myc and Alexa 546 conjugated secondary antibodies. Phase contrast, DAPI stain, green channel (FIT-C) and merge are shown for pKT-3M (upper panels) and pKT-3M-EhPC4 (bottom panels) transfected trophozoites. (G) Proliferation and (H) viability of non-transfected, pKT-3M and pKT-3M-EhPC4 transfected trophozoites. Values shown are the mean of three independent experiments \pm SD. (I) Confocal microscopy of fluorescent BrdU incorporation in non-transfected, pKT-3M and pKT-3M-EhPC4 transfected trophozoites. Green channel, Cy2 staining. Punctuate line, cell contour. (J) Quantification of fluorescent BrdU signal intensity in (H). In each case, 150 cells were analyzed and data correspond to the mean \pm SD. Bar 1, control cells; bar 2, pKT-3M transfected trophozoites; bar 3, pKT-3M-EhPC4 transfected trophozoites.

significant 2-fold increase ($p < 0.05$) in fluorescent BrdU signal intensity in comparison with control cells indicative of an enhanced DNA replication activity (Fig. 2I,J). These differences were unlikely due to variations in the efficacy of BrdU incorporation, since the percentage of trophozoites incorporating the fluorescent nucleoside was similar in non-transfected (59%), pKT-3M (58%) and pKT-3M-EhPC4 (54%) transfected cells.

EhPC4 overexpressing cells are multinucleated. During our experiments, we discovered that DNA replication is augmented in Myc-EhPC4 cells. Therefore we decided to compare DNA content and nuclei number between these trophozoites and control cells. Because trophozoites contain heterogeneous amounts of DNA and nuclei number, we synchronized *E. histolytica* cultures by 12 h serum starvation to reduce DNA heterogeneity¹⁹. As shown in Fig. 3A, DNA content was different between pKT-3M transfected cells and Myc-EhPC4 cells. After synchronization (time 0), DNA amount was reduced, reaching similar levels in both cultures. At 96 h post-synchronization, Myc-EhPC4 cells contain a higher amount of DNA in comparison with pKT-3M control cells (Fig. 3A). Congruently, we observed the apparition of giant multinucleated Myc-EhPC4 cells, resembling a polykaryon, in a time-dependent manner (Fig. 3B). The number of cells with three or more pleomorphic nuclei (hereafter grouped and referred to as multinucleated cells) slightly increased at 48 h and 72 h post-synchronization in Myc-EhPC4 cells (4.7 and 4.1%, respectively) in comparison with non-transfected or pKT-3M transfected control trophozoites (2.0% and 1.3%, respectively). Remarkably, at 96 h post-synchronization, the number of giant multinucleated Myc-EhPC4 cells dramatically increased up to 27.4%, with up to 16 nuclei per cell (Fig. 3C,D).

These morphological alterations were accompanied by a significant increase in cell size from an initial average diameter of 23 μ m in control cells to 28–37 μ m in Myc-EhPC4 cells at 96 h post-synchronization (Fig. 3E). We did not detect significant differences in DNA content and nuclei number per cell when control cells were grown up to 120 h or reached 100% confluence (data not shown). Therefore, we discarded that multinucleation observed in Myc-EhPC4 cells was a secondary effect of nutrient depletion or high cell density.

The multinucleation phenotype observed in Myc-EhPC4 cells may be due to cytokinesis failure or syncytium formation by cell-cell fusion²⁰. To distinguish between both possibilities, we analyzed the population of trophozoites that are undergoing cell division in the log phase of growth culture. The number of trophozoites carrying out successful cell division was estimated through live-cell imaging. Examination of living cells undergoing mitotic exit revealed that about 76% of non-transfected and 80% of pKT-3M control cells display the typical sequence of events that concludes in the formation of two daughter cells. The formation of the cleavage furrow separating the cytoplasm into two parts occurred at 100 s recording time in pKT-3M cells. Subsequently, each cell pulled in opposite directions, causing tension on constriction and forming the cytoplasmic bridge (200 s), which was cleaved to produce two daughter cells (300 s) (Fig. 3E,G; Supplementary Video 1). In contrast, only a low percentage (less than 10%) of Myc-EhPC4 cells successfully performed cytokinesis (Fig. 3F). In most trophozoites, video capture images showed the formation of the cleavage furrow (0 s to 100 s), which begins to separate and form the cytoplasmic bridge (200 s). However, after several attempts to break the bridge, most trophozoites enlarged and finally contracted again without performing cytokinesis (300 s) (Fig. 3G; Supplementary Video 2). No events indicative of cell-cell fusion were observed during our experiments.

EhPC4 modulates genes involved in DNA metabolism, DNA replication, and chromosome segregation. To determine the impact of EhPC4 on gene expression that can explain the cellular alterations described above, we investigated the genome-wide changes in gene expression by comparing the transcriptome of Myc-EhPC4 cells *versus* control trophozoites using *E. histolytica* DNA microarrays. Data from three biological replicates were analyzed, normalized, and raw *p*-values adjusted as previously described²¹. Only genes with a significant fold change ($FC > 1.5$; $p < 0.05$) were included in this analysis. Transcriptional profiling showed that 328 genes were significantly modulated (204 up-regulated and 124 down-regulated) in Myc-EhPC4 cells (Supplementary tables S1 and S2). Classification of regulated genes into functional categories according to Gene Ontology (GO) evidenced that they participate in diverse biological processes including signal transduction, cell division and metabolism, among others (Fig. 4A). Nine genes encoding *EhPGM*, *EhHK*, *EhGPI*, *EhALDO*, *EhTPI*, *EhGAP*, *EhPGK*, *EhENO* and *EhADH* proteins involved in glucose, fructose, and mannose utilization were significantly up-regulated. This observation suggests that an increase in carbohydrate metabolism may be supporting the requirements for the enhanced cell proliferation observed in Myc-EhPC4 cells (Supplementary Figure S4). The four *EhNDK*, *EhDPD*, *EhPNP* and *EhPAPSS2* genes whose products are involved in early reactions

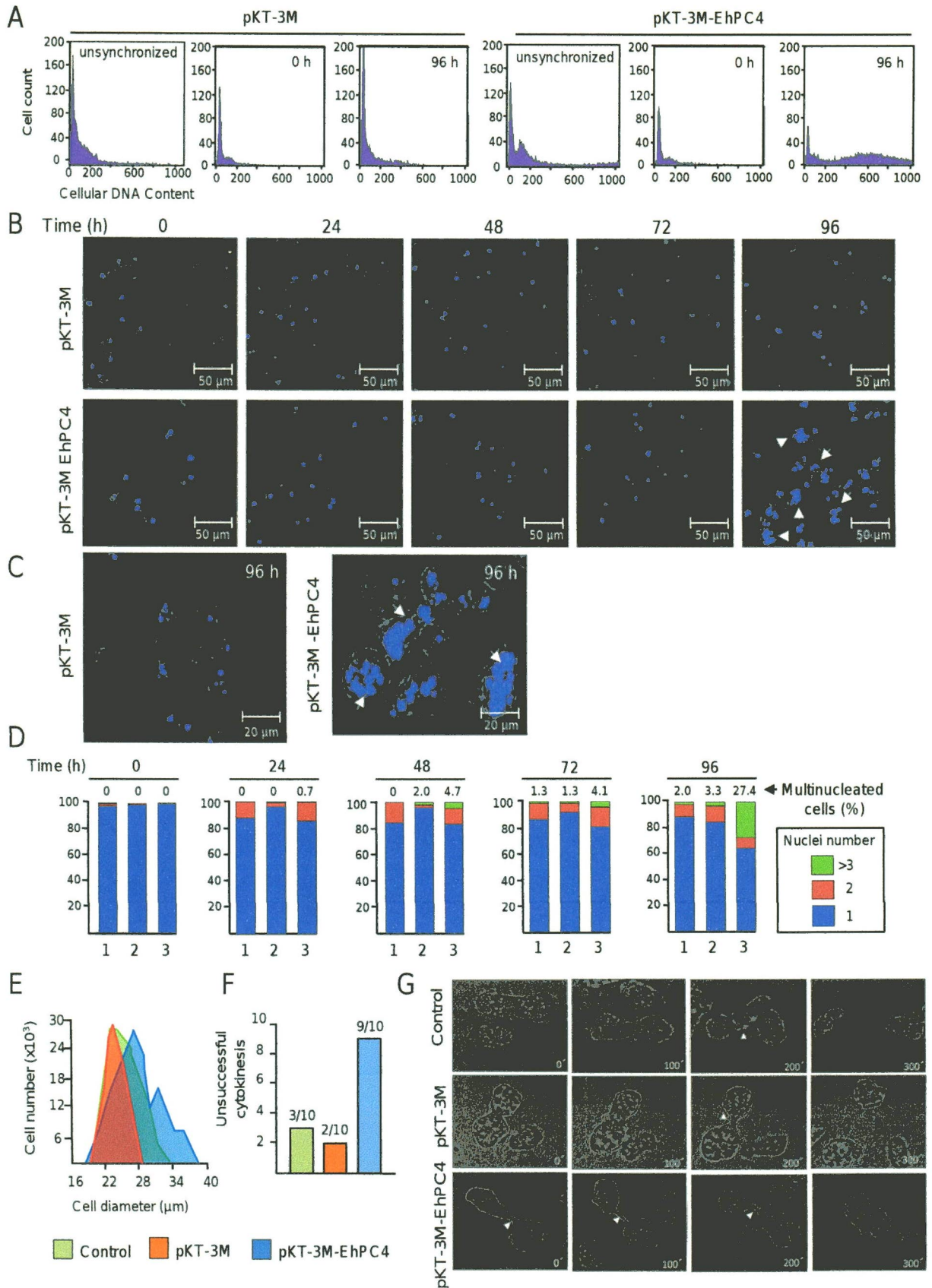


Figure 3. EhPC4 overexpression increases nuclei number and DNA content. (A) Cellular DNA content profiles obtained by FACS analysis. pKT-3M and pKT-3M-EhPC4 transfected trophozoites were synchronized, cultured for 96 h, fixed and stained with PI. The cellular DNA content (x-axis) was analyzed by flow cytometry. The y-axis represents cell count. (B) Fluorescence and confocal microscopy assays showing changes in morphology and nuclei number of synchronized trophozoites overexpressing EhPC4. pKT-3M and pKT-3M-EhPC4 transfected trophozoites were cultured for different time (0, 24, 48, 72 and 96 h) and stained with

DAPI. (C) Magnification of giant multinucleated cells. Arrowhead, pleiomorphic giant multinucleated cells (polykaryon). (D) Number of nuclei per trophozoites from 250 randomly selected untransfected control¹, pKT-3M² and pKT-3M-EhPC4³ transfected cells in (B). (E) Cell diameter of untransfected (control), pKT-3M and pKT-3M-EhPC4 trophozoites at 96 h post-synchronization. (F) Quantification of cells with unsuccessful cytokinesis in 10 independent cell division events. (G) Representative time-lapse images of untransfected (control), pKT-3M and pKT-3M-EhPC4 transfected trophozoites undergoing cytokinesis. Numbers shown in the lower right corner indicate the relative passage of time in seconds. Arrowheads indicate the cytoplasmic bridge.

of nucleotide metabolism were also up-regulated (Supplementary Figure S5). These proteins may fulfill the cellular demand to sustain the increased DNA replication in Myc-EhPC4 cells. Of particular interest, a set of deregulated genes participating in DNA replication, repair, cell division, cytokinesis, and chromosome partitioning was found (Supplementary Table S3). To validate DNA microarrays data and corroborate that EhPC4 directly binds to the promoter of up-regulated genes in Myc-EhPC4 cells, we performed chromatin immunoprecipitation assays for eight selected genes (Fig. 4B). Results showed that EhPC4 interacts with the core promoter of *EhNUDC*, *EhCDC48*, *EhSTG1*, *EhSMC*, *EhCWF2*, *EhODC1*, *EhSKIP1* and *EhDUSP1* genes *in vivo* suggesting that these genes are true EhPC4 targets.

EhNUDC alters cytokinesis and recapitulates the multinucleation event. To further obtain mechanistic insights about the EhPC4-mediated multinucleation event, we focused in the study of EhNUDC (nuclear movement protein) whose expression was 2.7-fold up-regulated in Myc-EhPC4 cells. The predicted EhNUDC amino acids sequence (C4M7J1) reported in AmoebaDB (<http://amoebadb.org/amoeba/>) contains the characteristic p23-NUDC-like domain and shows 42% identity with the human NUDC homologue (Q9Y266) involved in cytokinesis, nuclear migration and mitosis (Fig. 4C). In order to investigate the potential role of EhNUDC in multinucleation in *E. histolytica*, a Myc-tagged EhNUDC construct was ectopically expressed in trophozoites, and the number of nuclei per cell was determined as described above. Results of Western blot and immunofluorescence assays confirmed the expression of Myc-EhNUDC protein in the cytoplasm of pKT-3M-EhNUDC transfectants (Fig. 4D,E). Cell proliferation of pKT-3M-EhNUDC cells was not significantly affected at the fourth day in comparison with pKT-3M control (Fig. 4F). Notably, EhNUDC overexpressing trophozoites appeared as larger cells with irregular contours, and alterations in morphology accompanied with the formation of cells clumps. The proportion of flat cells containing multiple nuclei was significant higher in Myc-EhNUDC cells in comparison with control cells (Fig. 4G,H). To define if multinucleation also results from cytokinesis failure, we followed cell divisions of pKT-3M control and pKT-3M-EhNUDC transfected cells by live-cell imaging. Examination of living cells undergoing mitotic exit revealed that 79% of control trophozoites display the typical sequence of events that concludes in the formation of two daughter cells. In contrast, only a reduced number of Myc-EhNUDC trophozoites (30%) carried out successful cytokinesis, and cell division attempts of most trophozoites resulted in polykaryon formation (Fig. 4I; Supplementary Video S3). No evidence of cell-cell fusion events was observed. These results indicate that multinucleated Myc-EhNUDC trophozoites were originated from cytokinesis failure.

Discussion

Genetic stability is achieved by the coordinated regulation of DNA replication, chromosomal segregation, and cell cycle checkpoints in almost all eukaryotic lineages. In human cells, abnormal karyotype with multiple structural and numerical aberrations of chromosomes leads to multinucleation, polyploidization, aneuploidy and cancer²². In protozoan parasites, multinucleation and polyploidy are frequently seen in culture. However, the molecular mechanisms underlying these cellular events and their functional relevance are poorly understood. In *E. histolytica* trophozoites multinucleation and polyploidy contribute to their genetic diversity and allows them to develop specific responses to environment and host challenges. It may also provide a better adaptation to host conditions during tissue invasion in acute disease^{23–26}. However, the operating mechanisms of polyploidy and multinucleation are not clear and most regulating molecules have not been identified yet. Therefore, the early branching eukaryote *E. histolytica* represents a suitable model for genome plasticity studies.

In this investigation we showed that EhPC4, the positive coactivator 4 of *E. histolytica*, is a *bona fide* DNA-binding protein *in vitro*. Notably, the inability of the mutant EhPC4-K127A protein to properly interact with DNA highlights the relevance of the novel FRFPKG motif for EhPC4 DNA affinity. In addition, the smears observed in EMSA at the lower protein concentrations are typical of DNA-binding proteins with a non-specific binding sequence²⁷. These observations strengthened the hypothesis that EhPC4 is a non-specific DNA-binding protein, which may be recruited by additional transcription factors to target promoters, as it has been described for homologous proteins in other organisms²⁸. For example, the human PC4 participates in diverse processes through its non-specific binding to DNA. During the early stages of DNA double-strand breaks repair, PC4 recognizes DNA rupture sites across the genome and facilitates the subsequent steps of DNA repair²⁹. During transcription initiation, Sub1 (*S. cerevisiae* PC4 orthologue) binds to the promoter region of specific genes and plays both a negative and a positive role in transcription initiation and elongation. Upon promoter melting, Sub1 interacts with the DNA template, stabilizing the open complex and stimulating gene transcription²⁹. In addition, Sub1 has DNA-independent functions when it associates with Spt5 to influence RNA polymerase II transcription elongation rate³⁰.

Here, we used various cellular and molecular approaches to dissect the molecular functions of EhPC4. A significant increase in cell proliferation, cell size, and DNA replication was found in parasites overexpressing EhPC4, resulting in the formation of giant multinucleated trophozoites. Interestingly, these morphological changes may

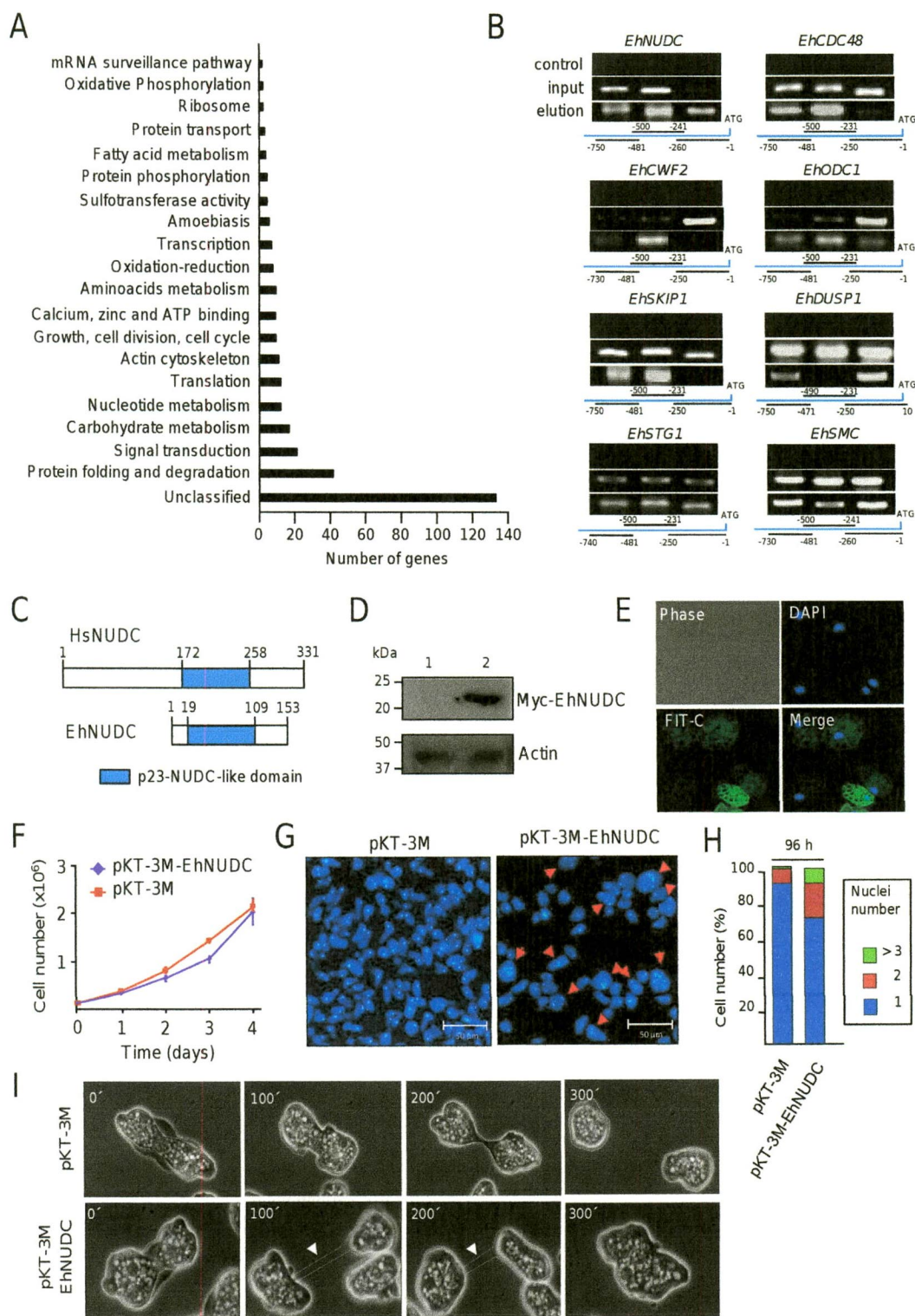


Figure 4. Gene modulation in Myc-EhPC4 cells and cytokinesis failure in EhNUDC overexpressing trophozoites. (A) Transcriptome analysis and classification of modulated genes in Myc-EhPC4 cells based in GO categories. (B) Chromatin immunoprecipitation (ChIP) assays. Detection of EhPC4 binding to selected gene promoters. Agarose gel electrophoresis (1%) of PCR amplicons using three different pairs of primers for each selected gene promoters. Input fraction corresponding to total sonicated DNA was used as control. Numbers in bottom scheme indicate the position of primers in promoters. (C) Schematic representation of human NUDC and EhNUDC proteins. The conserved P23-NUDC-like domain is indicated. (D) Immunodetection of Myc-EhNUDC in pKT-3M-EhNUDC transfected trophozoites using anti-Myc antibodies in Western blot assays. Lane 1, pKT-3M transfected cells (control); lane 2, pKT-3M-EhNUDC transfected cells. (E) Immunofluorescence and confocal microscopy assays showing the cellular localization of Myc-tagged EhNUDC in trophozoites using anti-Myc antibodies. Cells were treated with FITC-labeled secondary antibodies and counterstained with DAPI. Green channel, Myc-tagged EhNUDC; blue channel, DAPI staining. (F) Growth kinetics of pKT-3M-EhNUDC trophozoites. (G). Fluorescence and confocal

microscopy assays of pKT-3M control and pKT-3M-EhNUDC transfected trophozoites stained with DAPI. Red arrowheads indicate giant multinucleated cells. (H) Quantification of nuclei number from 250 randomly selected EhNUDC overexpressing trophozoites. (I) Representative time-lapse images of untransfected (control), pKT-3M, and pKT-3M-EhNUDC transfected trophozoites undergoing cytokinesis. Numbers shown in the upper left corner indicate the relative passage of time in seconds. Arrowheads indicate the cytoplasmic bridge.

be linked to virulence since EhPC4 overexpressing trophozoites display exacerbated virulence properties represented by a significant increase in trophozoites migration and destruction of epithelial colon host cells¹⁵. A similar association between pathogenicity, cell size and polyploidy has been reported in fungi. During infection, *Cryptococcus neoformans* exhibits cellular enlargement *in vivo*, producing cells up to 100 μm large that are polyploid and uninucleated (namely Titan cells). The higher DNA content may be due to increased DNA replication. The increase in cell size was related to a reduced phagocytosis by host mononuclear cells, and an increased resistance to oxidative and nitrosative stress, which results in an increased pathogenicity³¹. On the other hand, polykaryon formation has been found in cells following multinucleation. In *E. histolytica*, an early report suggested that these structures might be formed in cell culture³². However, their biological significance is unknown, and they still represent an unsolved issue in protozoan parasites. We also observed that Myc-EhPC4 trophozoites undergoes polyploidy evidenced by giant nuclei, followed by production of polymorphic polykaryon of different nuclear size. Our data indicate that these events were associated to asynchronous rates of nuclear and cytoplasmic divisions in response to EhPC4 overexpression.

Along with the need to sustain a larger cell, the morphological changes observed in Myc-EhPC4 trophozoites require the activation of a precise genetic program in trophozoites. Indeed, DNA microarrays profiling revealed the modulation of genes involved in cell proliferation, carbohydrates and nucleotides metabolism, DNA replication, cytokinesis, and chromosome partitioning among others. The coordinated function of these genes supports the phenotype observed in Myc-EhPC4 trophozoites. Expression profiling, chromatin immunoprecipitation, and cellular approaches identified EhNUDC as a novel EhPC4 target in *E. histolytica*. Interestingly, ectopic overexpression of EhNUDC partially recapitulated the multinucleation phenotype. NUDC is a dynein-associated nuclear movement protein that regulates microtubule organization during mitosis and cytokinesis in mammalian cells³³. In *Aspergillus nidulans*, NUDC is needed for nuclear movement; it is part of the dynein/NUDF complex that regulates microtubule organization and spindle formation³⁴. Mammalian NUDC is essential for cell proliferation in both normal and tumor tissues; its expression increases in various cellular types undergoing mitosis or stimulated to proliferate³⁵. Notably, it was shown that overexpression of human NUDC induces cytokinesis failure and multinucleation³³. Intriguingly, down-regulation of NUDC also affects mitosis and induces the formation of multinucleated cells. This phenotype is reversed by ectopic expression of wild-type NUDC, but not by NUDC with mutations in the Polo-like kinase 1 (Plk1) phosphorylation sites, which suggests that Plk1 phosphorylation of NUDC may influence cytokinesis³⁶. Interestingly, a Plk1 orthologous gene was found overexpressed in Myc-EhPC4 trophozoites, which suggests that EhNUDC could also be regulated by Plk1-mediated phosphorylation during cytokinesis in *E. histolytica*. These observations deserve further investigation. It is important to note that the multinucleation events observed here are specific of EhPC4 and EhNUDC overexpression, as the overexpression of the EhCAF1 deadenylase did not produce the same phenotype (our unpublished data).

In conclusion, our results suggested for the first time an unexpected role for the transcription factor PC4 in the regulation of genetic stability in a unicellular eukaryote. They also suggested that mechanisms contributing to polyploidy in eukaryotes were originated from early branching eukaryotes and further diversified in higher eukaryotes. These data may be useful for the search for new targets to abrogate cell proliferation and survival in this human pathogen.

Methods

Cell cultures. *E. histolytica* trophozoites (HM1:IMSS strain) were axenically grown at 37 °C in Diamond's TYI-S-33 medium and harvested during exponential growth phase for experiments.

In silico analysis. PC4 orthologues were identified by BLAST in NCBI database using the EhPC4 amino acid sequence (UNIPROT: C4M1H2) as query. Functional domains were predicted using MyHits server. Multiple alignments were performed using the ClustalW program. The phylogenetic tree was constructed by the Neighbor-Joining method using the MEGA software (version 5.0). EhPC4 tertiary structure was predicted using the Phyre program and the construction of structural alignment was performed using VMD viewer. Molecular modeling of CTD-EhPC4 dimer in complex with a 19-mer oligonucleotide (oligo-dT₍₁₈₎G) was generated by homology using the MOE program. Amino acids candidate for mutation were identified according to their relevance for DNA-protein interaction based on molecular modeling.

Plasmids construction. *EhPC4* (EHI_192520) and mutated *EhPC4-K127A* genes were cloned into the pRSET-A expression vector following standard protocols; *EhPC4* and *EhNUDC* (EHI_023890) genes were cloned into the pKT-3M vector³⁷.

Expression and purification of recombinant proteins. Recombinant EhPC4 and EhPC4-K127A proteins were expressed adding 1 mM IPTG for 3 h in *E. coli* BL21(DE3)pLysS cells that were previously transformed with pRSET-EhPC4 and pRSET-EhPC4-K127A plasmids, respectively. They were purified under native conditions by affinity chromatography using Ni Sepharose™ High Performance His trap™ HP (GE Healthcare) columns.

Western blot assays. Nuclear and cytoplasmic extracts of *E. histolytica* trophozoites were obtained as described³⁸. Protein concentration was measured by the Bradford method. Proteins (50 µg per lane) were separated by 12% SDS-PAGE and electrotransferred to 0.2 µm nitrocellulose membrane (BIO-RAD) using standard methods. Endogenous EhPC4 and ectopically expressed Myc-tagged EhPC4 proteins were detected using anti-EhPC4 polyclonal antibody (1:2000)¹⁵. Myc-EhPC4 and Myc-EhNUDC were detected using Myc-Tag antibodies (1:2000; Cell Signaling).

DNA binding assays. Electrophoretic mobility shift assays (EMSA) were performed using the *EhADH12* gene promoter fragment (−151 to +24 nt) as probe¹⁷. The probe was biotin-labeled using the Biotin 3' End DNA Labeling Kit (Thermo Scientific Pierce) and incubated with different amounts of recombinant EhPC4 and EhPC4-K127A proteins. For supershift assays, specific anti-EhPC4 antibody (1 µg) was added. DNA-protein complexes were resolved through 6% non-denaturing PAGE, transferred to Hybond™-N+ membrane (GE Healthcare) and revealed using the Chemiluminescent Nucleic Acid detection module™ kit (Thermo Scientific Pierce).

Immunofluorescence and laser confocal microscopy. Immunofluorescence assays were performed as previously described¹⁸. Immunostaining was carried out with anti-EhPC4 (1:200) or Myc-tag (1:200) antibodies followed by incubation with anti-rabbit FITC antibodies (1:200; Jackson ImmunoResearch). DNA was counterstained with 2.5 µg/ml DAPI (Invitrogen) for 1 min. For coimmunolocalization studies staining was carried out with anti-EhPC4 (1:100) and anti-lamin B1 (Abcam ab16048; 1:100) antibodies, followed by incubation with anti-rabbit Alexa 647 (Invitrogen; 1:200) and anti-mouse Alexa 488 (Invitrogen; 1:200), respectively. Light optical sections were obtained through a Nikon inverted microscope attached to a laser confocal scanning system (TCS SP2, Leica Microsystems) and analyzed using the Confocal Assistant software Image J. A three-laser beam (350, 488 and 568 nm) was used for excitation of the fluorophores, using a 25 Plan-NEOFLUAR oil immersion lens (0.8 numerical aperture). Immunofluorescence staining experiments were done by triplicate and multiple serial sections were examined. Secondary antibodies alone were used as negative controls. EhPC4 and lamin B1 colocalization was analyzed from entire confocal microscope images using WCIF ImageJ. Background was corrected using the background subtraction function. Pearson's Correlation coefficient and Mander's Overlap coefficient were calculated with the plugin intensity correlation analysis.

Transfection assays. Trophozoites were transfected with pKT-3M-EhPC4, pKT-3M-EhNUDC or pKT-3M plasmids by electroporation as previously described³⁹. The pKT-3M-EhPC4 constructs contains the 5' and 3' downstream regions of cysteine synthase gene, and the neomycin resistance gene³⁷. Two subsequent pulses were applied using a Gene Pulser apparatus (BIO-RAD), with an exponential discharge of 1200 V/cm and a capacitance of 25 µF. Drug selection of transfectants was performed by gradually increasing the G418 concentration up to 60 µg/ml.

Cell proliferation, cell viability and cell size determinations. 1.5×10^5 trophozoites were inoculated into culture tubes with TYI-S-33 medium and grown at 37 °C during 24, 48, 72 and 96 h. At each time, cell number, cell diameter and viability were measured using the TC20™ Automated Cell Counting System (BIO-RAD) and the TC10 trypan blue dye method as described by the manufacturer. Data were expressed as the mean ± standard deviation (SD) of three independent experiments.

DNA replication assays. DNA replication experiments were performed using the DNA Replication Assay kit (Upstate Biotechnology) according to manufacturer's recommendations. Trophozoites incorporating the fluorescent BrdU in DNA were examined through a Nikon inverted microscope attached to a laser confocal scanning system (TCS SP2, Leica Microsystems) and analyzed with Image J software. Fluorescence intensity of 250 randomly selected cells was measured with the Leica confocal software. Three experiments were performed and data were expressed as the mean fluorescence ± SD.

Determination of nuclei number. Trophozoites were synchronized by serum starvation for 12 h as described³; 1.5×10^5 cells were inoculated into culture tubes with TYI-S-33 complete medium and grown at 37 °C for 24, 48, 72 and 96 h. Then, trophozoites were fixed with 4% paraformaldehyde on sterile coverslips, nuclei were stained with DAPI (Invitrogen) and cells were analyzed through a Nikon inverted microscope attached to a laser confocal scanning system (TCS SP2, Leica Microsystems). The number of nuclei per cell at 0, 24, 48, 72 and 96 h post-synchronization was determined from 250 randomly selected trophozoites.

Determination of nuclear DNA content. DNA content was analyzed by FACS in paraformaldehyde-fixed trophozoites after staining with propidium iodide (PI) using standard procedures. Flow cytometry was performed using the FACScalibur (Becton Dickinson) and data from 10,000 cells were recorded for each experiment and analyzed using CellQuest software (Becton Dickinson).

Real-time microscopy. Trophozoites were synchronized as described³, plated on POC-R2 Chambers (LaCon, Germany) with TYI-S-33 medium supplemented with adult bovine serum (10%) for 24 h at 37 °C and visualized under a Axiovert 200 M fluorescence microscope (Zeiss Germany) (40× objective). The time-lapse images were captured with 2 s intervals, analyzed and further processed using the Axiovision v4.8 software (Zeiss, Germany).

DNA microarrays. Total RNA was obtained from trophozoites by TRIzol (Invitrogen). cDNA synthesis and labeling with Cy3 and Cy5 fluorochromes were performed using the SuperScript™ Indirect cDNA Labeling System (Invitrogen). Then, DNA microarrays (EH-IP2008; Agilent Technologies) covering the complete *E. histolytica* genome were hybridized, washed, dried, and scanned in a GenePix 4000A apparatus as described²¹. Three biological replicates were performed and two technical replicates were hybridized. Images were analyzed using the GenePix5 software (Axon) and statistical analyses were carried out. Only genes with an expression fold change >1.5 ($p \leq 0.05$) were considered in this analysis.

Chromatin immunoprecipitation. Assays were performed as previously described⁴⁰ with some modifications. Briefly, trophozoites (2×10^7) were resuspended in lysis buffer with protease inhibitors and sonicated to obtain 300 bp DNA fragments. Extract was clarified by centrifugation and incubated for 30 min in chromatin solubilization buffer (10 volumes) containing salmon sperm DNA, bovine serum albumin and rec-Protein G-Sepharose 4B (Invitrogen). Supernatant corresponding to soluble chromatin (0.5 ml) was incubated with anti-EhPC4 antibodies (2 μ g) overnight at 4 °C and then with rec-Protein G-Sepharose 4B for 2 h at 4 °C. Subsequently, beads were sequentially washed with buffers III, IV, LiCl, and TE. The immune complexes were retrieved by incubation in elution buffer for 15 min at room temperature. To reverse cross-linking, elutes were incubated with 0.2 M NaCl for 4 h at 65 °C, followed by proteinase K and RNase A treatment. Finally, DNA was extracted and semi-quantitative RT-PCR analysis of *EhCDC48*, *EhSTG1*, *EhSMC*, *EhCWF2*, *EhODC1*, *EhNUDC*, *EhSKIP1* and *EhDUSP1* core promoters was performed using the immunoprecipitated DNA (2 μ l per reaction) and specific oligonucleotides (Supplementary Table S4). All amplification reactions were performed three times by duplicate.

Statistical analysis. Statistical analyses were performed using the GraphPad Prism version 5.0 Software package. Experimental values were reported as the mean \pm standard deviation (SD) and compared with the one-way ANOVA test. Differences were considered significant when $p < 0.05$.

References

1. World Health Organization. Amoebiasis. *Wkly. Epidemiol. Rec.* **72**, 97–99 (1997).
2. Gangopadhyay, S. S., Ray, S. S., Kennady, K., Pande, G. & Lohia, A. Heterogeneity of DNA content and expression of cell cycle genes in axenically growing *Entamoeba histolytica* HM1:IMSS clone A. *Mol. Biochem. Parasitol.* **90**, 9–20 (1997).
3. Das, S. & Lohia, A. Delinking of S phase and cytokinesis in the protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. *Cell. Microbiol.* **4**, 55–60 (2002).
4. Orozco, E., Solis, F. J., Domínguez, J., Chávez, B. & Hernández, F. *Entamoeba histolytica*: Cell Cycle and Nuclear Division. *Experimental Parasitol.* **67**, 85–95 (1998).
5. Dvorak, J. A., Kobayashi, S., Alling, D. W. & Hallahan, C. W. Elucidation of the DNA synthetic cycle of *Entamoeba* ssp. Using flow cytometry and mathematical modeling. *J. Eukaryot. Microbiol.* **42**, 610–616 (1995).
6. Banerjee, S., Das, S. & Lohia, A. Eukaryotic checkpoints are absent in the cell division cycle of *Entamoeba histolytica*. *J. Biosci.* **27**, 567–572 (2002).
7. Lohia, A., Mukherjee, C., Majumder, S. & Dastidar, P. G. Genome re-duplication and irregular segregation occur during the cell cycle of *Entamoeba histolytica*. *Biosci. Rep.* **27**, 373–384 (2007).
8. Mukherjee, C., Clark, C. G. & Lohia, A. *Entamoeba* Shows Reversible Variation in Ploidy under Different Growth Conditions and between Life Cycle Phases. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2**(8), e281, doi: 10.1371/journal.pntd.0000281 (2008).
9. Fukuda, A. *et al.* Transcriptional coactivator PC4 stimulates promoter escape and facilitates transcriptional synergy by GAL4-VP16. *Mol. Cell. Biol.* **24**, 6525–6535 (2004).
10. Brandsen, J. *et al.* C-terminal domain of transcription cofactor PC4 reveals dimeric ssDNA binding site. *Nat. Struct. Biol.* **4**, 900–903 (1997).
11. Calvo, O. & Manley, J. L. Strange bedfellows: polyadenylation factors at the promoter. *Genes Develop.* **17**, 1321–1327 (2003).
12. Das, C. *et al.* Transcriptional Coactivator PC4, a Chromatin-Associated Protein, Induces Chromatin Condensation. *Mol. Cell. Biol.* **26**, 8303–8315 (2006).
13. Das, C., Gadad, S. S. & Kundu, T. K. Human Positive Coactivator 4 Controls Heterochromatinization and Silencing of Neural Gene Expression by Interacting with REST/NRSF and CoREST. *J. Mol. Biol.* **397**, 1–12 (2010).
14. López-Camarillo, C., López-Rosas, I., Ospina-Villa, J. D. & Marchat, L. A. Deciphering molecular mechanisms of mRNA metabolism in the deep-branching eukaryote *Entamoeba histolytica*. *Wiley Interdiscip. Rev. RNA.* **5**, 247–62, doi: 10.1002/wrna.1205 (2014).
15. Hernández de la Cruz, O. N. *et al.* Proteomic profiling reveals that EhPC4 transcription factor induces cell migration through up-regulation of the 16-kDa actin-binding protein EhABP16 in *Entamoeba histolytica*. *J. Proteomics* **111**, 46–58 (2014).
16. Sikorski, T. W. *et al.* Sub1 and RPA associate with RNA Polymerase II at different stages of transcription. *Mol. Cell.* **44**, 397–409 (2011).
17. Azuara-Liceaga, E., Flores-Soto, E., López-Camarillo, C. & Orozco, E. *Entamoeba histolytica*: structural and functional analysis of the Ehadh112 gene promoter. *Exp. Parasitol.* **110**, 280–285 (2005).
18. López-Rosas, I. *et al.* mRNA decay proteins are targeted to poly(A)⁺ RNA and dsRNA-containing cytoplasmic foci that resemble P-bodies in *Entamoeba histolytica*. *PLoS One.* **7**, e45966, doi: 10.1371/journal.pone.0045966 (2012).
19. Vohra, H., Mahajan, R. C. & Ganguly, N. K. Role of serum in regulating the *Entamoeba histolytica* cell cycle: a flow cytometric analysis. *Parasitol. Res.* **84**, 835–838 (1998).
20. Yoshida, K. *et al.* TPA-induced multinucleation of a mesenchymal stem cell-like clone is mediated primarily by karyokinesis without cytokinesis, although cell-cell fusion also occurs. *Eur. J. Cell. Biol.* **86**, 461–471 (2007).
21. Santi-Rocca, J. *et al.* The lysine- and glutamic acid-rich protein KERP1 plays a role in *Entamoeba histolytica* liver abscess pathogenesis. *Cell. Microbiol.* **10**, 202–217 (2008).
22. Potapova, T. A., Zhu, J. & Li, R. Aneuploidy and chromosomal instability: a vicious cycle driving cellular evolution and cancer genome chaos. *Cancer Metastasis Rev.* **32**, 377–389 (2013).
23. Guillén, N., Boquet, P. & Sansonetti, P. The small GTP-binding protein RacG regulates uroid formation in the protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. *J. Cell. Sci.* **111**, 1729–1739 (1998).
24. Arias-Romero, L. E. *et al.* EhPAK2, a novel p21-activated kinase, is required for collagen invasion and capping in *Entamoeba histolytica*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **149**, 17–26 (2006).
25. Fisher, O., Siman-Tov, R. & Ankri, S. Pleiotropic phenotype in *Entamoeba histolytica* overexpressing DNA methyltransferase (Ehmet). *Mol. Biochem. Parasitol.* **147**, 48–54 (2006).

26. Majumder, S. & Lohia, A. *Entamoeba histolytica* encodes unique formins, a subset of which regulates DNA content and cell division. *Infect. Immun.* **76**, 2368–78 (2008).
27. Banerjee, S., Prashanth, B. R. & Kundu, T. General Transcriptional Coactivator PC4 Activates p53 Function. *Mol. Cell. Biol.* **24**, 2052–2062 (2004).
28. Werten, S. *et al.* Interaction of PC4 with melted DNA inhibits transcription. *EMBO J.* **17**, 5103–5111 (1998).
29. Mortusewicz, O. Recruitment of RNA polymerase II cofactor PC4 to DNA damage sites. *J. Cell. Biol.* **183**, 769–776 (2008).
30. García, A., Collin, A. & Calvo, O. Sub1 associates with Spt5 and influences RNA polymerase II transcription elongation rate. *Mol. Biol. Cell.* **23**, 4297–312 (2012).
31. Okagaki, L. H. *et al.* Cryptococcal Cell Morphology Affects Host Cell Interactions and Pathogenicity *PLoS Pathog.* **6**, e1000953, doi: 10.1371/journal.ppat.1000953 (2010).
32. Márquez-Monter, H., Becker, I. & Carrillo-Farga, J. Mitosis and polykaryon formation of *Entamoeba histolytica* in axenic cultures. *Arch. Invest. Med.* **21**, 69–73 (1990).
33. Aumais, J. P. *et al.* Role for NudC, a dynein-associated nuclear movement protein, in mitosis and cytokinesis. *J. Cell. Sci.* **15**, 1991–2003 (2003).
34. Helmstaedt, K. *et al.* The Nuclear Migration Protein NUDE/LIS1 Forms a Complex with NUDC and BNFA at Spindle Pole Bodies. *Eukaryotic Cell.* **7**, 1041–1052 (2008).
35. Gocke, C. D., Osmani, S. A. & Miller, B. A. The human homologue of the *Aspergillus* nuclear migration gene nudC is preferentially expressed in dividing cells and ciliated epithelia. *Histochem. Cell. Biol.* **114**, 293–301 (2000).
36. Zhou, T., Aumais, J. P., Liu, X., Yu-Lee, L. Y. & Erikson, R. L. A role for Plk1 phosphorylation of NudC in cytokinesis. *Dev. Cell.* **5**, 127–138 (2003).
37. Saito-Nakano, Y., Yasuda, T., Nakada-Tsukui, K., Leippe, M. & Nozaki, T. Rab5-associated Vacuoles Play a Unique Role in Phagocytosis of the Enteric Protozoan Parasite *Entamoeba histolytica*. *J. Biol. Chem.* **279**, 49497–49507 (2004).
38. Marchat, L. A., Pezet-Valdez, M., López-Camarillo, C. & Orozco, E. *Entamoeba histolytica*: expression and DNA binding of CCAAT/enhancer-binding proteins are regulated through the cell cycle. *Exp. Parasitol.* **103**, 82–87 (2003).
39. Nickel, R. & Tannich, E. Transfection and transient expression of chloramphenicol acetyltransferase gene in the protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 7095–7098 (1994).
40. Anbar, M. *et al.* Involvement of a Short Interspersed Element in Epigenetic Transcriptional Silencing of the Amoebapore Gene in *Entamoeba histolytica*. *Eukaryotic Cell* **4**, 1775–1784 (2005).

Acknowledgements

We thank Universidad Autonoma de la Ciudad de Mexico (UACM) for support. This work was also supported by CONACYT (59481 grant) and Mexico-France program (SEP-CONACYT-ANUIES; ECOS NORD grant M08-S02). Olga Hernández de la Cruz was a scholarship recipient from ECOS-NORD Mexico-France grant M08-S02 (2008–2012). We thank Tomoyoshi Nozaki for provide us the pKT-3M plasmid, to the Genopole platform from Pasteur Institute Paris for DNA microarray analysis, and to Dr. Rosaura Hernández for provide us the anti-Lamin B1 antibodies.

Author Contributions

O.H.C., L.A.M., N.G., C.W. and C.L.C. conceived the study. I.L., J.D.C., L.H., A.R.D., E.O. and C.L.C. designed the experiments. O.H.C., L.A.M. and C.L.C. analysed the data. E.O., L.A.M., N.G. and C.W. contributed with reagents, materials and analysis tools. L.A.M. and C.L.C. wrote the manuscript.

Additional Information

Supplementary information accompanies this paper at <http://www.nature.com/srep>

Competing financial interests: The authors declare no competing financial interests.

How to cite this article: Cruz, O. H. *et al.* Multinucleation and Polykaryon Formation is Promoted by the EhPC4 Transcription Factor in *Entamoeba histolytica*. *Sci. Rep.* **6**, 19611; doi: 10.1038/srep19611 (2016).



This work is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in the credit line; if the material is not included under the Creative Commons license, users will need to obtain permission from the license holder to reproduce the material. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>

El jurado designado por la Universidad Autónoma de la Ciudad de México aprobó esta tesis el día 16 de febrero del 2016, en la Ciudad de México D.F. para optar al Grado de Doctora en Ciencias Genómicas, a la M. en C. Olga Nohemí Hernández de la Cruz.

Dr. Mario César López Camarillo

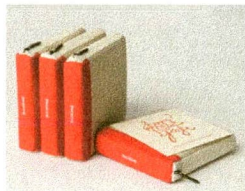
Dra. Laurence Annie Marchat Marchau

Dr. Arturo Rojo Domínguez

Dra. Elisa Irene Azuara Liceaga

Dr. José de Jesús Olivares Trejo

Pedro Ahumada



TESIS URGENTES

REP. DE CUBA No. 99 DESP. 23-A
CENTRO HISTORICO MEXICO, D.F.

Tel. 55-12-84-69

Part. 26-19-07-42

PRESUPUESTOS DE 9:30 A 7:00 P.M.
SÁBADOS DE 9:30 A.M. A 3:00 P.M.

impresosahumada@hotmail.com