



Tesis de Doctorado en Ciencias Químicas

MODIFICACIONES DE LA CROMATINA Y SU RELACIÓN CON EL CICLO DE VIDA DEL PROTOZOARIO *GIARDIA LAMBLIA*

Tesista: Biól. Agostina Salusso

Directora: Dra. Andrea S. Rópolo

*Laboratorio de Microbiología e Inmunología
Instituto de Investigación Médica Mercedes y Martín Ferreyra
INIMEC-CONICET-UNC*

Córdoba, Argentina – 2020



I N I M E C

Dirección de Tesis:

Dra. Andrea Silvana Rópolo

Comisión Asesora:

Dr. José Ricardo Echenique

Dra. Mariela R. Monti

Dr. Juan Pablo Nicola

Evaluador Externo: Dr. Pedro Gabriel Carranza

Comisión evaluadora de tesis

- Dr. José Ricardo Echenique. Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba. CIBICI-CONICET.
- Dra. Mariela R. Monti. Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba. CIQUIBIC-CONICET.
- Dr. Juan Pablo Nicola. Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba. CIBICI-CONICET.
- Dr. Pedro Gabriel Carranza. Instituto Multidisciplinario de Salud, Tecnología y Desarrollo. IMSATED, CONICET-UNSE.

Defensa Oral y Pública: Córdoba, 29 de abril de 2020

.....
Dr. José R. Echenique

.....
Dr. Juan Pablo Nicola

.....
Dra. Mariela R. Monti

.....
Dr. Pedro Gabriel Carranza

“No debemos olvidar que cuando se descubrió el radio nadie sabía que sería útil en los hospitales. Era un trabajo de ciencia pura. Y esta es una prueba de que el trabajo científico no debe considerarse desde el punto de vista de su utilidad directa. Se debe realizar por sí mismo, por la belleza de la ciencia y entonces, siempre existirá la posibilidad de que un descubrimiento científico se convierta, como el radio, en un beneficio para la humanidad.”

Marie Curie

Esta tesis ha sido posible gracias al financiamiento recibido a través de becas y subsidios otorgados por las siguientes instituciones:



Agradecimientos

Pasaron 5 años de iniciado este proyecto y finalmente he logrado concluirlo con éxito. Si me preguntan con qué elijo quedarme, además de la experiencia científica, me quedo con todas aquellas personas que me acompañaron e hicieron posible este logro. A cada una de ellas les estaré eternamente agradecida.

A mis **Jefas**, por confiar en mí, abrir sus puertas y brindarme la oportunidad de hacer mi doctorado en su grupo de trabajo. Por su dedicación y motivación. Por promover la perseverancia. Por fomentar el trabajo en equipo y el buen compañerismo. Por ser tan humanas, honestas y comprensivas. Por festejar cada logro, por los almuerzos en *Johnny*. Por generar ese hermoso espacio a donde siempre querré volver. Las elegiría una y mil veces más. Un placer haber formado parte del *team* LabMI!

A mi directora de tesis, **Andre**, por dirigirme con excelente predisposición e introducirme en el mundo de la epigenética. Por el hermoso proyecto que juntas llevamos adelante. Por permitirme crecer y madurar en esta etapa científica. Por respetar mis tiempos y dejarme ser libre. Por su calidez humana y por tener siempre el mejor de los consejos. Por cada vez que te sentaste conmigo e hiciste uno de esos (tan preciados) borradores organizativos. Gracias por darme esa confianza y seguridad “extra” que casi siempre necesité. Gracias Jefa por tanto aguante!

A **Caro Touz**, por acompañarme y supervisarme en este trayecto. Por cada momento que dedicaste para aclarar cualquier tipo de duda que me surgiera. Por los intercambios de ideas y por todo lo que me enseñaste. Por ser una fuente de inspiración. Por estar siempre dispuesta a ayudar. Gracias por escucharme y contenerme las veces que fue necesario.

A mis compañeros y mentores del LabMI: **Gonza, Lore, Natacha y Nahuel**. Por todo lo aprendido con ustedes y por el trabajo en equipo. Por los incalculables mates, los *afters* y las risas compartidas. A **Sofi**, por su compañerismo y por darme una mano cada vez que lo necesité. Por motivarnos con cada experimento fallido. Por las charlas, los congresos compartidos y todas las idas a posgrado.

A las dos últimas incorporaciones del LabMI, **Juli y Luciano**, por aguantar la intensidad y locura de mi último año de doctorado y sobre todo por sus ganas y buena predisposición para aprender en el poco tiempo que les pude brindar. Gracias por hacer tan divertida esta última etapa!

A las incondicionales, **Coty, Maqui y Anahí**, por hacer de psicólogas, hermanas y amigas. Por ser ese intervalo cotidiano de distracción. Por hacer tan especial la hora del almuerzo y por los tan esperados “*trend topic*” de cada día. Por los consejos académicos y científicos. Por comprendernos y hacernos el aguante. Por las catarsis y crisis colectivas. Por ser capaces de levantarme el ánimo siempre. Gracias por esta hermosa amistad que construimos!

Al **IMMF** y a todas las excelentes personas y profesionales que lo integran: investigadores, becarios, técnicos y administrativos. Por brindar un cómodo y agradable ambiente de trabajo. Por siempre darnos una mano para salir adelante. A mi primer mentor, **Daniel Raimunda**, por iniciar mi formación científica y motivarme a continuar en la investigación. A **Majo Virgolini y Myriam Siravegna**, por haber sido tan amables y buenas compañeras cuando ingresé por primera vez al Instituto. A **Flor Dadam y Cin Porcari**, mis amigas e instructoras personales de *Real Time PCR*, no lo hubiera logrado sin su ayuda! Gracias por cada momento compartido, por las risas con llantos y los llantos de desahogo. A **Cami Sosa**, por nuestras charlas epigenéticas y su increíble capacidad de saber escuchar y estar. A **Mauricio Martín** por sus codiciados anticuerpos!

A **Gonza Quassollo**, por su asistencia técnica en el microscopio.

A **Pawel Ciboroski**, por su generosa colaboración con los ensayos de espectrometría de masa y por su visita a la Argentina.

A la Comisión Asesora, **Dr. Echenique, Dr. Nicola y Dra. Monti**, por haberme acompañado estos cinco años y por sus excelentes aportes que contribuyeron a mejorar la calidad de este trabajo; y al **Dr. Pedro Carranza** por aceptar evaluar mi trabajo de tesis.

A la **Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba**, especialmente a **Betina** de la Escuela de Posgrado, por su eficiencia, su tiempo, la predisposición y la paciencia.

A mis viejos, **Alicia y Jorge**, mi ejemplo de hogar y los pilares de mi vida. Por haberme brindado la mejor educación. Por apoyarme y confiar en cada una de mis decisiones. Por enseñarme que todo llega, con paciencia, constancia y esfuerzo. Agradezco a la vida todos los días por tenerlos. Gracias por interesarse y esforzarse para entender mis proyectos científicos.

A **Fede y Caro**, por la buena onda de siempre, por estar a mi lado apoyándome y alegrarse con mis logros.

A mi abuela **Piti**, por creerme una gran científica y enorgullecerse tanto de mí.

A mis **familiares y amigos** por el eterno aguante y las constantes palabras de aliento que acompañaron a que este sueño se haga realidad.

Publicaciones

Durante este trabajo de *Tesis Doctoral* se obtuvieron diversos resultados que dieron origen a:

Publicaciones

- **Salusso A**, Zlocowski N, Mayol G, Zamponi N, Ropolo AS. "*Histone methyltransferase 1 regulates the encystation process in the parasite Giardia lamblia*". The FEBS Journal. doi: 10.1111/febs.14131 (2017).
- Mayol GF, Revuelta MV, **Salusso A**, Touz MC, Rópolo AS. "*Evolutionary evidences of nuclear transport mechanisms in the protozoan parasite Giardia lamblia*" BBA Mol Cell Res. doi: 10.1016/j.bbamcr.2019.118566 (2019).
- **Salusso A**, Jaquet S, Diaz Perez L, Ciborowski P, Rópolo AS. "*Histone post-translational modifications in the protozoan parasite Giardia lamblia*". En preparación.
- **Salusso A**, Diaz Perez L, Mayol GF, Touz MC, Rópolo AS. "*Role of Histone methyltransferase 2 and SET-2 during growth and encystation in Giardia lamblia*". En preparación.

Presentaciones a Congresos Internacionales

- 2017. **Salusso A**, Zlocowski N, Mayol G, Zamponi N, Touz MC, Rópolo A. "*Histone methyl-transferase 1 is a key regulator of the encystation process in the parasite Giardia lamblia*". 6th. International *Giardia* and *Cryptosporidium* Conference, Havana, Cuba. Abril 26-28, 2017.

Presentaciones a Congresos Nacionales

- 2015. Mayol G, Zamponi N, **Salusso A**, Rópolo A. "*Involvement of importins in the translocation of arginine deiminase to the nuclei in Giardia lamblia*". LI Reunión Anual Sociedad Argentina de Bioquímica y Biología Molecular. Mar del Plata, Buenos Aires, Argentina, Noviembre 3-6, 2015.
- 2016. Zlocowski N, **Salusso A**, Mayol G, Zamponi N, Rópolo A. "*Involvement of histone methyltransferase-1 in Giardia lamblia differentiation*". LII Reunión Anual Sociedad Argentina de Bioquímica y Biología Molecular. Córdoba, Argentina, Noviembre 7-10, 2016.
- 2017. **Salusso A**, Zlocowski N, Mayol G, Zamponi N, Ropolo AS. "*Histona metiltransferasa 1 regula el proceso de enquistamiento en Giardia lamblia*". XXI Jornadas Sociedad de Biología de Córdoba. La Falda, Córdoba, Argentina. Agosto 2017

- 2019. **Salusso A**, Jaquet S, Diaz Perez L, Ciborowski P, Rópolo AS. "*Modificaciones post-traduccionales de histonas en el parásito protozoario Giardia lamblia*". XXII Jornadas Sociedad de Biología de Córdoba. Córdoba, Argentina. Agosto 2019
- 2019. **Salusso A**, Jaquet S, Diaz Perez L, Ciborowski P, Rópolo AS. "*Histone post-translational modifications in the protozoan parasite Giardia lamblia*". LV Reunión Anual Sociedad Argentina de Bioquímica y Biología Molecular. Salta, Argentina, Noviembre 5-8, 2019.

LISTA DE ABREVIATURAS

Å	Ángstrom
β(1,3)-D-GalNAc	Homopolímero de N-acetil-galactosamina
Ac	Anticuerpo
Acm	Anticuerpo monoclonal
ADI	Arginina deiminasa
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADP	Adenosín difosfato
ADNc	Ácido desoxirribonucleico copia del ARN
Ala	Alanina
aLRT	Pruebas de relación de verosimilitud aproximada (del inglés, <i>approximate Likelihood-Ratio Test</i>)
ARN	Ácido ribonucleico
ARNr	Ácido ribonucleico ribosómico
ARNi	Ácido ribonucleico de interferencia
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
ATP	Adenosina trifosfato
BiP	Proteína BiP (del inglés, <i>Immunoglobulin heavy chain-Binding Protein</i>)
BSA	Suero adulto bovino (del inglés, <i>Bovine Serum Albumin</i>)
C-terminal	Extremo carboxilo-terminal
Cit	Citrulina
CT	Número de ciclo de <i>PCR</i> en tiempo real en el cual la cantidad de producto amplificado cruza el umbral establecido (del inglés, <i>Cycle Threshold</i>)
CWP	Proteína de la pared del quiste (del inglés, <i>Cyst Wall Protein</i>)
DAPI	Marcador fluorescente de núcleo (del inglés, <i>4',6-diamidino-2-phenylindole</i>)
DIC	Microscopia de contraste de interferencia diferencial (del inglés, <i>Differential Interference Contrast microscopy</i>).
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNMT	Enzima ADN metiltransferasa
DTT	Ditiotreitol
EGFCP	Proteína del quiste EGFCP (del inglés, <i>Epidermal Growth Factor (EGF)- like Cyst Protein</i>)
ESVs	Vesículas específicas de enquistamiento (del inglés, <i>Encystation Specific Vesicles</i>)
FITC	Isotiocianato de fluoresceína (del inglés, <i>Fluorescein Isothiocyanate</i>)
G6PI	Enzima glucosamina-6-fosfato isomerasa (del inglés, <i>Glucosamine 6 Phosphate Isomerase</i>)
GDB	Base de datos del genoma de <i>Giardia</i> (del inglés, <i>Giardia Database</i>)
HA	Epitope de hemaglutinina
HAT	Histona acetiltransferasa

HCNCp	Proteína del quiste no variante rica en cisteína (del inglés, <i>High Cysteine Non-variant Cyst protein</i>)
HDAC	Histona deacetilasa
HKMT	Histona lisina metiltransferasa
HMM	Modelo oculto de Márkov (del inglés, <i>Hidden Markov Model</i>)
HMT	Histona metiltransferasa
HP1	Proteína de unión a hetecromatina 1 (del inglés, <i>Heterochromatin Protein 1</i>)
h.p.i.	Horas post-inducción
HRMT	Histona-arginina metiltransferasa
IFA	Inmunofluorescencia
K	Aminoácido lisina
kDa	Kilodalton
LB	Medio de cultivo para bacterias Luria-Bertoni
MCS	Sitio de múltiple clonado (del inglés, <i>Multiple Clonaje Sequence</i>)
me1	Mono-metilación
me2	Di-metilación
me3	Tri-metilación
ML	Máxima Verosimilitud (del inglés, <i>Maximun Likelihood</i>)
MSA	Alineamiento múltiple de secuencias (del inglés, <i>Multiple Sequence Alignment</i>)
Myb-1	Factor de transcripción (del inglés, <i>Myeloblastosis-related transcription factors</i>)
N-terminal	Extremo amino terminal
NaB	Butirato de sodio
NAD	Nicotinamida adenina dinucleótido
NLS	Señal de localización nuclear (del inglés, <i>Nuclear Localization Signal</i>)
O-GlcNAc	O-GlucosilNAcetilación
ON	Incubación de 16 (del inglés, <i>over night 16 h</i>)
ORF	Marco abierto de lectura (del inglés, <i>Open Reading Frame</i>)
PAD	Peptidil-Arginina Deiminasa
pb	Pares de bases
PBS	Solución amortiguadora de fosfato salino (del inglés, <i>Phosphate Buffered Saline</i>)
PBSm	PBS + medio de crecimiento al 1%
PDB	Banco de datos de proteínas (del inglés, <i>Protein Data Bank</i>)
PE	Pre-enquistamiento
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa (del inglés, <i>Polimerase Chain Reaction</i>)
PKMT	Proteína lisina metiltransferasa (del inglés, <i>Protein lysine methyltransferases</i>)
PTGS	Silenciamiento génico post-transcripcional (del inglés, <i>Post-Transcriptional Gene Silencing</i>)
R	Aminoácido arginina

RP-HPLC	Cromatografía líquida de alta eficacia en fase reversa (del inglés, <i>Reversed-Phase High Performance Liquid Chromatography</i>)
RT-PCR	Retro-transcripción del ARN por reacción en cadena de la polimerasa (del inglés, <i>RetroTranscription-PCR</i>)
S	Aminoácido serina
SAM	Solución amortiguadora de muestra
SDS	Dodecilsulfato sódico
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida conteniendo dodecil sulfato sódico (del inglés, <i>Sodium Dodecyl Sulfate- Poly Acrylamide Gel Electrophoresis</i>)
SET	Dominio SET (del inglés, <i>SU (var)3-9, Enhancer-of-Zeste, y Trithorax</i>)
siARN	Ácido ribonucleico pequeño de interferencia (del inglés, <i>small interfering RNA</i>)
SNF2	Enzima helicasa (del inglés, <i>Sucrose Non Fermentable</i>)
SWI/SNF	Complejo remodelador del nucleosoma (del inglés, <i>SWItch/Sucrose Non Fermentable</i>)
T	Aminoácido treonina
TBS	Solución amortiguadora de Tris-salino (del inglés, <i>Tris Buffered Saline</i>)
Tet	Tetraciclina
TGS	Silenciamiento génico transcripcional (del inglés, <i>Transcriptional Gene Silencing</i>)
TSA	Tricostatina A
TYI-S-33	Medio completo de crecimiento
Val	Valina
VPS	Proteína vacuolar de superficie (del inglés, <i>Vacuolar Protein Sorting</i>)
VSP	Proteína variable de superficie (del inglés, <i>Variant Specific-Protein</i>)
wt	Cepa salvaje (del inglés, <i>Wild type</i>)

ÍNDICE

Comisión evaluadora	i
Agradecimientos	iii
Publicaciones	vi
Lista de abreviaturas	viii
Índice	xi
Resumen	1
Summary	2
Capítulo I: INTRODUCCIÓN GENERAL	4
I. i. <i>Giardia lamblia</i>	4
I. i. 1 Descubrimiento y epidemiología	4
I. i. 2 Ubicación taxonómica	5
I. i. 3 Nomenclatura	5
I. i. 4 Biología Celular: Características Morfológicas Generales de <i>G. lamblia</i>	7
I. i. 4.1 Trofozoíto	7
I. i. 4.2 El Quiste	11
I. i. 4.3 Ciclo de Vida de <i>G. lamblia</i>	13
I. ii. Regulación epigenética en eucariotas	17
I. ii. 1 Estructura de la cromatina	19
I. ii. 1.2 El nucleosoma: la unidad básica de la estructura de la cromatina	21
I. ii. 2 Mecanismos epigenéticos	22
I. ii. 2.1 Metilación de ADN	23
I. ii. 2.2 ARN no codificante	23
I. ii. 2.3 Modificaciones post-traduccionales de histonas	24
I. ii. 2.3.1 La “hipótesis” del código de histonas	25
I.iii. Regulación epigenética en <i>G. lamblia</i>	26
I. iii. 1 Variación antigénica y mecanismos epigenéticos asociados	27
I. iii. 2 Mecanismos epigenéticos asociados al enquistamiento	29
OBJETIVOS	33
Capítulo II: HISTONAS METILTRANSFERASAS EN <i>G. LAMBLIA</i>	35
II. i. Introducción	35
II. ii. Resultados	37
I. ii. 1. Histona metiltransferasa 1, Histona metiltransferasa 2 y SET2 son proteínas codificadas en el genoma de <i>G. lamblia</i>	37
II. ii.1.1 <i>G. lamblia</i> HMT1	40
II. ii. 1.1.1 Sobre-expresión de la proteína HMT1 en <i>G. lamblia</i>	44
II. ii. 1.1.1.1 GIHMT1 es una proteína nuclear y citoplasmática durante el crecimiento de <i>G. lamblia</i>	44
II. ii. 1.1.1.2 La sobre-expresión de GIHMT1 no afecta el crecimiento celular	45
II. ii. 1.1.1.3 Participación de GIHMT1 durante el enquistamiento de <i>G. lamblia</i>	46

II. ii. 1.1.1.3.1 La expresión de <i>hmt1</i> aumenta al inicio del enquistamiento	47
II. ii. 1.1.1.3.2 GIHMT1 interviene en el proceso de enquistamiento	48
II. ii. 1.1.1.3.3 GIHMT1 es un potenciador del proceso de enquistamiento	49
II. ii. 1.1.2 El silenciamiento de GIHMT1 produce una regulación negativa del proceso de enquistamiento	52
II. ii. 1.2 <i>G. lamblia</i> HMT2	55
II. ii. 1.2.1 Sobre-expresión de la proteína HMT2 en <i>G. lamblia</i>	55
II. ii. 1.2.1.1 GIHMT2 es una proteína perinuclear y citoplasmática durante el crecimiento de <i>G. lamblia</i>	55
II. ii. 1.2.1.2 Participación de GIHMT2 durante el enquistamiento de <i>G. lamblia</i>	56
II. ii. 1.2.2 Silenciamiento de GIHMT2	59
II. ii. 1.3 <i>G. lamblia</i> SET2	60
II. ii. 1.3.1 Sobre-expresión de la proteína SET2 en <i>G. lamblia</i>	60
II. ii. 1.3.1.1 GISET2 es una proteína nuclear durante el crecimiento de <i>G. lamblia</i>	60
II. ii. 1.3.1.2 Participación de GISET2 durante el enquistamiento de <i>G. lamblia</i>	61
II. ii. 1.3.2 Silenciamiento de GISET2	63
II. iii. Discusión	65
Capítulo III: MODIFICACIONES POST-TRADUCCIONALES DE HISTONAS EN <i>G. LAMBLIA</i>	72
III. i. Introducción	72
III. ii. Resultados	74
III. ii. 1 Purificación de histonas	74
III. ii. 2 Modificaciones post-traduccionales de histonas en <i>G. lamblia</i>	75
III. ii. 2.1 Histona H2A	76
III. ii. 2.2 Histona H2B	77
III. ii. 2.3 Histona H3	79
III. ii. 2.4 Histona H4	82
III. iii. Discusión	84
Capítulo IV: CONCLUSIONES GENERALES	96
Capítulo V: MATERIALES Y MÉTODOS	99
V. 1 Organismos y Cultivo <i>in vitro</i>	99
V. 1.1 Curva de Crecimiento Celular	99
V. 1.2 Enquistamiento	100
V. 1.3 Evaluación de Estadios y recuento de ESVs	100
V. 2 Análisis Bioinformáticos (<i>in silico</i>)	100
V. 2.1 Minería de Datos	100
V. 2.2 Reconstrucción Filogenética	101
V. 2.3 Análisis Estructural	101
V. 3 Purificación y Análisis de Ácidos Nucleicos	102
V. 4 Retrotranscripción por Reacción en Cadena de la Polimerasa (<i>RT-PCR</i>)	103
V. 5 PCR en Tiempo Real	103

V. 6 Amplificación y Clonado de Proteínas	104
V. 6.1 Amplificación de genes para la sobre-expresión de proteínas	104
V. 6.2 Vectores de expresión en <i>Giardia lamblia</i>	105
V. 6.3 Corte del vector e inserto utilizando enzimas de restricción	107
V. 6.4 Ligación del producto de corte	107
V. 6.5 Preparación de bacterias competentes	108
V. 6.6 Transformación de <i>E. coli</i>	108
V. 6.7 Chequeo de colonias por PCR	108
V. 6.8 Purificación del plásmido	109
V. 6.9 Transfección de trofozoítos de <i>G. lamblia</i> cepa WB/1267	109
V. 7 Regulación Negativa de Proteínas (generación del anti-sentido)	109
V. 8 Ensayos de Inmunofluorescencia (IFA)	110
V. 9 Análisis de Colocalización Cuantitativa	112
V. 10 Preparación de extractos proteicos	112
V. 11 Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida	112
V. 12 Ensayos de Western Blot	113
V. 13 Extracción, Purificación de Histonas e Identificación por Espectrometría de Masas	113
V. 13. 1 Propionilación	114
ANEXOS	116
BIBLIOGRAFÍA	126

RESUMEN

En este *Trabajo de Tesis* se describieron tres enzimas presentes en la base genómica de datos de *G. lamblia* como posibles histonas metiltransferasas, HMT1, HMT2 y SET2 encargadas de metilar residuos de lisina en histonas. Se estudió su rol durante el crecimiento y el enquistamiento de *G. lamblia*. Se observó que estas enzimas presentaban una localización nuclear, perinuclear y citoplasmática y que regulaban tanto positiva como negativamente el proceso de enquistamiento. A su vez, se identificaron y estudiaron las diferentes modificaciones post-traduccionales presentes en las histonas de los trofozoítos de *G. lamblia*. En primera instancia, se aislaron e identificaron diferentes péptidos de H2A, H2B, H3 y H4 comprendidos en la base de datos de histonas de *G. lamblia*. Se encontraron modificaciones conservadas en otros organismos, tales como metilación, acetilación y ubiquitinación de lisinas, metilación de argininas, y también fosforilación de treoninas, tirosinas y lisinas. Con respecto a la metilación de argininas, en el genoma de *G. lamblia* no hay enzimas descritas como HRMT (histona-arginina metiltransferasa), por lo que la presencia de argininas metiladas indica que posiblemente algunas de las HMTs (histona metiltransferasas) las que normalmente modifican lisinas, puedan estar modificando a su vez argininas.

Este trabajo proporciona la primera caracterización a gran escala del código de las histonas de *G. lamblia*, lo cual constituye una plataforma para el desarrollo de futuras investigaciones en el campo de la epigenética en este parásito.

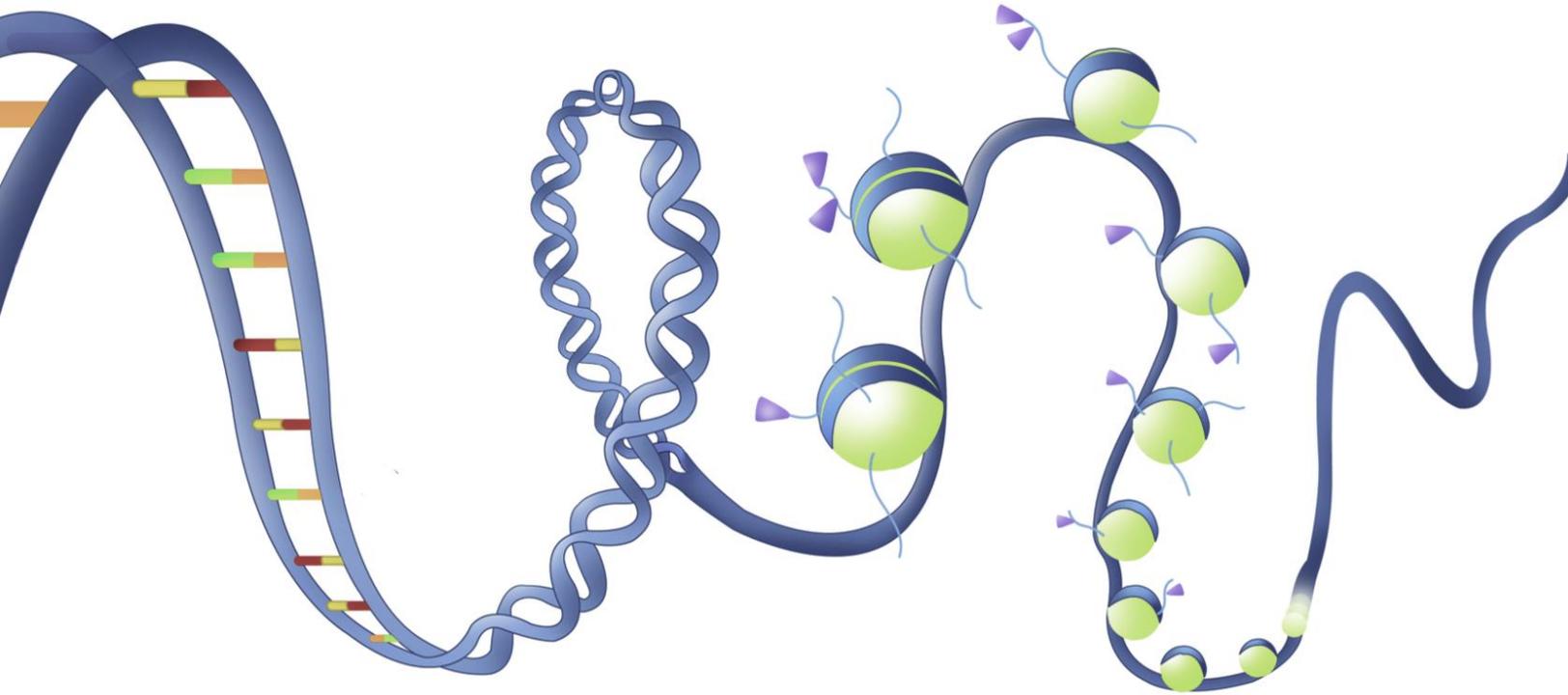
SUMMARY

In this work, three enzymes present in the *G. lamblia* genomic database were described as possible histone methyltransferases, HMT1, HMT2 and SET2 responsible for methylating lysine residues in histones. Its role was studied during the growth and encystation of *G. lamblia*. It was observed that these enzymes had a nuclear, perinuclear and cytoplasmic localization and that they regulated both positive and negative processes of the encystation process. At the same time, the different post-translational modifications present in the histones of *G. lamblia* trophozoites were identified and studied. In first instance, different peptides of H2A, H2B, H3 and H4 included in the *G. lamblia* histone data base were isolated and identified. Conserved modifications that had been previously described in other organisms were found in *G. lamblia*, such as methylation, acetylation and ubiquitination of lysines, arginine methylation, and also phosphorylation of threonines, tyrosines and lysines. Respect to to arginine methylation, in *G. lamblia* genome there are no enzymes described as HRMT (histone-arginine methyltransferase), so the presence of methylated arginines indicates that possibly some of the HMTs (histone methyltransferases) which normally modify lysines, may be modifying arginines.

This work provides the first large-scale characterization of the *G. lamblia* histone code, which constitutes a platform for the development of future research in the field of epigenetics in this parasite.

Capítulo I

INTRODUCCIÓN GENERAL



Capítulo I: INTRODUCCIÓN GENERAL

I. i. *Giardia lamblia*

I. i. 1 Descubrimiento y epidemiología

G. lamblia (sin. *Giardia duodenalis*, *Giardia intestinalis*) fue uno de los primeros organismos *Excavata* descritos en 1681 por Anton van Leeuwenhoek, quien al analizar restos de sus propias heces al microscopio óptico, encontró algo que llamó “un pequeño animal” móvil (Clifford, 1920; Ford, 2007).

La infección por este microorganismo parásito se denomina giardiasis y, excluyendo aquellas producidas por virus o bacterias, es la principal causa de diarrea a nivel mundial, por lo que en 2004 fue incorporada a la iniciativa de enfermedades desatendidas llevada a cabo por la Organización Mundial de la Salud (Savioli et al., 2006). Entre los síntomas y signos causados por la infección aguda se encuentran: deshidratación, pérdida de peso y dolor abdominal (Adam, 2001); mientras que en una infección crónica se puede desencadenar: anorexia y síndrome de colon irritable, fatiga crónica y malabsorción. Esta última puede provocar deficiencia nutricional afectando el desarrollo físico e intelectual del hospedador (Fraser et al., 2000). En los últimos 10 años, ha sido el segundo microorganismo parásito encontrado en brotes transmitidos por aguas contaminadas tanto a nivel mundial (Efstratiou et al., 2017) como nacional (Basualdo et al., 2007; Juárez, 2013).

Si bien *G. lamblia* es de distribución cosmopolita con una prevalencia de aproximadamente un 10% a nivel mundial, en países en desarrollo este valor asciende hasta un 30% en niños menores de 10 años (Farthing et al., 1986; Fraser et al., 1997; Huang and White, 2006). Algunas especies de *Giardia* infectan solamente ciertos vertebrados, mientras que otras pueden infectar una amplia variedad de mamíferos confiriéndole un alto potencial zoonótico (Heyworth, 2016). Esta característica favorece enormemente su prevalencia, ya que tener una ruta de transmisión bidireccional animal-humano facilita la recurrencia de la infección (Korman et al., 1992).

I. i. 2 Ubicación taxonómica

Estudios de comparación de secuencias de ARN nucleolares pequeños de Arqueas y eucariotas unicelulares, ubican taxonómicamente a *Giardia* dentro de la rama *Excavata*, cerca del punto de divergencia entre bacterias y eucariotas. Los excavados son organismos que se caracterizan por poseer un surco ventral (excavado) de alimentación y una estructura flagelar asociada a el/los núcleos (cariomastigonte). *Giardia* se ubica dentro del filo *Metamonada* (Cavalier-Smith, 1981), clase *Fornicata* y pertenece al grupo de los diplomonadidos (orden *Diplomonadida*) (Cavalier-Smith and Chao, 1996). Este último grupo comprende organismos de ambientes anaeróbicos o microaerofílicos, los cuales han sido descritos como verdaderos “fósiles vivientes” por la presencia de un código genético diferencial, la falta de una mitocondria aeróbica y aparato de Golgi típico y la conservación de ciertas características propias de bacterias y arqueobacterias, como por ejemplo la presencia de enzimas metabólicas bacterianas.

I. i. 3 Nomenclatura

Una apropiada clasificación para las especies de *Giardia* resulta crítica para la comprensión de la patogénesis y epidemiología de la infección. Por ensayos de microscopia óptica y electrónica, se identificaron seis especies con características celulares y morfologías diferentes (Adam, 2001). Cinco de ellas representan aislados específicos de anfibios (*G. agilis*), aves (*G. ardeae*, *G. psittaci*), ratas y ratones (*G. muris*) y ratón de campo (*G. microti*) (Adam, 2001; Lalle et al., 2005; McRoberts et al., 1996). La sexta especie, en tanto, afecta un amplio rango de mamíferos hospedadores, incluyendo al hombre, y fue denominada *G. duodenalis* por Filice en 1952 (Wielinga and Thompson, 2007). En el presente *Trabajo de Tesis* se empleará la nomenclatura *G. lamblia*, que es la más utilizada en los trabajos científicos.

Por otra parte, han sido detectadas diferencias sustanciales en la secuencia de genes que codifican para las diversas enzimas y proteínas dentro de la misma especie de *G. lamblia*, dando origen a una nueva nomenclatura que agrupa a genotipos cercanos en grupos genéticos o ensamblajes, luego de que diversos estudios filogenéticos eliminaran la posibilidad de que estas diferencias se debieran a heterogeneidad entre copias del gen o a variaciones intragenotípicas (Monis et al., 2003). Se definieron entonces los grupos A, B, C, D, E, F, G y H, demostrándose por estudios moleculares que

la mayoría de los genotipos presentan ciertas preferencias por los hospedadores (**Tabla 1.1**) (Monis et al., 2003; Thompson et al., 2000).

Tabla 1.1: Grupos genéticos de *G. lamblia* y sus hospedadores.

Ensamblaje	Hospedador
A	Humanos, Perros, Gatos, Ovinos, Porcinos, Chinchillas, Bovinos, Caballos,
B	Humanos, Perros, Ratas, Ratones, Chinchillas, Castores
C	Perros
D	Perros
E	Bovinos, Porcinos, Ovinos
F	Gatos
G	Ratas
H	Focas, Gaviotas

De los grupos A y B que infectan humanos, los aislados pertenecientes al grupo A han sido los más estudiados a nivel celular y molecular; en tanto, los aislados pertenecientes al grupo B presentan mayor prevalencia a nivel mundial (Caccio et al., 2008).

Del grupo A se han establecido algunos aislados en cultivos *in vitro*, siendo uno de los más estudiados el proveniente de un paciente infectado en Afganistán (cepa WB-grupo A, utilizado en el presente *Trabajo de Tesis*). Del grupo B sólo se ha descrito un aislado, proviene de un paciente oriundo de Alaska (cepa GS, grupo B).

Desde hace varios años se pretende establecer una relación entre virulencia (y por lo tanto severidad de la infección) y la presencia de una determinada cepa de *G. lamblia*. Sin embargo, hasta el momento los resultados son contradictorios debido, en parte, a la escasez de datos publicados y a la falta de genotipificación de las cepas en casos de giardiasis (Amar et al., 2002; Caccio et al., 2002; Homan et al., 1998; Hopkins et al., 1999; Mahbubani et al., 1992; McIntyre et al., 2000; Monis et al., 1999; Sulaiman et al., 1999). Hace algunos años se secuenciaron completamente los genomas de la cepa WB (Morrison et al., 2007) y de la cepa GS (Franzen et al., 2009), compartiendo ambas un 85% aproximadamente de similitud en sus genomas. Todos estos hallazgos han llevado a plantear si ambos genotipos pertenecen o no a la misma especie, discrepancia que hasta el momento no ha sido resuelta (Wielinga and Thompson, 2007).

I. i. 4 Biología Celular: Características Morfológicas Generales de *G. lamblia*

Durante su ciclo de vida, *G. lamblia* experimenta cambios bioquímicos y morfológicos significativos que le permiten sobrevivir en condiciones ambientales desfavorables (Lujan, 2011). En el ciclo de vida de *G. lamblia* predominan dos formas o estadios diferentes (**Figura 1.1**). Dentro del intestino delgado del hospedador vive y prolifera el trofozoíto, la forma celular activa que coloniza y parasita las células del intestino delgado (**Figura 1.1A**). Fuera del ambiente nutricional que le provee el hospedero, el parásito vive como quiste, una estructura resistente de muy baja actividad metabólica que constituye la forma de diseminación a otros hospedadores susceptibles (**Figura 1.1B**) (Adam, 2001).

G. lamblia no requiere hospedador intermedio ni posee reproducción sexual, siendo su ciclo de vida tan simple que en la actualidad es posible reproducirlo enteramente *in vitro* (cultivo axénico), imitando los estímulos fisiológicos característicos del hospedador (Boucher and Gillin, 1990). Esta herramienta representa un instrumento útil no sólo para estudiar procesos generales de la diferenciación celular, sino también mecanismos de adaptación desarrollados por *G. lamblia* y otros parásitos intestinales que manifiestan conductas similares.

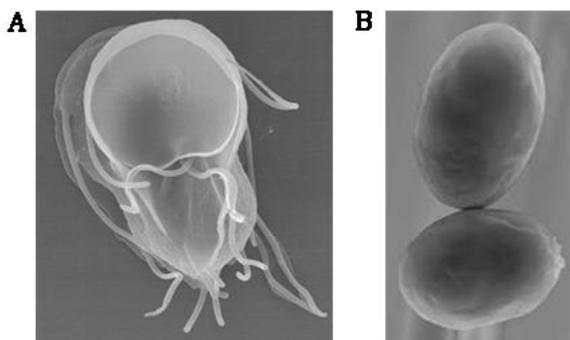


Figura 1.1: El trofozoíto y quiste de *G. lamblia*. Microscopía electrónica de barrido. **A.** Trofozoíto de *G. lamblia* (vista ventral). Un segundo trofozoíto puede observarse detrás de él. **B.** Quistes maduros. (Gardner and Hill, 2001)

I. i. 4.1 Trofozoíto

Los trofozoítos de *G. lamblia* presentan una extensión variable tanto en su eje longitudinal como transversal, varían de 12 a 15 μm de largo y 6 a 8 μm de ancho. Dicha extensión difiere incluso de acuerdo a la especie en cuestión (Monis et al., 2009).

Como rasgo apomórfico, *G. lamblia* cuenta con la presencia del denominado disco adhesivo en la zona ventral de la célula, el cual al contraerse genera una presión negativa que le permite fijarse a múltiples superficies (Sousa et al., 2001). Esta estructura es descripta como un arreglo de microtúbulos que emerge del surco ventral (excavado atrofiado) y recorre un sentido horario en el plano transversal (visto desde el lado ventral) (de Souza et al., 2004; Ghosh et al., 2001). Además, *G. lamblia* presenta cuatro pares de flagelos que son nombrados según la región celular de la que emergen (Figura 1.4), y resultan así en: dos anteriores, dos postero-laterales, dos caudales y dos ventrales; siendo del surco ventral de donde surge este último par (McInally and Dawson, 2016).

Con respecto a las estructuras celulares internas, *G. lamblia* presenta un sistema de endomembranas particular, ya que carece de un aparato de Golgi morfológicamente discernible (Adam, 2001). La membrana que delimita cada uno de los núcleos se prolonga y conforma el retículo endoplasmático, el cual ocupa la mayor parte de la extensión citoplasmática de la célula (Soltys et al., 1996) e interviene, sumado a sus funciones clásicas, en el direccionamiento de proteínas (Touz and Zamponi, 2017). De modo característico, *G. lamblia* presenta un sistema de vacuolas periféricas que se localizan próximas a la superficie de la membrana plasmática del lado citosólico de la misma (Lanfredi-Rangel et al., 1998; Rivero et al., 2013) (**Figura 1.2**). Dichas vacuolas han mostrado tener actividad lisosomal, como así también estar relacionadas con procesos endosomales y de endocitosis del parásito (Lanfredi-Rangel et al., 1998; Thirion et al., 2003; Touz et al., 2004; Touz et al., 2003). Además de estas organelas, se describió la presencia de mitosomas, pequeñas estructuras de doble membrana carentes de material genético propio (Tovar et al., 2003). Se demostró que en el genoma de *G. lamblia* se encontraban genes codificantes para proteínas mitocondriales clásicas, de síntesis de centros Fe-S y de transporte mitocondrial, y que éstos se correspondían con un pequeño proteoma mitosomal (Arisue et al., 2002; Dagley et al., 2009; Jedelsky et al., 2011; Roger et al., 1998; Tachezy et al., 2001). Otra característica a destacar es el arreglo interno de microtúbulos, que da lugar a numerosas estructuras propias de éste y otros parásitos. Las proteínas principales que lo componen son alfa y beta tubulinas, conjuntamente con proteínas asociadas de carácter ácido presentes solo en *G. lamblia*, nombradas como alfa, beta, gamma y delta giardinas (Elmendorf et al., 2003). Se ha

descrito también la presencia de actina, tanto a nivel génico (pero muy poco conservado) como a nivel proteico, presentando localización en estructuras que supondrían un arreglo de microfilamentos (Feely et al., 1982). Los microtúbulos forman, además del citoesqueleto y el axostilo central, una serie de entramados en el centro de la célula denominados Cuerpos Medios (Piva and Benchimol, 2004) (**Figura 1.2**). Se ha postulado que éstos participan en la progénesis del disco ventral, en la citocinesis y que además contribuirían en el proceso de flexión del extremo caudal de la célula, pero ninguna de estas aserciones ha sido completamente corroborada. Respecto a esa última función propuesta, se demostró que el extremo caudal de la célula presentaba una red paralela de microtúbulos orientados de forma perpendicular al axostilo caudal y los flagelos postero-laterales, estructura que se denominó Funis (o complejo caudal) y que se le atribuyó la función de contracción caudal (Benchimol et al., 2004; Carvalho and Monteiro-Leal, 2004) (**Figura 1.2**).

Los flagelos también son ensamblajes microtubulares, los cuatro pares poseen una estructura de axonema (9+2) y solo el par caudal presenta filamentos de actina en forma de C (de Souza et al., 2004; Elmendorf et al., 2003). Cada axonema tiene origen en un cinetosoma (cuerpo basal) y *G. lamblia* posee ocho en total, los cuales están ubicados en la región anterior de la célula entre los dos núcleos (McInally and Dawson, 2016) (**Figura 1.2**). La asociación entre cuerpos basales y núcleo se denomina cariomastigonte, y se demostró en *G. lamblia* que los cuerpos basales y la membrana nuclear están conectados por microfilamentos de actina (Benchimol, 2005).

Como se mencionó anteriormente, *G. lamblia* presenta un par de núcleos. Éstos se encuentran en paralelo con el eje longitudinal en la zona anterior de la célula y se ubican uno a cada lado del plano sagital (**Figura 1.2**). Ambos tienen morfología oval, aunque presentan algunas invaginaciones en la zona de contacto con los cuerpos basales (Benchimol, 2005). A pesar de que durante muchos años la presencia de nucléolos no pudo ser demostrada, recientemente se describió una región de ARNr dentro de un solo cuerpo anteronuclear en cada núcleo que tendrían las características morfológicas de un nucléolo. Estos resultados se complementan con la descripción de la presencia de cromatina condensada en contacto con el lado interno de la membrana nuclear (Jimenez-Garcia et al., 2008; Tian et al., 2010). El genoma de *G. lamblia* se organiza en 5 cromosomas y la carga genómica de cada núcleo es diploide (2N), por lo

que el trofozoíto resulta así tetraploide (Bernander et al., 2001; Upcroft et al., 2010). A pesar de que cada núcleo tiene la misma carga cromosómica y que ambos son transcripcionalmente activos, la envoltura nuclear presenta diferente cantidad de poros entre uno y el otro, por lo que se sugiere que habría una tasa transcripcional mayor en uno de los dos núcleos, aunque aún no se ha demostrado experimentalmente (Benchimol, 2004a; Kabnick and Peattie, 1990). También se observó que la cantidad de poros de la envoltura nuclear varía de acuerdo a la fase del ciclo celular en la que se encuentre el trofozoíto, disminuyendo considerablemente en la cariocinesis. *G. lamblia* no experimenta una mitosis abierta, lo cual ha sido demostrado en diferentes postulados acerca del tipo de mitosis que ocurre en *G. lamblia*. Por un lado hay evidencias a favor de la ocurrencia de una mitosis cerrada (la envoltura nuclear permanece intacta, con un huso mitótico intranuclear) y otras a favor del desarrollo de una mitosis semi-cerrada (dos husos extranucleares que acceden a la cromatina a través de hendiduras polares en las membranas nucleares) (Benchimol, 2004b; Nohynkova et al., 2000; Sagolla et al., 2006; Solari et al., 2003). Pero independientemente de cuál de estos dos tipos suceda, tanto los cuerpos basales como el disco ventral están involucrados en la cariocinesis, formando el huso mitótico y participando de la fisión de los núcleos, respectivamente (Benchimol, 2005; Sagolla et al., 2006). Otra diferencia remarcable entre los núcleos es que, tanto la replicación del material genético (fase S) como su posterior segregación (anafase) ocurren de forma desfasada en términos de sincronía inicio-final (Sagolla et al., 2006; Wieseahn et al., 1984).

Por otro lado, el metabolismo de *G. lamblia* en su condición de *Excavata* y como organismo anaerobio, no es tan complejo como el de eucariotas superiores. La principal vía de producción de energía es fermentativa, donde luego de la glucólisis, el piruvato generado puede ser llevado a acetato con la producción adicional de ATP, o a etanol con la recomposición del agente oxidante NAD. Toda la producción de ATP en *G. lamblia* ocurre a nivel de sustrato, pero no todo el ATP proviene de la glucólisis (Adam, 2001). El piruvato también puede producirse a partir de los aminoácidos alanina o ácido aspártico, e incluso de arginina, ya que *G. lamblia* dispone de la vía arginina dehidrolasa clásica de bacterias, con la cual puede llegar a producir hasta cuatro veces más ATP que con la glucólisis por molécula de sustrato (Brown et al., 1998; Novak et al., 2016;

Schofield et al., 1990). Excepto para Ala y Val, *G. lamblia* resulta auxótrofa para el resto de los aminoácidos, como así también para lípidos (colesterol y fosfolípidos) y bases nitrogenadas (purinas y pirimidinas), por lo que necesita tomar estas del medio extracelular (Adam, 2001; Aldritt et al., 1985; Jarroll et al., 1981; Wang and Aldritt, 1983).

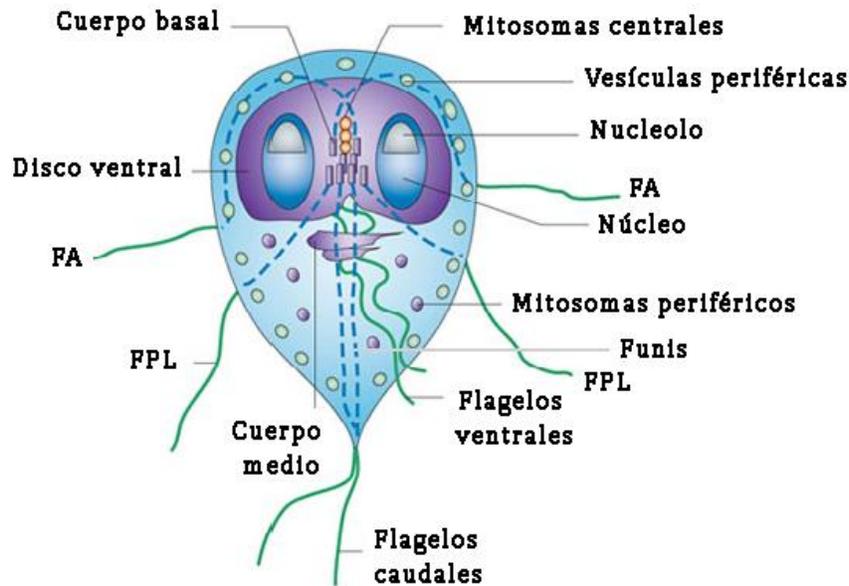


Figura 1.2: El trofozoíto de *G. lamblia*. Diagrama que muestra la morfología de *G. lamblia* en el estadio vegetativo. FA: flagelos anteriores. FPL: flagelos posterolaterales (Ankarklev et al., 2010).

I. i. 4.2 El Quiste

El quiste de *G. lamblia* es una estructura de morfología elipsoidal con 9 a 12 μm de longitud por 5 a 8 μm de ancho, caracterizado por la presencia de una pared quística refringente de 0,3 a 0,5 μm de espesor adosada a la membrana plasmática, y constituida por proteínas y filamentos de carbohidratos (Jarroll et al., 1989; Manning et al., 1992). En su interior, el quiste contiene cuatro núcleos, restos de flagelos, vesículas periféricas, cuerpos basales y los axonemas de los flagelos, como así también el axostilo asociado con el flagelo caudal, fragmentos cortos del retículo endoplasmático, cuerpo medio y porciones fragmentadas del disco ventral (Loftness et al., 1984) (**Figura 1.3**). La pared del quiste consiste de una capa externa filamentosa de aproximadamente 7 a 20 nm de espesor que envuelve una doble membrana interna, separadas entre sí por el espacio

periplásmico (Erlandsen et al., 1989). Esta pared hace que el quiste sea selectivamente permeable, otorgándole resistencia a condiciones ambientales adversas y permitiéndole persistir en agua fresca, resistir a desinfectantes y a los ácidos estomacales. La red filamentosa impide el pasaje de grandes moléculas, mientras que las membranas controlan el ingreso de las pequeñas haciendo de la pared del quiste una estructura con permeabilidad selectiva (Adam, 2001). Análisis bioquímicos de la capa filamentosa demuestran que se haya constituida por proteínas (37%) y carbohidratos (63%), siendo el azúcar predominante un homopolímero de N-acetilgalactosamina ($\beta(1,3)$ -D-GalNAc) (Jarroll et al., 1989; Manning et al., 1992). En cuanto a las proteínas que forman la pared quística, hasta el momento se han descrito 4 polipéptidos: 3 de ellos se conocen con el nombre de CWPs (del inglés, *Cyst Wall Proteins*) y, el otro, una proteína de superficie rica en cisteína, tipo proteína variable de superficie, denominado HCNCp (del inglés, *High Cysteine Non-variant Cyst protein*) (Davids et al., 2006; Lujan et al., 1995b; Mowatt et al., 1995; Sun et al., 2003). Estas proteínas se encuentran ausentes en el estadio de trofozoíto, y su síntesis es regulada particularmente durante el proceso de formación del quiste.

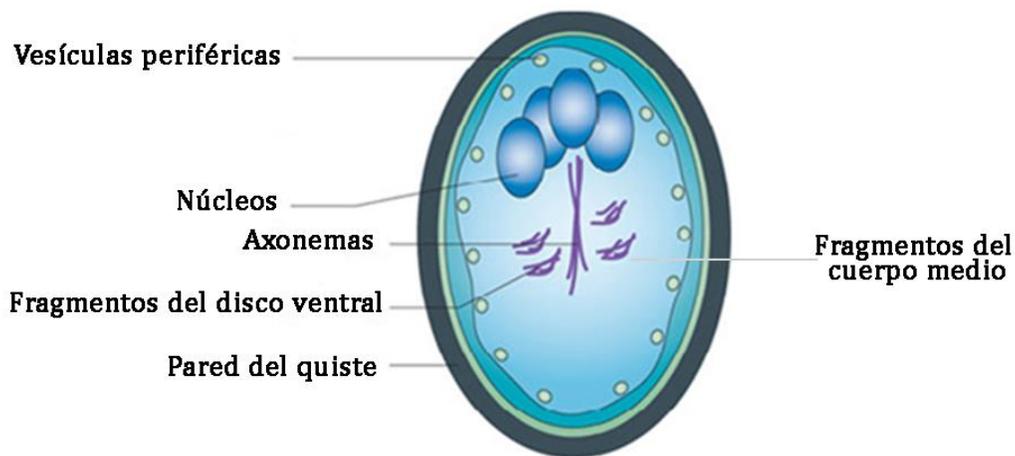


Figura 1.3: El quiste. Diagrama que muestra la morfología de *G. lamblia* durante el estadio de resistencia y diseminación de la enfermedad. Pueden observarse los axonemas de los flagelos con sus cuerpos basales, los cuatro núcleos, las vacuolas periféricas y fragmentos de disco ventral y cuerpos medios. En su exterior, la célula está cubierta por la pared del quiste (Ankarklev et al., 2010).

I. i. 4.3 Ciclo de Vida de *G. lamblia*

La infección por *G. lamblia* se inicia con la ingesta de los quistes (**Figura 1.4A**) que, por exposición al contenido ácido del estómago y a proteasas del duodeno, liberan los trofozoítos en un proceso denominado desenquistamiento (**Figura 1.4B**) (Bernander et al., 2001). Dado que de otra forma serían destruidos por el medio ácido estomacal, los trofozoítos no emergen del quiste sino hasta llegar al intestino delgado (Bingham et al., 1979), donde se multiplican y colonizan el epitelio del yeyuno. La infección puede permanecer por semanas, meses e incluso años (Smith et al., 1983). Los trofozoítos se adhieren a los enterocitos a través del disco ventral (**Figura 1.4C**), causando la sintomatología característica de la enfermedad sin disparar una respuesta inflamatoria pronunciada (Kim et al., 2009; Ropolo and Touz, 2010). La adhesión a la superficie de las células intestinales es necesaria para que la división celular, a través de fisión binaria, se lleve a cabo. Mediante movimientos progresivos (tendiendo a rotar alrededor de su eje longitudinal), los trofozoítos se desprenden del enterocito adhiriéndose a la superficie de otro, resultando este ciclo de adhesión-disociación necesario para asegurar la colonización del epitelio intestinal del hospedador (Elmendorf et al., 2003). Un mecanismo clave que le permite al trofozoíto permanecer en el intestino del hospedador, evadiendo la respuesta inmune humoral es el proceso de variación antigénica. Durante este proceso, cada trofozoíto individual está cubierto por un solo miembro de una familia de proteínas antigénicas diversas llamadas proteínas variables de superficie (VSP del inglés, *Variant-specific Surface Proteins*). (Nash et al., 1988; Nash and Mowatt, 1992, 1993).

Luego de un período de tiempo variable, algunos de estos parásitos descienden por el tracto intestinal, disparándose en las porciones más bajas del yeyuno su diferenciación a quiste o enquistamiento (**Figura 1.4D**) que completa así el ciclo de vida del parásito (Lujan et al., 1997). Finalmente, los quistes son liberados con las heces, donde pueden permanecer durante meses en el estadio de latencia.

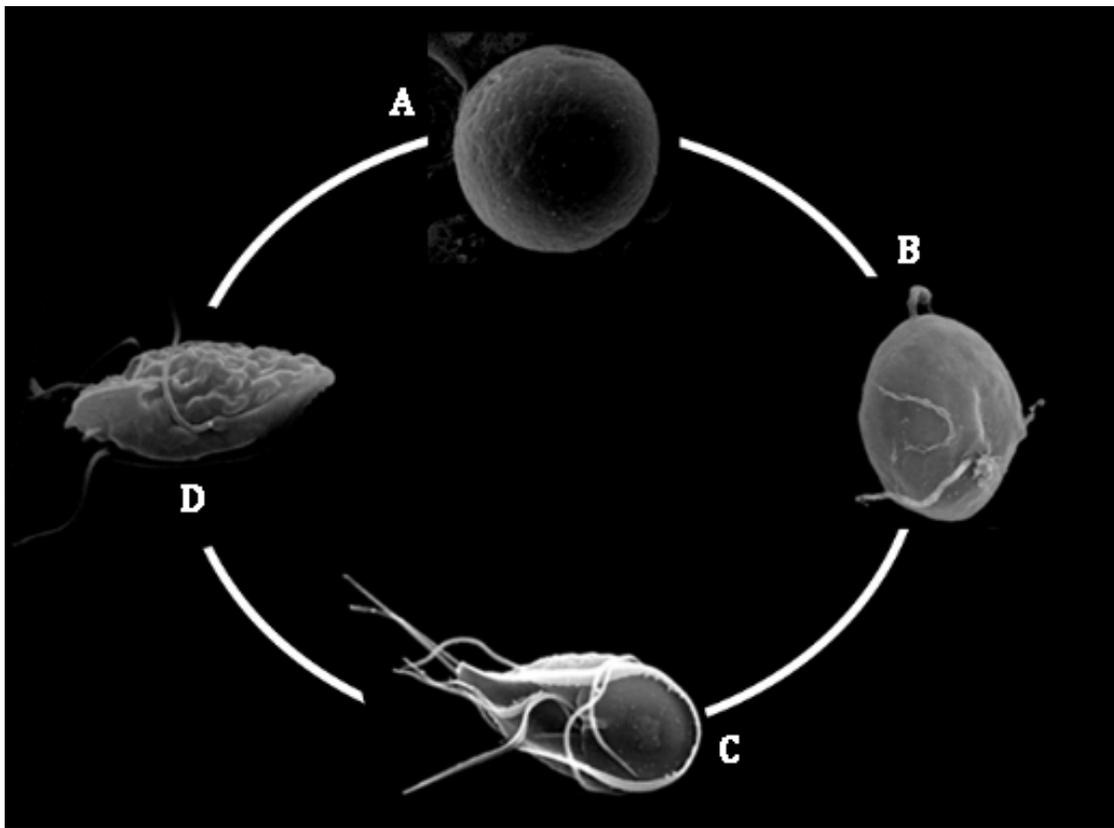


Figura 1.4: Ciclo de vida de *G. lamblia*. Los quistes (A) a través de un proceso de desenquistamiento (B) que comienza en el estómago, liberan los trofozoítos (C). Éstos, se duplican en el intestino delgado (fundamentalmente en el yeyuno), y a medida que descienden por el intestino son inducidos a enquistarse (D). Los quistes formados son finalmente eliminados con las heces cerrando el ciclo vital del parásito.

Una manera de estudiar los eventos bioquímicos y genéticos fundamentales durante la transformación gradual del trofozoíto móvil, binucleado y de forma piriforme a la forma inmóvil, tetranucleada y ovalada del quiste (Gottig et al., 2006; Lauwaet et al., 2007) es mediante la reproducción *in vitro* del parásito con medios de cultivo específicos (Boucher and Gillin, 1990; Gillin et al., 1989; Gillin et al., 1987). El enquistamiento de *G. lamblia* involucra la síntesis de las proteínas CWPs que, luego de ser transportadas en vesículas de enquistamiento (ESVs del inglés, *Encystation Specific Vesicles*) hacia la membrana plasmática, se liberan por un mecanismo de exocitosis para formar la pared del quiste (Adam, 2001). Se han descrito tres fases claramente distinguibles en el proceso, e involucran: (a) la recepción del estímulo de enquistamiento, el envío de la señal a los núcleos y la activación de genes específicos, (b) la síntesis de componentes de la pared del quiste y la biogénesis de organelas

secretoras necesarias para el transporte de estos componentes y (c) el ensamblado de materiales para formar la pared extracelular.

a) Recepción del estímulo de enquistamiento, envío de la señal a los núcleos y activación de genes específicos:

La privación de colesterol es necesaria y suficiente para iniciar el proceso de enquistamiento en *G. lamblia*. Este parásito no puede sintetizar colesterol *de novo* y debe incorporarlo del intestino delgado del hospedador. Debido a que éste absorbe colesterol casi por completo en el yeyuno e íleon, la concentración de este lípido va disminuyendo a lo largo del tracto intestinal, lo cual probablemente dispararía una señal para que se desarrolle el proceso de enquistamiento (Lujan et al., 1996a). A su vez, las sales biliares forman micelas estables con el colesterol, reduciendo aún más la disponibilidad del lípido para el parásito. Aún se desconoce de qué manera *G. lamblia* detecta variaciones en los niveles de colesterol, y cómo esta señal se traduce en una regulación de los genes específicos del enquistamiento. Es posible que un cambio en la fluidez de la membrana modifique la actividad de enzimas ancladas a la misma, produciendo la activación de vías de transducción de señales específicas hacia los núcleos (Lujan et al., 1997). Particularmente, las células inducidas a enquistar presentan una disminución de la población en fase G1 del ciclo celular a expensas de un aumento de la población en fase G2/M (células con ADN duplicado – 2x4N). Por este motivo, se ha propuesto que el estímulo de enquistamiento es procesado en alguno de los puntos de control de la fase G2 o M del ciclo de división celular (Bernander et al., 2001).

b) Síntesis de componentes de la pared del quiste y biogénesis de organelas secretoras necesarias para el transporte de estos componentes:

Las proteínas más estudiadas y caracterizadas como formadoras de la pared del quiste son los tres miembros de la familia de las CWPs, la proteína HCNCp y, más recientemente, una familia de proteínas denominadas EGFCP (del inglés, *Epidermal Growth Factor (EGF)- like Cyst Protein*) (Chiu et al., 2010). Se ha determinado que la expresión de estas proteínas aumenta considerablemente cuando los trofozoítos son inducidos a enquistarse (Gottig et al., 2006). Durante el enquistamiento los trofozoítos

pierden su capacidad de adhesión, se redondean y se cargan de ESVs. Estas vesículas, ausentes en trofozoítos en crecimiento, son gránulos electrodensos formados *de novo*, grandes e irregulares, que transportan las proteínas del enquistamiento y polisacáridos liberados luego al exterior para constituir la pared del quiste (Faubert et al., 1991; Gottig et al., 2006; Touz et al., 2008).

La expresión de las CWPs incrementa inmediatamente después de la inducción del enquistamiento (Mowatt et al., 1995) al igual que otras proteínas como la glucosamina-6-fosfato isomerasa (G6PI del inglés, *Glucosamine 6 Phosphate Isomerase*), involucrada en la biosíntesis del carbohidrato $\beta(1,3)$ -D-GalNAc (Knodler *et al.*, 1999) y la proteína BiP (del inglés, *Immunoglobulin heavy chain-Binding Protein*) (Kim et al., 2009; Lujan et al., 1996b).

En cuanto a la regulación de la expresión de estas proteínas, el factor de transcripción Myb1-like protein (del inglés, *Myeloblastosis-related transcription factors*) es capaz de unirse a regiones promotoras de los genes *cwp1*, *cwp2*, *cwp3* y *g6pi* induciendo su expresión e incluso es capaz de unirse a su propio promotor (Huang et al., 2008; Sun et al., 2002)

c) Ensamblado de la pared quística:

Se postula que las proteínas formadoras de la pared del quiste son liberadas a la periferia de los trofozoítos por las ESVs mediante exocitosis, depositándose inicialmente en la superficie del trofozoíto, mientras que los precursores de $\beta(1,3)$ -D-GalNAc se integran luego a la pared para finalmente co-polimerizarse y formar la malla fibrilar (Gillin et al., 1987; Mowatt et al., 1995). La formación de la pared del quiste se realiza por regiones, observándose parches de malla fibrilar dispersos en la superficie de los trofozoítos inducidos a enquistamiento, evidentes a las 15-18h posterior a la inducción. Estos parches aparecen al azar, se unen entre sí al multiplicarse y en ocasiones se superponen engrosando la malla fibrilar (Arguello-Garcia et al., 2002). Ensamblada la pared del quiste, las ESVs desaparecen y dentro del quiste ocurre replicación del ADN, cariocinesis y una citocinesis incompleta, razón por la que cada quiste contiene en su interior, cuatro núcleos (Adam, 2001; Gillin et al., 1987).

Para que *G. lamblia* pueda adaptarse y sobrevivir, tanto la variación antigénica como el proceso de enquistamiento, deben ocurrir de manera rápida y eficiente. Uno de

los posibles mecanismos que podría explicar estos cambios y que han cobrado importancia en los últimos años son los mecanismos epigenéticos que permiten producir cambios transitorios a nivel de la cromatina y por lo tanto en la expresión génica.

I. ii. Regulación epigenética en eucariotas

En organismos eucariotas, la información genética (ADN) está organizada en pares de cromosomas que contienen genes. Estos cromosomas se pueden comparar con bibliotecas que contienen diferentes libros que en conjunto conforman un organismo completo. Sin embargo, lo que determina cuándo se leen los diferentes libros, y en qué orden, aún no está del todo claro. Este extraordinario desafío probablemente revele información sobre cómo se coordinan los diferentes eventos celulares durante el desarrollo normal y anormal de un organismo.

La secuencia de ADN del genoma de un organismo se compone de millones de nucleótidos compuestos de pares de bases, abreviadas en cuatro letras (o bases) A, C, G y T (adenina, citosina, guanina y timina), dando lugar a regiones codificantes y no codificantes del genoma. En eucariotas superiores, la molécula de ADN tiene aproximadamente dos metros de largo, y por lo tanto, necesita condensarse al máximo para almacenarse en el núcleo. La envoltura del ADN alrededor de "carretes" de proteínas, las llamadas proteínas histonas, proporciona una solución elegante al problema del empaquetamiento, dando lugar a una estructura repetitiva de "proteína:ADN" conocida como nucleosoma, la unidad fundamental de la cromatina. Sin embargo, al empaquetar al ADN para que se adapte mejor a un espacio confinado, se presenta un problema, al igual que cuando uno empaca demasiados libros en los estantes de una biblioteca, se hace más difícil encontrar y leer el libro de interés y por lo tanto, se necesita un sistema de indexación. La cromatina, como plataforma de organización del genoma, proporciona esta solución. La cromatina no presenta una estructura uniforme sino que posee diferentes apariencias, desde una fibra altamente condensada hasta un estilo relajado en donde los genes se expresan típicamente. La variación entre ambos estados de compactación puede darse por la introducción de proteínas histonas inusuales (conocidas como variantes de histonas), estructuras

alteradas de la cromatina (conocidas como remodelación de cromatina) y la adición de ciertas modificaciones químicas a las proteínas histonas (conocidas como modificaciones covalentes). Además, la adición de un grupo metilo directamente a una base de citosina en la secuencia de ADN, conocida como metilación del ADN, puede proporcionar sitios de señalización para que ciertas proteínas alteren el estado de la cromatina o afecten la modificación covalente de las histonas vecinas. Evidencias recientes sugieren que ARNs no codificantes pueden "guiar" regiones especializadas del genoma hacia estados de cromatina más compactados. Por lo tanto, la cromatina debe considerarse como un polímero dinámico que puede organizar y modular el genoma, influenciando en última instancia qué genes se expresan y cuáles no (Allis, 2007).

En conjunto, estos mecanismos proporcionan a la cromatina un principio para organizar y regular a nivel funcional los genomas, conocido como "epigenética". En algunos casos, los patrones epigenéticos parecen heredarse a través de las divisiones celulares, proporcionando una "memoria celular" que puede extender el potencial de información heredable del código genético. Por lo tanto, la epigenética puede definirse en la actualidad como aquellos cambios heredables en un organismo que alteran los niveles de expresión génica, a través de la modulación de la compactación cromatina, que no producen alteraciones en la secuencia del ADN.

Desglosar los mecanismos moleculares implícitos en la rama de la epigenética probablemente tendrá importantes implicancias para los estudios de biología y de las enfermedades humanas en esta era "post-genómica"(Allis, 2007).

I. ii. 1 Estructura de la cromatina

La cromatina es una estructura compacta y dinámica que permite la organización del ADN en el núcleo celular (Alberts, 2015). Esta estructura puede presentar diferentes grados de compactación según la fase celular en la que se la observe. Durante la mitosis, especialmente en la metafase, la cromatina adquiere el máximo grado de compactación generando los cromosomas, cuyo número y forma varía entre los diferentes organismos. A medida que la célula va finalizando la mitosis, la cromatina va adquiriendo una forma más relajada (**Figura 1.5**).

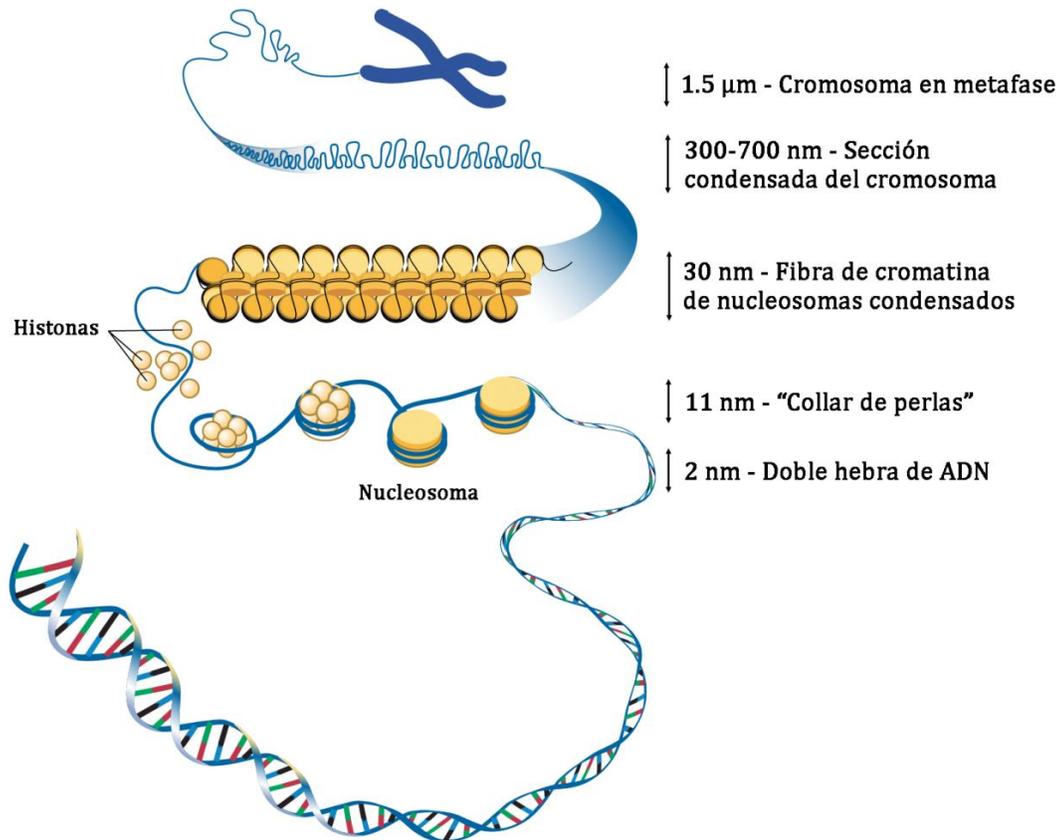


Figura 1.5: Estructura de la cromatina. Representación esquemática que muestra los distintos niveles de organización y compactación de la cromatina, desde la doble hebra de ADN hasta la estructura del cromosoma (máximo grado de compactación) (Adaptado de <https://www.nih.gov>).

En 1928, Emil Heitz, científico alemán considerado hoy en día un pionero de la epigenética, perfeccionó un método de tinción citológica y descubrió que ciertas partes de los cromosomas mitóticos estaban más densamente teñidas que otras. Las zonas que parecían más compactas y se coloreaban más, las nombró heterocromatina, y las menos coloreadas, eucromatina. Pasaron varios años hasta que se interpretaron estas estructuras, concluyendo que la eucromatina se encuentra principalmente en los brazos cromosómicos y comprende la mayoría de los genes codificadores de proteínas, es decir se corresponde con regiones del ADN que están transcribiéndose. Se la conoce como la forma relajada "abierta" de la cromatina que permite fácilmente la llegada de factores de transcripción, y por ende la expresión de la información contenida en ella.

En contraste, la heterocromatina es más compacta, altamente condensada y está enriquecida en zonas de los cromosomas que no contienen genes o se asocia con regiones genéticamente pasivas, prominentemente en los telómeros y en las proximidades de los centrómeros (**Figura 1.6**) (Berger, 2019). Durante el ciclo celular, la heterocromatina puede permanecer siempre compacta (heterocromatina constitutiva) o bien relajarse frente a ciertos estímulos y pasar a formar eucromatina (heterocromatina facultativa) (Grewal and Jia, 2007).

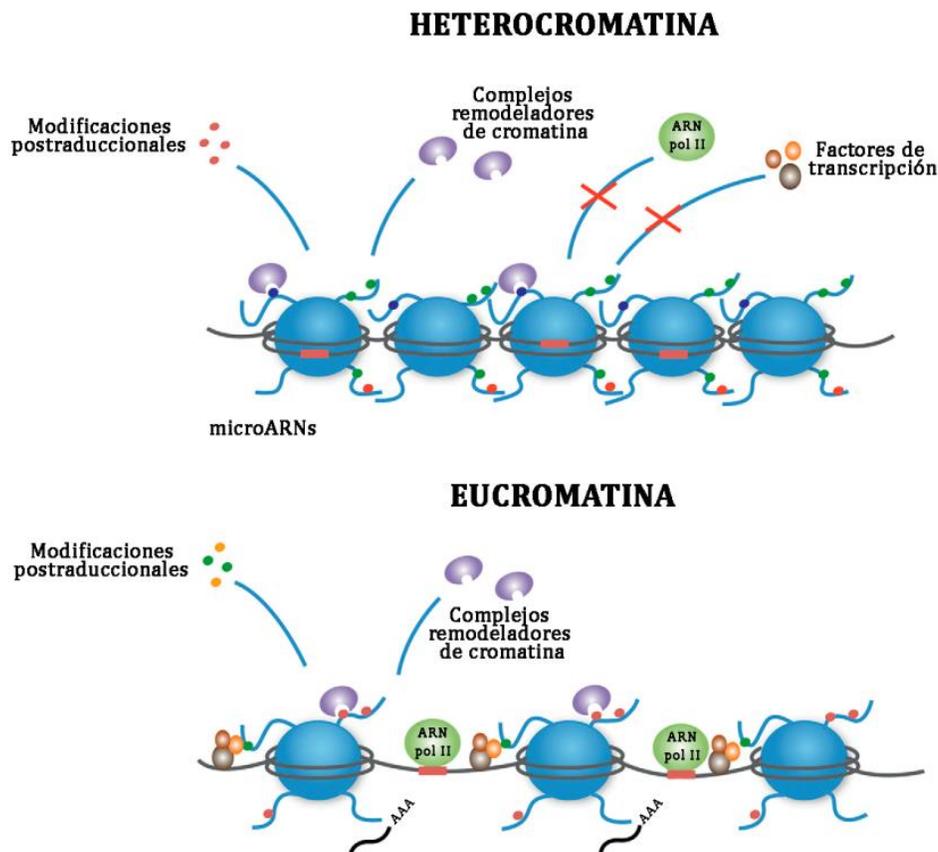


Figura 1.6: La cromatina consiste en eucromatina y heterocromatina. La heterocromatina es compacta con modificaciones post-traduccionales de histonas características que impiden el acceso de la ARN polimerasa y factores de transcripción. Los complejos remodeladores de cromatina se representan como enzimas modificadoras de histonas, pero incluyen remodeladores dependientes de ATP, enzimas modificadoras de histonas y otros complejos macromoleculares especializados los cuales son importantes para el mantenimiento de heterocromatina o eucromatina. La eucromatina también se mantiene mediante complejos macromoleculares que permiten el acceso a factores de transcripción específicos y al complejo ARN polimerasa (Adaptado de Croken et al., 2012).

I. ii. 1.2 El nucleosoma: la unidad básica de la estructura de la cromatina

Las proteínas histonas son las responsables de formar la subunidad repetitiva fundamental de la cromatina, el nucleosoma. Desde el punto de vista molecular, el nucleosoma constituye el primer nivel de organización de la cromatina. Cada nucleosoma está formado por un octámero proteico, constituido por dos representantes de cada una de las histonas H2A, H2B, H3 y H4 (He and Lehming, 2003) y una cadena doble de ADN de aproximadamente 146 pares de bases que se enrollan alrededor del octámero de histonas (**Figura 1.7A**). Cada núcleo de una partícula nucleosómica se separa del siguiente mediante una región de ADN espaciador, que puede variar desde unos pocos pares de nucleótidos hasta cerca de 90 pares de bases (revisado en Olins and Olins, 2003). La formación de los nucleosomas convierte a la molécula de ADN en una hebra de cromatina aproximadamente de un tercio de su longitud inicial. La determinación de la estructura cristalina del nucleosoma, primero a una resolución de 7 Å y luego de 2.8 Å (**Figura 1.7B**) (Luger et al., 1997; Richmond et al., 1984), proporcionó información estructural importante, en particular la evidencia acerca de la extensión de las colas amino terminales de las histonas más allá del núcleo del octámero ADN-proteína, haciendo evidente la accesibilidad a sufrir modificaciones post-traduccionales (Felsenfeld, 2014).

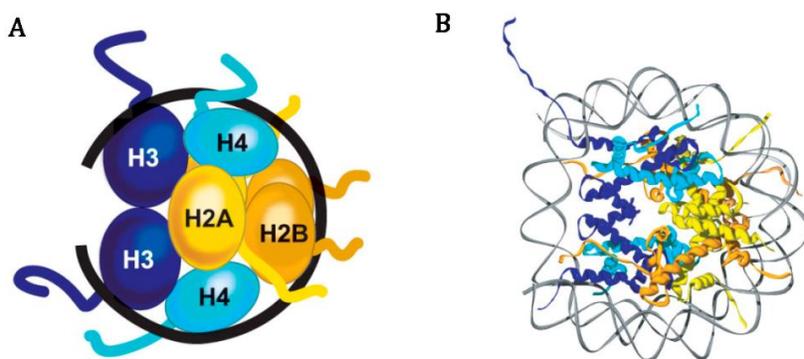


Figura 1.7: Estructura del nucleosoma. **A.** Representación esquemática de la organización de las histonas constituyendo un octámero alrededor del cual se enrolla la doble hebra de ADN (línea negra). La formación del nucleosoma ocurre primero a través de la deposición de un tetramero H3/H4 en el ADN, seguido de dos dímeros H2A/H2B. Las colas amino terminales de las histonas sobresalen de núcleo del nucleosoma, que está constituido por los dominios globulares de las histonas. **B.** Estructura cristalográfica a una resolución de 2.8 Å (Adaptado de Allis, 2007).

I. ii. 2 Mecanismos epigenéticos

Los mecanismos epigenéticos desempeñan un papel esencial en la modulación de la definición del desarrollo, morfología y fisiología de un organismo, mediante la regulación de la expresión génica. Durante el desarrollo, los mecanismos epigenéticos establecen patrones de expresión génica estables para garantizar una correcta diferenciación. También permiten que los organismos se adapten a cambios ambientales y además, las experiencias previas pueden afectar la capacidad de respuesta futura de un organismo a un estímulo a largo plazo e incluso durante generaciones (D'Urso and Brickner, 2014).

A continuación, se describen los principales fenómenos moleculares que contribuyen significativamente a la organización, fisiológicamente relevante, de la mayoría de los genomas eucariotas y que tienen implicancia en la modificación de la cromatina.

I. ii. 2.1 Metilación de ADN

La metilación del ADN es quizás la modificación química mejor caracterizada de la cromatina. En mamíferos, casi toda la metilación del ADN ocurre en los residuos de citosina de los dinucleótidos CpG. Las regiones del genoma que tienen una alta densidad de CpG se denominan “islas CpG”, y la metilación del ADN en estas islas se correlaciona con la represión transcripcional. Los patrones genómicos de metilación de citosinas en mamíferos, ya sea por metilación *de novo* o por metilación de mantenimiento, son llevados a cabo por ADN metiltransferasas (DNMT), y desempeñan un papel fundamental en la regulación génica y la organización de la cromatina durante la embriogénesis y la gametogénesis (Goll and Bestor, 2005). Las metiltransferasas de mantenimiento agregan grupos metilo al ADN hemi-metilado durante la replicación del ADN, mientras que las DNMTs *de novo* actúan después de la replicación del ADN (revisado en Groth et al., 2007). Además, la formación de la heterocromatina en muchos organismos está mediada en parte por la metilación del ADN y sus proteínas de unión, en combinación con ARN no codificante y con modificaciones de proteínas histonas que son características de cromatina silenciada (revisado en Zaratiegui et al., 2007). En conjunto, la metilación del ADN proporciona un componente estable, heredable y crítico de la regulación epigenética (Goldberg et al., 2007).

I. ii. 2.2 ARN no codificante

Recientemente, se ha hecho evidente que el ARN, en particular ARNs no codificantes, intervienen en el control de múltiples fenómenos epigenéticos (Bernstein and Allis, 2005). Algunos ejemplos de la participación de ARNs no codificantes incluyen, desde mecanismos de compensación de dosis génica en *Drosophila* y mamíferos mediados por ARN *roX* y *XIST*, respectivamente, hasta el silenciamiento de ambos genes y secuencias repetitivas de ADN por vías relacionadas con ARN de interferencia (ARNi), silenciamiento génico post-transcripcional (PTGS, del inglés, *Post-Transcriptional Gene Silencing*) y silenciamiento génico transcripcional (TGS, del inglés, *Transcriptional Gene Silencing*) respectivamente, en casi todos los eucariotas. Estos ARNs a menudo actúan en conjunto con varios componentes de la maquinaria celular de la cromatina y metilación del ADN para lograr un silenciamiento estable. Aunque es posible que los ARN inductores de PTGS (por ejemplo, microARNs, siARNs) sean de naturaleza epigenética, los ARN alusivos a TGS (por ejemplo, siARNs asociados a repetición, ARN *Xist* y pequeños ARNs en *Schizosaccharomyces pombe*) son sin duda epigenéticos, ya que pueden inducir efectos silenciadores a largo plazo que pueden heredarse a través de la división celular (Bernstein and Allis, 2005).

I. ii. 2.3 Modificaciones post-traduccionales de histonas

Durante varios años, ha sido bien conocido que las proteínas unidas al ADN en el núcleo eucariota, especialmente las proteínas histonas, podrían estar involucradas en modificar las funciones asociadas al ADN (Allis, 2007).

A partir de los estudios pioneros de Vincent Allfrey a principios de la década de 1960, se sabe que las histonas son modificadas post-traduccionalmente (Allfrey et al., 1964). Las histonas son proteínas básicas de bajo peso molecular (11-16 kDa) que consisten en un dominio globular y un extremo amino terminal variable y cargado (cola de la histona). Estas colas amino terminales de las cuatro histonas canónicas son susceptibles a sufrir una serie de modificaciones post-traduccionales, tales como acetilación, metilación, fosforilación, ubiquitinación y SUMOilación, entre otras (Hatakeyama et al., 2016). Estas modificaciones covalentes revelan un "código de histonas" que está involucrado en la generación de información epigenética, que influye en el estado de la estructura y función de la cromatina (Jenuwein and Allis, 2001;

Kouzarides, 2007) y además afectan diversos otros procesos como la replicación, reparación y recombinación del ADN.

Las consecuencias a nivel transcripcional de las modificaciones de histonas se traducen como el resultado de las consecuencias biofísicas directas de la modificación o mediante la actividad catalítica de las proteínas y complejos que reconocen y vinculan las histonas modificadas. Por ejemplo, la acetilación de histonas reduce la carga positiva neta en el nucleosoma desestabilizando la asociación de las histonas con el ADN (cargado negativamente), lo cual facilita el acceso a los factores de asociación de la cromatina y promueve, de una manera más prominente, la transcripción. Por lo tanto, equilibrando los niveles y la actividad de histonas acetiltransferasas (HAT) y deacetilasas (HDAC), que agregan y eliminan respectivamente grupos acetilo de las histonas (y otras proteínas), la transcripción puede activarse o reprimirse (Bannister and Kouzarides, 2011). En contraste, los efectos de la metilación de histonas parecen transmitirse más indirectamente, ya que la adición de un grupo metilo no modifica la carga de la cadena de histonas. Las histonas metiladas parecen funcionar más bien como una plataforma de reconocimiento para complejos de proteínas que se unen a la cromatina y remodelan su nivel de compactación, localización y actividad transcripcional (Cohen et al., 2011).

El reclutamiento de proteínas y complejos con actividades enzimáticas específicas representa el dogma actualmente aceptado de cómo las modificaciones de histonas median la función de la cromatina. En la **Tabla 1.2** se presentan algunas de las principales modificaciones post-traduccionales de histonas y las enzimas encargadas de dichas modificaciones.

I. ii. 2.3.1 La “hipótesis” del código de histonas

Más de cien modificaciones de histonas han sido descritas, y una idea popular en este campo es que la función de una marca de histona individual no puede ser entendida sin considerar su combinación con otras marcas de histonas, lo que se conoce como "hipótesis del código de histonas". Este concepto es objeto de diversas discusiones, a pesar de las crecientes evidencias bioquímicas de factores reguladores de la cromatina que se unen a combinaciones específicas de modificaciones de histonas,

los estudios funcionales y de localización encuentran una mínima complejidad combinatoria en los patrones de modificación de histonas (Rando, 2012).

Las hipótesis basadas en la metáfora del código de histonas incluyen diversas opiniones, entre ellas la idea de que las modificaciones de histonas presentan “compañeros de unión” (Turner, 1993), de que los patrones de modificación de histonas son heredables (Turner, 2000) y la sugerencia de que las modificaciones de histonas funcionan en patrones combinatorios (Strahl and Allis, 2000), entre otras.

Tabla 1.2: Principales modificaciones post-traduccionales de histonas.

MODIFICACIÓN	ENZIMA MODIFICADORA	RESIDUO MODIFICADO	FUNCIONES REGULADAS
Acetilación	Histona acetiltransferasa (HAT)	K-ac	Transcripción (+), Reparación, Replicación, Condensación
Metilación (lisinas)	Histona lisina metiltransferasa (HKMT)	K-me1 K-me2 K-me3	Transcripción (+/-), Reparación
Metilación (argininas)	Histona arginina metiltransferasa (HRMT)	R-me1 R-me2a R-me3s	Transcripción (+/-)
Fosforilación	Serina/Treonina quinasa	S-ph T-ph	Transcripción, Reparación, Condensación
Ubiquitinación	Ubiquitilasa	K-ub	Transcripción (+/-), Reparación
SUMOilación	GMP-1, sentrin-1, SMT3, UBL-1	K-su	Transcripción (-)
Citrulinación/Deiminación	Peptidil arginina deiminasa (PAD)	R > Cit	Transcripción (-)
Propionilación	Histona acetiltransferasa	K-prop	Transcripción (+)

I. iii. Regulación epigenética en *G. lamblia*

Los parásitos protozoarios constituyen una importante fuente de mortalidad y morbilidad humana. Algunos de estos parásitos tienen ciclos de vida complejos en múltiples hospedadores y deben iniciar programas complejos de desarrollo en respuesta a señales ambientales que incluyen estrés, adaptación a diferentes hospedadores y evasión de la respuesta inmune generada en el hospedador. Los eventos de diferenciación requieren una alteración drástica, y a veces rápida, del perfil de expresión génica del organismo. Los mecanismos por los cuales los parásitos regulan la transcripción y responden a los cambios en su entorno han sido caracterizados parcialmente. Durante la última década, el estudio de la regulación epigenética de la expresión génica se ha convertido en un aspecto crucial de la biología de los parásitos,

ya que permite explicar de qué manera pueden responder de forma rápida y dinámica a los cambios en el microambiente. Aunque muchos de los principios fundamentales de la regulación epigenética son similares a aquellos presentes en células de mamíferos y organismos modelo, los parásitos protozoarios también muestran mecanismos únicos y diversos de regulación génica a nivel epigenético (Croken et al., 2012). Sobrevivir y diferenciarse dentro de un ambiente potencialmente hostil son acciones claves en el ciclo de vida de *G. lamblia*. La supervivencia de *G. lamblia* depende de la efectividad de sus mecanismos de adaptación.

En la base de datos de *G. lamblia* se encuentran presentes las enzimas señaladas en la **Tabla 1.3** como posibles enzimas modificadoras de histonas. Hasta el momento, algunas de ellas han sido estudiadas observándose que regulan positiva o negativamente el proceso de variación antigénica y enquistamiento (resaltadas en color gris en la Tabla 1.3).

I. iii. 1 Variación antigénica y mecanismos epigenéticos asociados

Durante el proceso de variación antigénica, debido a la respuesta inmune del huésped o, de manera espontánea, una de las proteínas VSPs puede ser reemplazada por otra diferente, la cual no es reconocida por los anticuerpos producidos por el hospedador (Nash et al., 1988; Nash and Mowatt, 1992, 1993). Los mecanismos por los cuales una VSP cambia espontáneamente por otra son desconocidos. Se ha descrito un mecanismo de ARN de interferencia involucrado en el control de la expresión de la variación antigénica en *G. lamblia*, en donde se describieron los componentes conocidos de la maquinaria de ARN de interferencia, las proteínas Dicer y Argonauta (Prucca et al., 2008). Se demostró que en poblaciones clonales de trofozoítos que expresaban la misma VSP se transcribían eficazmente varios genes *vsp* pero solo se observaban transcriptos correspondientes a la VSP que se estaba expresando. A su vez, se detectaron los ARN anti-sentido y siARN correspondientes a los genes *vsp* silenciados pero no para el gen *vsp* expresado. Estos resultados se ven sustentados por experimentos en donde el silenciamiento de las enzimas Dicer y la ARN polimerasa dependiente de ARN conducen a la expresión de múltiples VSP en un mismo trofozoíto. No obstante, aún se desconoce de qué manera un solo transcripto de *vsp* escapa a este proceso de silenciamiento.

Tabla 1.3: Enzimas modificadoras de histonas en *G. lamblia*. Ejemplos de enzimas hipotéticas y/o caracterizadas experimentalmente que regulan la expresión génica mediante la modificación de histonas.

GEN ID	MODIFICACIÓN	ENZIMA
GL50803_10666	Acetilación	Histona acetiltransferasa GCN5
GL50803_2851		Histona acetiltransferasa MYST2
GL50803_16639		Histona acetiltransferasa Elp3
GL50803_14753		Histona acetiltransferasa tipo B subunidad 2
GL50803_17263		Histona acetiltransferasa MYST1
GL50803_3281	Deacetilación	Histona deacetilasa
GL50803_10707		Histona deacetilasa NAD-dependiente Sir2
GL50803_10708		Proteína hipotética, Dominio Sir2
GL50803_16569		Regulador transcripcional, Familia Sir2
GL50803_6942		Proteína de la familia Sir2
GL50803_11676		Sirtuina tipo 2
GL50803_8921	Metilación	Set-2, putativa
GL50803_13838		Proteína hipotética, Dominio SET
GL50803_9130		Histona metiltransferasa HMT1
GL50803_17036		Proteína hipotética, Dominio SET
GL50803_221691		Histona metiltransferasa HMT2
GL50803_8228	Remodelación de cromatina	ATPasa ADN-dependiente
GL50803_7890		Regulador transcripcional ATRX, putativa
GL50803_16143		Proteína reguladora de transcripción SNF2
GL50803_16370		Activador transcripcional, putativa
GL50803_87205		Proteína de recombinación y reparación de ADN Rhp26p
GL50803_112978		Proteína de unión a ADN-helicasa cromodominio, putativa
GL50803_17386	Ubiquitinación	Ubiquitina-proteína ligasa E3A
GL50803_95918		E3 ubiquitina ligasa para Rad6p requerida para ubiquitinación de H2B
GL50803_10661		Ubiquitina E1
GL50803_5533	Desubiquitinación	DUB-1
GL50803_11364	Fosforilación	Quinasa, AGC AKT
GL50803_112103	Citrulinación	Arginina deiminasa

En algunos organismos, la expresión de siARNs se correlaciona con la metilación de secuencias homólogas de ADN que modulan la transcripción; sin embargo, la metilación del ADN no se ha observado en *G. lamblia* (Adam, 2001; Prucca et al., 2008). Además, las diferencias en la transcripción pueden estar relacionadas con la variación en la estructura de la cromatina relacionada con el ciclo celular o la diferenciación celular, un aspecto que aún no ha sido estudiado en *G. lamblia*. Hace algunos años, se observó que la activación de genes *vsp* se asociaba con la acetilación de histonas en nucleosomas (Kulakova et al., 2006) y recientemente se demostró que la sobreexpresión de HDAC (histonas deacetilasas independientes de NAD⁺) junto con las sirtuinas ORF16569 y ORF11676 (histonas deacetilasas dependientes de NAD⁺) reducen la tasa de variación antigénica, sugiriéndose que puede deberse a una disminución en los niveles de acetilación de H4K9 y H3K8, y H4K16 en genes *vsp* (Carranza et al., 2016). Por lo tanto, de ambos estudios se puede concluir que la acetilación de histonas está involucrada en el proceso de variación antigénica en este parásito. Es por ello, que análisis relacionados con el estado de la cromatina, como así también diversos factores asociados con la acetilación y deacetilación de histonas brindarían una mejor comprensión de los factores que regulan la activación de los genes de las proteínas VSP.

I. iii. 2 Mecanismos epigenéticos asociados al enquistamiento

Se ha demostrado que el proceso de enquistamiento está regulado, al menos en parte, de manera epigenética. Einarsson *et al.* observaron que ciertas proteínas reguladoras de la cromatina, como histonas deacetilasas, histonas metiltransferasas, histonas acetiltransferasas, así como la helicasa SNF2 (del inglés, *Sucrose Non Fermentable*) de remodelación de la cromatina (**Tabla 1.3**), mostraban cambios coordinados en su expresión a lo largo del proceso (Einarsson et al., 2016). A su vez, Sonda *et al.* demostraron que los niveles de acetilación en *G. lamblia* disminuyen durante el enquistamiento, y mostraron que la inhibición de la HDAC disminuye la formación de quistes al bloquear la expresión de los genes específicos del enquistamiento, *myb1*, *cwp1-3* y *GlcN6P* (Sonda et al., 2010). Además, se encontró que estos y otros genes, los cuales están afectados por la inhibición de HDAC, se expresaban fuertemente durante el enquistamiento (Morf et al., 2010), lo que respalda la hipótesis de que la deacetilación de histonas directa o indirectamente es un requisito durante el enquistamiento.

Por otro lado, también se demostró que la familia de las SIR2 (deacetilasas dependientes de NAD⁺) (**Tabla 1.3**), son importantes en la primera etapa de enquistamiento, especialmente porque estas proteínas pueden funcionar como sensores metabólicos (Fulco et al., 2003; Vaquero, 2009). *G. lamblia* tiene cinco ORF identificadas como sirtuinas (Sonda et al., 2010): ORF10707, ORF10708 y ORF11676 (Clase I), ORF16569 (Clase III), relacionadas específicamente con Sirt5 mitocondrial de humanos, y finalmente ORF6942, probablemente perteneciente a subclase U (Carranza et al., 2016). Sin embargo, solo el ORF10707 se ha caracterizado experimentalmente como una deacetilasa dependiente de NAD⁺ (Wang et al., 2016). Los trofozoítos de *G. lamblia* tratados con inhibidores de histonas deacetilasas independientes de NAD⁺, tricostatina A (TSA) y butirato de sodio (NaB), aumentaron la señal de H3K9ac y H4K8ac, mientras que la inhibición con nicotinamida, un inhibidor de sirtuinas, aumentó los niveles de H3K9ac, H4K8ac y principalmente los niveles de H4K16ac (Carranza et al., 2016). Además, se observó una disminución temporal en la expresión de H4K8ac y H4K16ac durante el enquistamiento temprano, particularmente en las primeras 4 o 5 h de este proceso. Curiosamente, se observaron altos niveles basales de H4K8ac dentro de la región 5' arriba del gen de CWP2 en trofozoítos, estadio en el que este gen no se expresa, mientras que una disminución significativa en la acetilación de esta región ocurre durante el enquistamiento temprano, lo que sugiere que un estado de cromatina abierta puede ser necesario para la represión de genes específicos del enquistamiento (Carranza et al., 2016).

La metilación es otro mecanismo clave de la regulación epigenética. Carranza *et al.* (2016) informaron un pequeño aumento en la modificación H3K9me3 durante el enquistamiento, modificación clásica asociada con la formación de heterocromatina, mientras que las marcas H3K4me1, H3K4me2 y H3K4me3, cada una con diferentes funciones biológicas pero principalmente como activadores de la transcripción, no experimentan cambios durante la diferenciación de *G. lamblia*. Sin embargo, estos resultados son de carácter cualitativo, están basados en ensayos de inmunofluorescencia y deben ser confirmados utilizando otras metodologías.

En eucariotas, la ubiquitinación es un importante proceso que determina el destino y la función de varias proteínas. Mientras que la poliubiquitinación es principalmente una marca de degradación, la monoubiquitinación está más asociada con la regulación de la

expresión y reparación del ADN. En *G. lamblia*, se ha informado ubiquitinación de las cuatro histonas (Nino et al., 2013): la ubiquitinación de H2A se describió específicamente en los trofozoítos, mientras que las cuatro clases de histonas son modificadas en los quistes. En general, la monoubiquitinación de H2A y H2B tiene funciones relevantes en la regulación de muchos procesos, incluyendo el inicio de la transcripción y elongación, el silenciamiento y la reparación del ADN (Suryadinata et al., 2014; Weake and Workman, 2008). En *G. lamblia*, la sobreexpresión de la enzima activadora de ubiquitina E1 (**Tabla 1.3**) aumenta la tasa de enquistamiento, lo que sugiere una relación directa entre la ubiquitinación y la diferenciación del parásito (Nino et al., 2012). Asimismo, a través de análisis bioinformáticos, la E3-ligasa hipotética responsable de la ubiquitinación de H2B (**Tabla 1.3**), denominada Bre1, también ha sido identificada, sugiriendo que los modificadores de histonas correspondientes para la ubiquitinación de H2B están presentes en este organismo (Nino et al., 2013). Muchos estudios indican que en levaduras y eucariotas superiores la ubiquitinación de H2B es un requisito previo para la metilación de H3K4 y H3K79 (Osley, 2006). Sin embargo, son necesarios estudios adicionales para confirmar esta hipótesis en *G. lamblia*.

La enzima arginina deiminasa (ADI) (**Tabla 1.3**) participa en la supervivencia del parásito y, además de su rol como enzima metabólica, también funciona como una peptidil-arginina deiminasa (PAD), convirtiendo arginina unida a proteínas en citrulina (Touz et al., 2008). Consistentemente, dos reportes previos (Touz et al., 2008; Vranych et al., 2014) han demostrado que durante el enquistamiento tardío, ADI es SUMOilada en el residuo lisina 101 y posteriormente translocada a los núcleos. En células humanas, la proteína peptidil-arginina deiminasa PAD4 es reclutada en el promotor de numerosos genes que promueven la deiminación (citrulinación) de las histonas H3 y H4, lo que se asocia con una disminución de la transcripción de los genes proximales (Wang et al., 2004). Curiosamente, en *G. lamblia* hay evidencias que relacionan la translocación de ADI a los núcleos con una disminución de la expresión de los genes *cwp* y, por lo tanto, con la disminución de la formación de quistes (Vranych et al., 2014), lo que sugiere que ADI sería capaz de deiminar histonas durante el proceso de enquistamiento en *G. lamblia*, regulando de manera negativa la etapa final de este proceso. En células eucariotas, se ha descrito que la citrulinación de argininas contrarresta la metilación de las mismas (Cuthbert et al., 2004; Hidaka et al., 2005; Wang et al., 2004). Se estima que dilucidar la

importancia de las modificaciones post-traduccionales de proteínas nucleares indudablemente permitirá adquirir nuevos conocimientos en el campo de la regulación epigenética de la expresión génica en *G. lamblia*.

En la **Figura 1.8** se resume la participación de las enzimas modificadoras de histonas estudiadas hasta el momento en *G. lamblia*, que están involucradas en regular positiva o negativamente el proceso de enquistamiento.

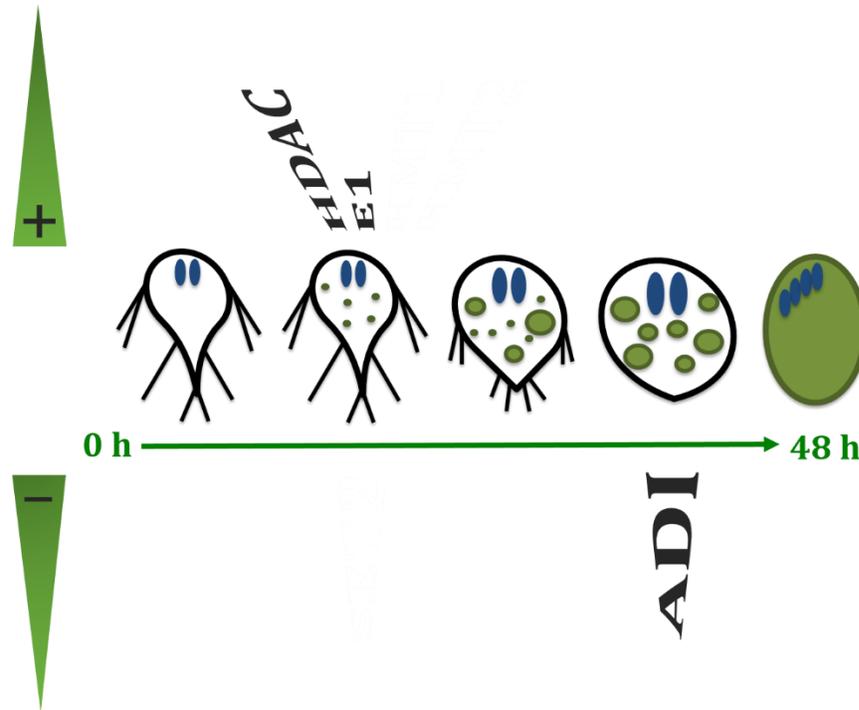


Figura 1.8: Participación de enzimas modificadoras de histonas durante el enquistamiento de *G. lamblia*. Representación esquemática del proceso de enquistamiento en donde se indican las enzimas modificadoras de histonas estudiadas hasta el momento. Los núcleos se representan en color azul y las ESVs conteniendo las CWPs en color verde. La flecha indica el progreso del proceso de enquistamiento a través del tiempo (0-48 h). “+” indica una regulación positiva del proceso; “-” indica una regulación negativa. HDAC: Histona deacetilasa; E1; ubiquitina ligasa; ADI: Arginina Deiminasa.

OBJETIVOS

En el presente trabajo de tesis se propone como objetivo general analizar los cambios epigenéticos relacionados con el ciclo de vida del protozoo intestinal *G. lamblia*.

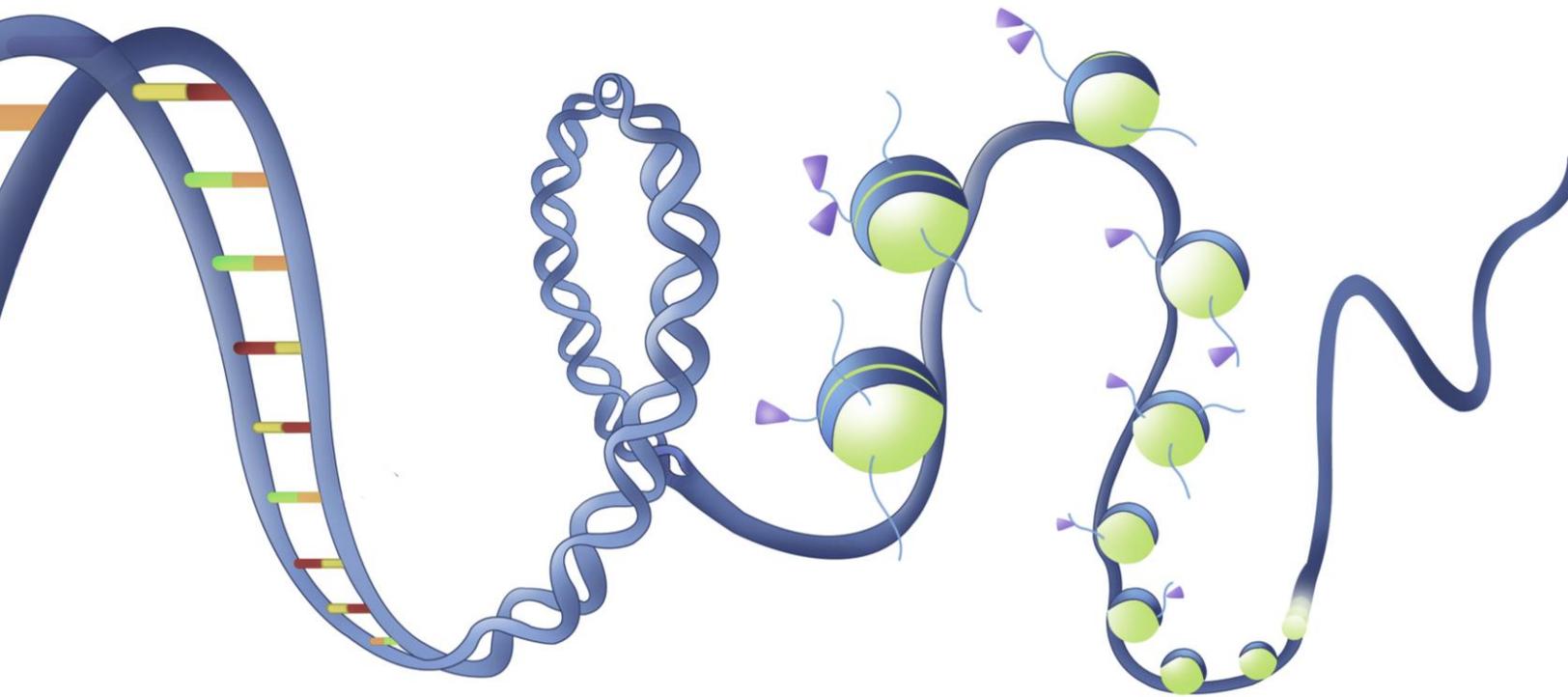
OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. **Caracterizar las Histonas metiltransferasas de *G. lamblia* durante el crecimiento y el enquistamiento.**
 - 1.1 Identificar por análisis *in silico* las enzimas histonas metiltransferasas presentes en el genoma de *G. lamblia*.
 - 1.2 Estudiar la expresión, localización y participación de las histonas metiltransferasas durante el crecimiento y el proceso de enquistamiento.

2. **Estudiar las modificaciones post-traduccionales presentes en las histonas de *G. lamblia* durante el estadio de trofozoíto.**
 - 2.1 Identificar por análisis *in silico* las proteínas histonas presentes en el genoma de *G. lamblia*.
 - 2.2 Analizar el perfil de las modificaciones post-traduccionales presentes en las histonas durante el estadio de trofozoíto de *G. lamblia*.

Capítulo II

HISTONAS METILTRANSFERASAS EN *G. LAMBLIA*



Capítulo II: HISTONAS METILTRANSFERASAS EN *G. LAMBLIA*

II. i. Introducción

Las histonas metiltransferasas (HMTs) son enzimas que catalizan la adición de grupos metilo a los residuos de lisina (K) o arginina (R) en los extremos amino terminales de las histonas H3 y H4. El residuo de lisina puede ser mono, di o trimetilado, mientras que el residuo de arginina solo puede ser mono o dimetilado. El resultado final de la incorporación de un grupo metilo es variable, puede afectar desde la activación transcripcional hasta el silenciamiento de la expresión de genes, dependiendo del residuo diana y la localización de dicho residuo en una histona en particular.

Existen dos grupos de histona lisina metiltransferasas (HKMT), ambos grupos utilizan S-adenosil-L-metionina como donante del grupo metilo y catalizan la adición de este grupo al grupo ϵ -amino de la cadena lateral de la lisina (Schubert et al., 2003). El grupo de metiltransferasas de clase I, (PKMT, del inglés *Protein lysine methyltransferases*) pertenece a una extensa superfamilia de metiltransferasas que se encuentra en eucariotas, procariotas y arqueas. Los miembros de esta familia metilan ADN, ARN o aminoácidos, tales como arginina, glutamina, aspartato e histidina (Lanouette et al., 2014). El segundo grupo, y que es el de interés en el presente trabajo de tesis, reúne enzimas caracterizadas por tener un dominio catalítico SET de ~130 aminoácidos (metiltransferasas clase V) denominado así en honor a *SU (var)3-9*, *Enhancer-of-Zeste*, y *Trithorax* (SET), las tres primeras proteínas identificadas que albergan este dominio en *Drosophila melanogaster* (Tschiersch et al., 1994). Este dominio es el responsable de la actividad catalítica de estas metiltransferasas y presenta cuatro motivos conservados: GXG, YXG, NHXCXPN y ELXFDY. Además se describió la presencia de dos motivos ricos en cisteína estrechamente empaquetados: el dominio pre-SET, el cual es muy importante para mantener la estabilidad estructural, y el dominio post-SET, el cual es parte del sitio activo del canal de lisina (Lanouette et al., 2014).

La metilación de lisinas en histonas es una marca epigenética involucrada en muchos procesos celulares críticos, y a pesar de los extensos estudios llevados a cabo respecto a esta modificación en células eucariotas, escasos estudios se realizaron en el protozooario *G. lamblia*. Recientemente se reportaron evidencias de metilación de histonas en este parásito, utilizando anticuerpos comerciales y ensayos de inmunofluorescencia para analizar la localización del sustrato (Carranza et al., 2016; Dawson et al., 2007). Si bien se describieron mono, di y trimetilación de H3K4 en el parásito, así como trimetilación de H3K9, que muestra marcas distribuidas en ambos núcleos (Carranza et al., 2016), hasta el momento no hay estudios relacionados con las enzimas responsables de la metilación de histonas en *G. lamblia*, ni las funciones en las cuales podrían estar involucradas.

II. ii. Resultados

El proyecto de secuenciación del genoma de las cepas WB, GS y P15 de *G. lamblia* se inició en el año 1998 y se completó en el 2007 (Morrison et al., 2007). Desde entonces, la información obtenida representa una herramienta fundamental para la realización de análisis genómicos y bioinformáticos para luego inferir análisis transcriptómicos y proteómicos en general.

Haciendo uso de la bioinformática, y con vistas a estudiar la metilación de histonas en este parásito, se realizó en primera instancia una búsqueda en la base de datos del genoma de *Giardia* (GDB del inglés, *Giardia DataBase* <http://giardiadb.org>).

II. ii. 1. Histona Metiltransferasa 1, Histona Metiltransferasa 2 y SET2 son proteínas codificadas en el genoma de *G. lamblia*

Los análisis bioinformáticos revelaron la presencia de tres Histonas Metiltransferasas hipotéticas en todos los ensamblajes descritos de *G. lamblia*, HMT1 (GL50803_9130), HMT2 (GL50803_221691) y Set-2 (GL50803_8921) (**Tabla 2.1**). HMT1 es una proteína compuesta por 298 aminoácidos, HMT2 está compuesta por 677 aa y SET2 692 aa, las que presentan una masa molecular aproximada de ~ 34, 75 y 76 kDa, respectivamente.

Para confirmar la presencia de estas hipotéticas HMTs de *G. lamblia*, se realizó una búsqueda mediante el software HMMER contra el proteoma completo de *G. lamblia*, utilizando el perfil creado SET disponible en Pfam (es decir, alineamientos múltiples de secuencias de miembros de la familia con dominio SET que se utilizaron como la base para construir el perfil HMM). Considerando el dominio SET clásico catalítico de estas proteínas, la búsqueda fue realizada considerando todas las proteínas descriptas que contienen el dominio SET y que además presentaban actividad catalítica conocida. Se cortaron las secuencias dejando los dominios SET y post-SET, se alinearon y se analizó la filogenia por máxima verosimilitud. Todas las secuencias encontradas de *G. lamblia* (**Tabla 2.1**) se encuentran en grupos de taxonomía diversa, las mismas fueron localizadas en diferentes clados a lo largo del árbol filogenético junto con proteínas de diferentes especies como *Homo sapiens* (hsa), *Mus musculus* (mmu), *Drosophila melanogaster* (dme), *Saccharomyces cerevisiae* (sce),

Toxoplasma gondii (tgo), *Cryptosporidium parvum* (cpv), *Arabidopsis thaliana* (ath), entre otros (**Figura 2.1**).

Tabla 2.1: Histonas metiltransferasas hipotéticas en los diferentes ensamblajes de *G. lamblia*.

ID	Database ID	Ensamblajes	Proteína anotada
gla0000154	GL50803_9130	A - isolate WB	Histona metiltransferasa 1 - GIHMT1
glaa153297	DHA2_153297	A - isolate DH	Metiltransferasa hipotética
glb0000710	GL50581_2583	B - isolate GS	Histona metiltransferasa 1
glbb152988	GSB_152988	B - isolate	Metiltransferasa hipotética
gle0003206	GLP15_1600	E - isolate P15	Histona metiltransferasa 1
gla0000335	GL50803_221691	A - isolate WB	Histona metiltransferasa 2 - GIHMT2
glaa0000335	DHA2_154382	A - isolate DH	Proteína hipotética con dominio SET
glb0000586	GL50581_3980	B - isolate GS	Histona metiltransferasa 2
glbb150181	GSB_150181	B - isolate	Proteína hipotética con dominio SET
gle0001340	GLP15_2575	E - isolate P15	Histona metiltransferasa 2
gla0005658	GL50803_8921	A - isolate WB	Proteína hipotética SET2 - GISET2
glb0001645	GL50581_420	B - isolate GS	Proteína hipotética SET2
glbb0008921	GSB_8921	B - isolate	Proteína hipotética con dominio SET
gle0002966	GLP15_1900	E - isolate P15	Proteína hipotética SET2

Se analizó la identidad (I) así como la similitud (S) de aminoácidos entre las GIHMTs hipotéticas con su homólogo más cercano y se encontró para GIHMT1 39% (I) y 59% (S) (**Anexo I**), para GIHMT2 23% (I) y 70% (S) (**Anexo II**) y, para GISET2 35% (I) y 59% (S) (**Anexo III**).

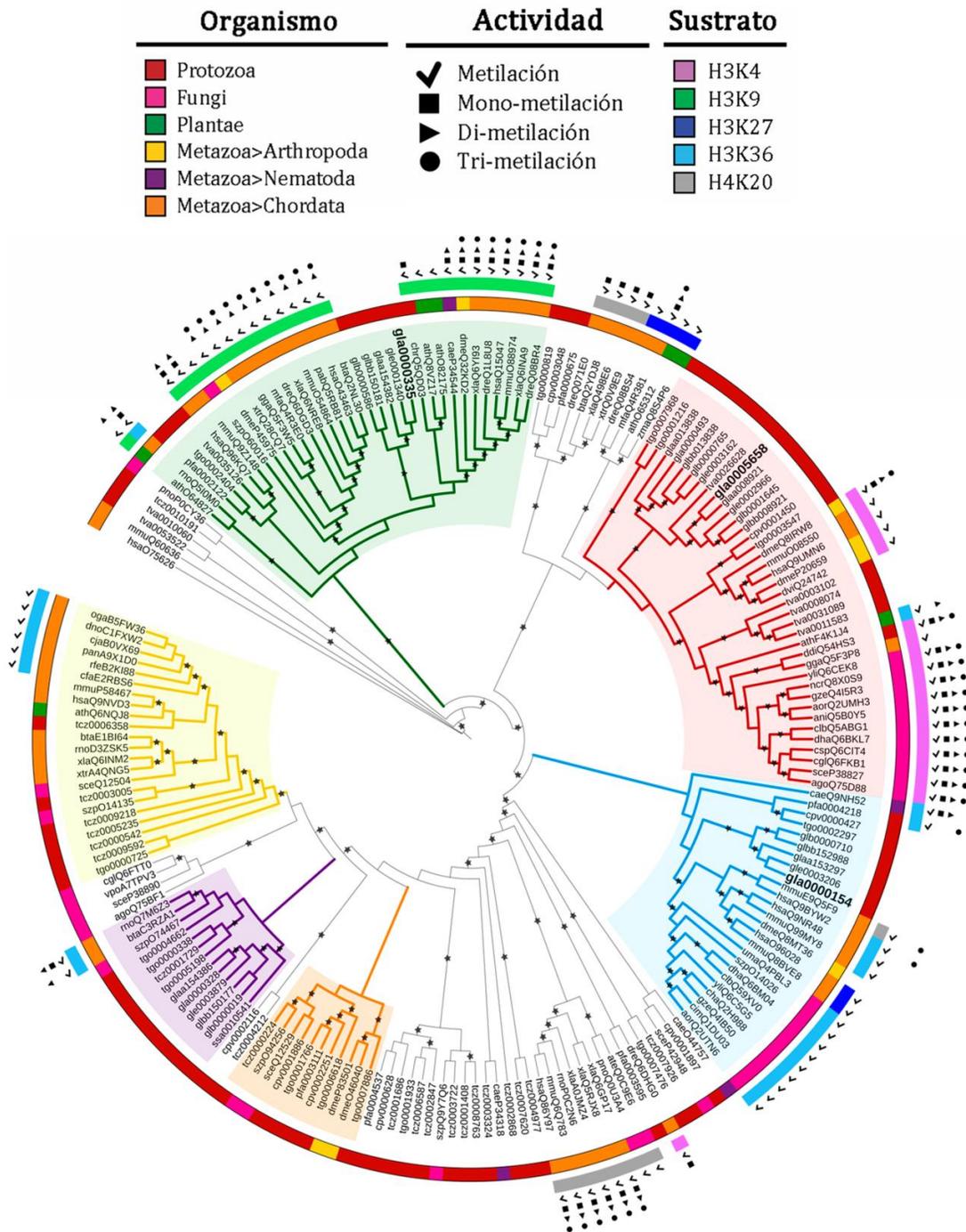


Figura 2.1: Análisis filogenético entre proteínas que contienen el dominio SET. Reconstrucción filogenética por máxima verosimilitud (ML) de las secuencias obtenidas utilizando PhyML, con aLRT (del inglés, *approximate likelihood-ratio test*), y 100 *bootstraps*. El conjunto de HMTs hipotéticas de *G. lamblia* fue obtenido utilizando HMMER y el perfil SET de Pfam contra proteomas de *G. lamblia*. Seis clusters de secuencias filogenéticamente relacionadas (representados por colores pasteles ubicados dentro del árbol) fueron obtenidas por implementación HMMerCTTer y SDPfox. El anillo interno corresponde a la clasificación taxonómica descrita como “organismo”. El anillo externo muestra sobre qué lisina (K) de qué histona (H) actúa cada proteína, descrito como “sustrato”. Los símbolos externos muestran el grado de metilación que cataliza cada proteína (de acuerdo a la base de datos) descrita como “actividad”.

Además, los agrupamientos muestran los posibles sustratos específicos de las enzimas, por lo que es posible predecir la función de estas proteínas hipotéticas utilizando información de secuencias en el mismo grupo. De manera interesante, GHMT1 pertenece a un agrupamiento en donde su posible sustrato sería la lisina 36 de la histona H3 (**Figura 2.2A**), GHMT2 está localizada en otro clado junto con proteínas que metilan la lisina 9 de la histona H3 (**Figura 2.2B**), mientras que G1SET2 se encuentra en un clado en donde la mayoría de las proteínas muestra metilación de lisina 4 de la histona H3 (**Figura 2.2C**).

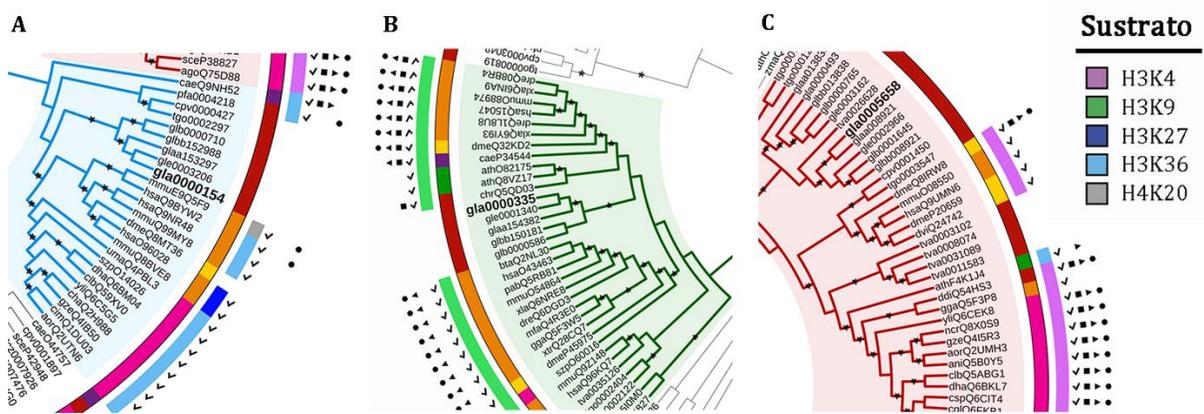


Figura 2.2: Ubicación filogenética de las diferentes GIHMTs. A) GHMT1 (gla0000154) se agrupa en un clado junto con proteínas histona metiltransferasas que metilan la lisina 36 de la Histona H3 (H3K36). **B)** GHMT2 (gla0000335) se agrupa con proteínas que metilan la lisina 9 de la Histona H3 (H3K9). **C)** G1SET2 (gla0005658) se agrupa con proteínas que metilan la lisina 4 de la Histona H3 (H3K4).

II. ii.1.1 *G. lamblia* HMT1

El alineamiento múltiple de secuencias de miembros de la familia con dominio SET mostró un alto nivel de similitud entre la secuencia de GHMT1 y HMTs de diferentes especies como *H. sapiens* (hsa), *M. musculus* (mmu), *D. melanogaster* (dme), *T. gondii* (tgo), *C. parvum* (cpv), *Schizosaccharomyces pombe* (szp), entre otros (**Figura 2.3A**). Tanto el dominio clásico catalítico SET, el cual está caracterizado por la presencia de cuatro dominios conservados (GXG, YXG, NHXCXPN, y ELXFDY) y que constituye el sitio activo, así como una región rica en cisteína (post-SET) (**Figura 2.3B**), están conservados en todos los ensamblajes de *G. lamblia*.

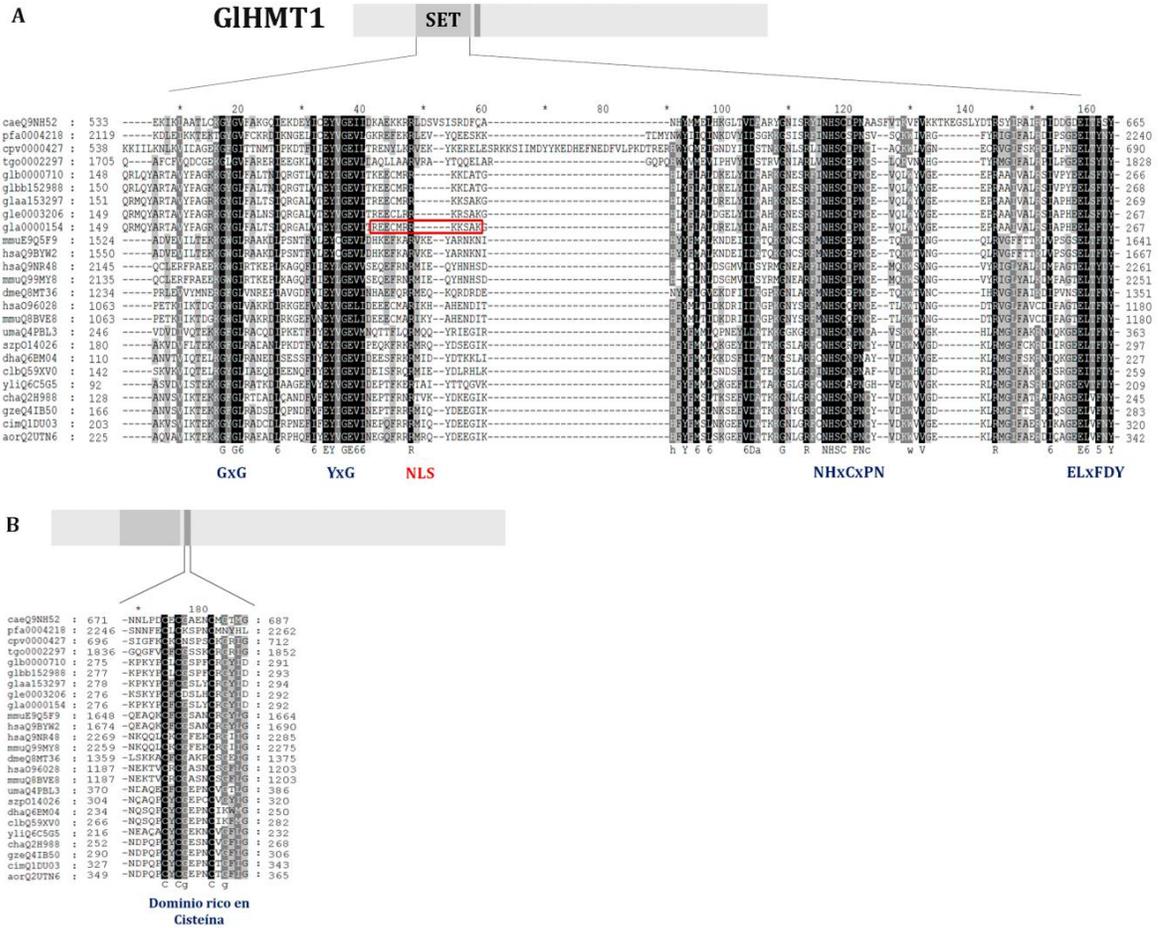


Figura 2.3: Análisis comparativo de proteínas HMTs. Alineamiento múltiple de secuencias basados en la estructura secundaria de HMT1 de *G. lamblia* (Ensamblajes A, A2, B, B2, E) contra HMTs de diferentes organismos. El dominio SET se muestra en la parte superior (A), y el dominio post-SET en la parte inferior (B). En el dominio SET se muestran los cuatro dominios conservados (GXG, YxG, NHXCXPN, ELXFDY) que constituyen los sitios activos, así como la señal de localización nuclear (NLS, rectángulo rojo). En el dominio post-SET se muestra la región rica en cisteína. En negro se muestran los residuos idénticos entre las respectivas secuencias, sombreado oscuro a claro residuos similares. Los alineamientos de secuencias múltiples se realizaron con la versión MAFFT en línea, con la configuración predeterminada.

Por otro lado, se realizó la predicción de la estructura 3D de GIHMT1 (servidor I-TASSER) en donde se puede observar tanto el dominio SET y postSET, así como los motivos de localización nuclear (NLS), los cuales se encuentran expuestos (**Figura 2.4A**). El modelado 3D de GIHMT1 fue construido y comparado por alineamiento estructural con la estructura de ASH1L de humanos obtenida del banco de datos de proteínas (código *PDB* 3OPE) (37,77% I, 59,11% S; **Anexo I**), mostrando una alta superposición entre estructuras homólogas (**Figura 2.4B**).

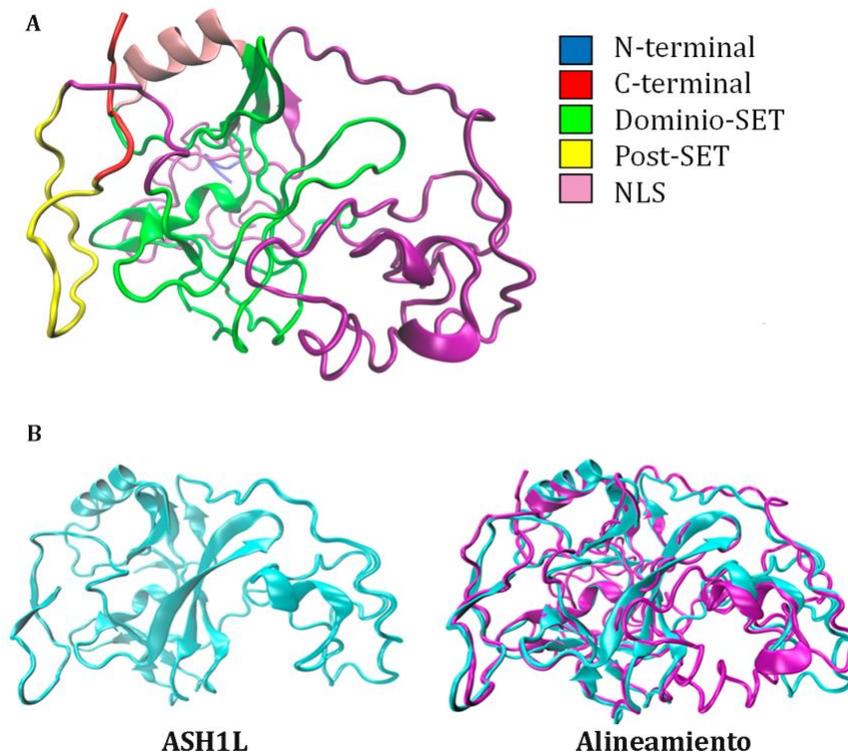


Figura 2.4: GIHMT1 y ASH1L de *H. sapiens*. **A)** Predicción de la estructura 3D de GIHMT1. Los análisis estructurales se realizaron prediciendo la estructura 3D de la proteína codificada por el gen GL50803_9130 utilizando tres servidores, I-TASSER, Phyre2 y RaptorX. La predicción de las NLS fue realizada por cNLS Mapper y NucPred. **B)** La estructura de GIHMT1 (en púrpura) se alineó con la estructura ASH1L (en cian), obtenida del banco de datos de proteínas (3OPE).

Con el fin de investigar si existían proteínas hipotéticas asociadas directamente a GIHMT1, se analizó una red de interacción proteína-proteína predicha para esta enzima. Las secuencias fueron obtenidas utilizando la versión STRING con homólogos

de *G. lamblia* adaptada por nuestro grupo (Zamponi N. *et al*, resultados no publicados). Este servidor establece una red de proteínas en función del interactoma para los distintos organismos. En esta red, se observaron diversas proteínas dentro de los cuales se encuentran proteínas quinasas, proteínas de unión al complejo retrómero, proteínas hipotéticas, entre otras. De manera interesante, se encontró una ARN polimerasa dirigida por ADN (GIRBP1-3, del inglés *RNA-Binding-Proteins* o proteínas de unión con ARN), parte del complejo que cataliza la síntesis de ARN utilizando ADN como molde. Además, se encontró que GIHMT1 podría interactuar con una HDAC (histona deacetilasa independiente de NAD⁺) y con HMT2, dos enzimas modificadoras de la cromatina que podrían estar involucradas en la regulación de GIHMT1 (Figura 2.5).

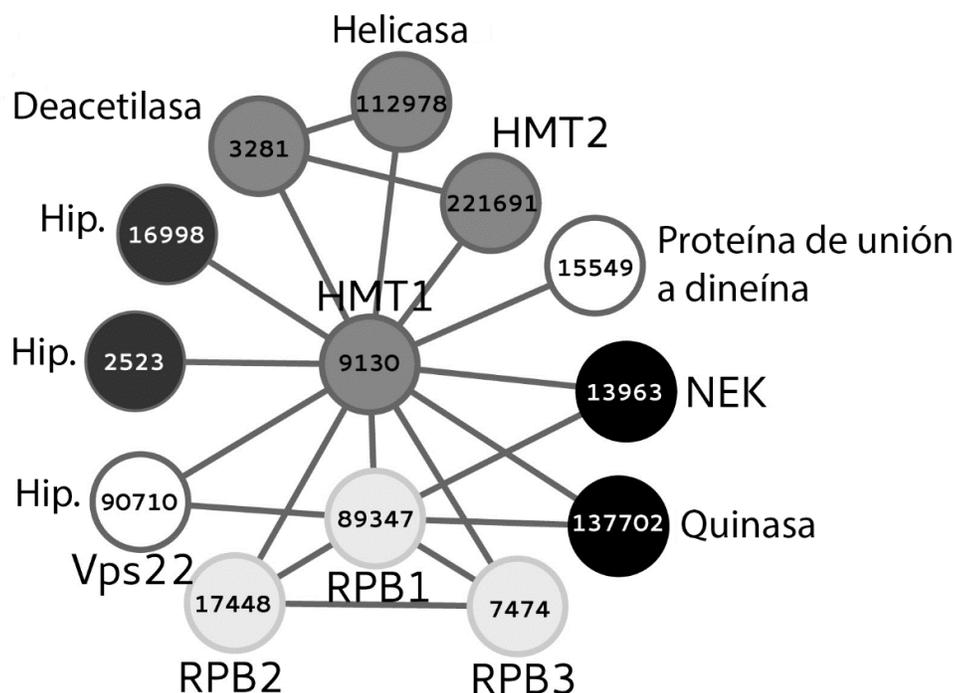


Figura 2.5. Red de interacciones proteína-proteína de GIHMT1. Las interacciones se predijeron combinando el enfoque de Interlog (Zamponi *et al* resultados no publicados) e información recuperada de la base de datos STRING. Solo fueron consideradas interacciones validadas experimentalmente con puntajes superiores a 900; (STRING v10: redes de interacción proteína-proteína, integradas a lo largo del árbol de la vida). 9130: Histona metiltransferasa-1; 112978: Proteína de unión a ADN-helicasa cromodominio; 3281: Histona deacetilasa; 16998: Proteína hipotética; 2523: Proteína hipotética; 90710: Proteína hipotética; 17448: ARN polimerasa dirigida por ADN; 89347: Subunidad mayor de ARN polimerasa II dirigida por ADN; 7474: ARN polimerasa dirigida por ADN; 137702: Quinasa; 13963: Quinasa; 15549: Proteína de unión a dineína; 221691: Histona metiltransferasa-2.

II. ii. 1.1.1 Sobre-expresión de la proteína HMT1 en *G. lamblia*

Con el objetivo de evaluar el rol de la proteína HMT1 en *G. lamblia*, se generó un constructo que expresa HMT1-HA conteniendo tres epítopes de hemaglutinina (HA) en el extremo C-terminal bajo el promotor constitutivo de tubulina (células *glhmt1-ha*) y además, bajo su promotor endógeno (células *glehmt1-ha*). Para ello se amplificó el gen *hmt1* utilizando cebadores específicos, se purificó el producto de PCR de 897 pb y se clonó el gen que codifica para la proteína a sobre-expresar en el vector de expresión pTubApa-H7-HApac, de modo de obtener una fusión transcripcional/transduccional con el residuo HA.

Posteriormente, se transfectaron trofozoítos de la cepa WB/1267 con los plásmidos secuenciados glHMT1-HA y gleHMT1-HA obteniendo poblaciones celulares policlonales que expresan de manera estable a la proteína de interés. Los ensayos de western blot utilizando un anticuerpo monoclonal (Acm) anti-HA para identificar la proteína GlHMT1 revelaron una banda proteica correspondiente a ~34 kDa, confirmando la fusión entre glHMT1 y gleHMT1 con HA (**Anexo IV.A-B**).

II. ii. 1.1.1.1 GlHMT1 es una proteína nuclear y citoplasmática durante el crecimiento de *G. lamblia*

A fines de determinar la localización subcelular de glHMT1-HA, se realizaron estudios de localización de GlHMT1 en trofozoítos transgénicos *glhmt1-ha*. La sobreexpresión de glHMT1-HA mostró en la mayoría de las células una localización tanto nuclear como perinuclear y citoplasmática, por ensayos de inmunofluorescencia (IFA) y microscopía confocal (**Figura 2.6**). Bajo su promotor endógeno, gleHMT1-HA mostró un patrón similar, aunque la marca fue más discreta, mostrando principalmente localización perinuclear en dominios. La localización nuclear de GlHMT1, que se superpone con el ADN teñido con DAPI y la tinción de ambos núcleos, sugiere que la cromatina podría ser modificada por esta enzima y a su vez es consistente con la presencia de NLS en su secuencia (**Figura 2.3A**).

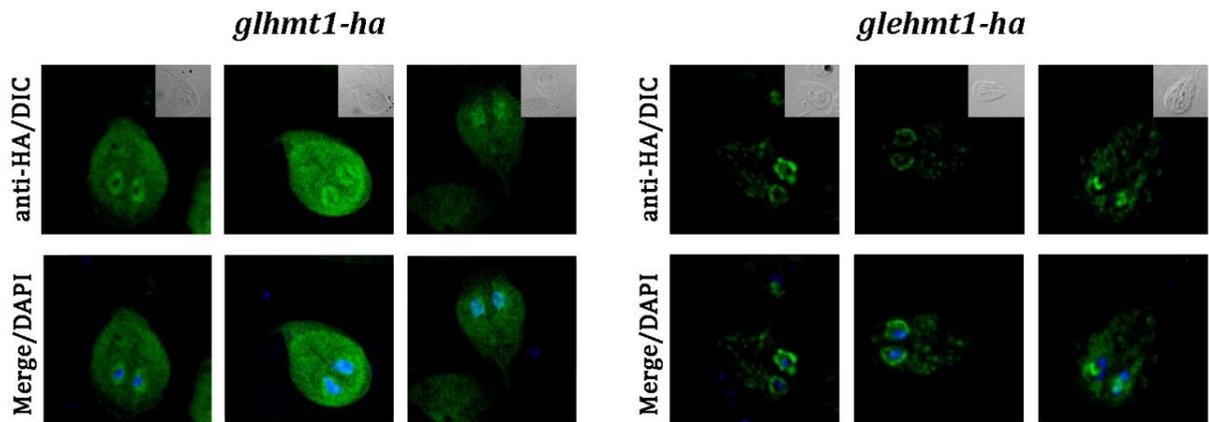


Figura 2.6: Localización de la proteína GHMT1 durante el crecimiento de *G. lamblia*. Ensayos de IFA utilizando microscopía confocal. GHMT1-HA y GleHMT1-HA fueron marcados con Acm anti-HA conjugado con Alexa-488 (verde) en trofozoítos transgénicos *glhmt1-ha* y *glehmt1-ha*. Los núcleos fueron teñidos con DAPI (azul). Los insertos muestran microscopía de contraste de interferencia diferencial (DIC).

II. ii. 1.1.1.2 La sobre-expresión de GHMT1 no afecta el crecimiento celular

Para analizar si la sobre-expresión de GHMT1 modifica el crecimiento celular de *G. lamblia*, se realizaron curvas de crecimiento en comparación a la cepa salvaje *wt* (del inglés, *wild type*). Al evaluarse el número de trofozoítos a distintos tiempos durante 72 horas, tanto para *glhmt1-ha* como para *glehmt1-ha*, no se observaron diferencias significativas en la tasa de crecimiento con respecto al control (**Figura 2.7**). Se puede considerar entonces que la sobre-expresión de esta proteína no tendría un impacto durante el crecimiento de *G. lamblia*.

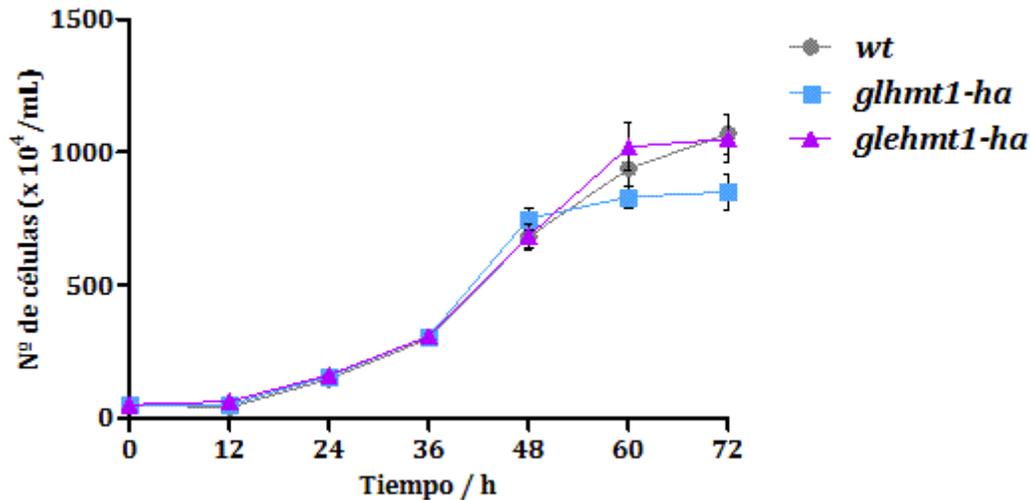


Figura 2.7: Crecimiento de trofozoítos transgénicos *glhmt1-ha* y *glehmt1-ha*. Una cantidad aproximada a 5×10^5 trofozoítos de las cepas *wt*, *glhmt1-ha* y *glehmt1-ha* fueron inoculados con medio de crecimiento y el número de células viables fue determinado cada 12 horas utilizando azul de tripan.

II. ii. 1.1.1.3 Participación de GHMT1 durante el enquistamiento de *G. lamblia*

Como se describió previamente, el enquistamiento en *G. lamblia* es un proceso que implica complejos cambios moleculares y morfológicos de los trofozoítos en respuesta a la deprivación de colesterol en la última regiones del intestino delgado (Lujan et al., 1996a). Este evento gatilla la síntesis de CWPs que, una vez transportadas hacia la membrana plasmática en ESVs, se liberan formando la pared del quiste (Gillin et al., 1996).

Resultados previos sugieren que algunas modificaciones post-traduccionales, como la acetilación y metilación, estarían involucradas en el proceso de enquistamiento y en la formación del quiste (Carranza et al., 2016; Sonda et al., 2010).

Por otra parte, durante el enquistamiento de *G. lamblia*, se han encontrado patrones periódicos en la expresión génica de histona deacetilasa, histona metiltransferasa e histona acetiltransferasa (Einarsson et al., 2016).

A continuación se detallan diferentes análisis llevados a cabo para evaluar si GHMT1 tiene alguna implicancia sobre el proceso de enquistamiento. En primera

instancia, se estudió la expresión de *hmt1* en células *wt* y luego, en trofozoítos transgénicos *glhmt1-ha*, la producción de quistes, la expresión de los genes específicos del enquistamiento y la localización de la enzima a lo largo de este proceso.

II. ii. 1.1.1.3.1 La expresión de *hmt1* aumenta al inicio del enquistamiento

Para evaluar si GHMT1 tiene algún impacto sobre el proceso de enquistamiento, se realizó un análisis de la expresión temporal del gen *hmt1* mediante PCR en tiempo real en trofozoítos *wt* a diferentes tiempos de enquistamiento. En la **Figura 2.8** se puede observar un incremento significativo en la expresión del ARNm de *hmt1* a las 6 horas post-inducción (h.p.i.) del proceso de enquistamiento, sin embargo los valores de expresión decayeron después de las 24 horas. Este hallazgo sugiere un posible rol de GHMT1 al comienzo del proceso de enquistamiento.

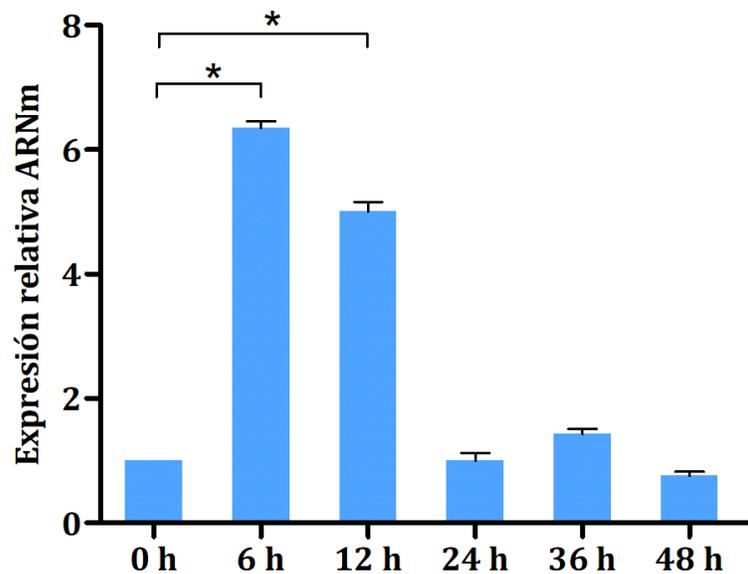


Figura 2.8: Expresión relativa de *hmt1* durante el enquistamiento en células *wt*. Análisis de la expresión génica de *hmt1* mediante ensayos de PCR en tiempo real en trofozoítos *wt* a las 0, 6, 12, 24, 36 y 48 h de enquistamiento, utilizando cebadores específicos para *hmt1*. Los niveles de transcritos fueron normalizados a los niveles de ARN del gen *18S* (ARNr). El cambio en la abundancia de la expresión del ARNm fue relativizado a los niveles del transcripto en células *wt* ($\Delta\Delta Ct$). Referencia: *, $p < 0.05$, con respecto al valor de normalización (*wt*).

II. ii. 1.1.1.3.2 GIHMT1 interviene en el proceso de enquistamiento

Para evaluar si la sobre-expresión de GIHMT1 alteraba el proceso de enquistamiento, se analizó la producción de quistes en células *glhmt1-ha* y *wt* durante un período de 48 horas. Luego de 36 h.p.i, el número el número de quistes fue significativamente mayor en células transfectadas *glhmt1-ha* con respecto a células *wt* y esta diferencia fue aún mayor a las 48 h.p.i. (Figura 2.9).

A su vez, se observó por microscopia de inmunofluorescencia que la localización de la enzima durante todo el proceso de enquistamiento fue similar a la encontrada durante la fase de crecimiento, en donde además no se observó colocación de la enzima con las vesículas específicas del enquistamiento (ESVs) (Manders 0.53 ± 0.8) (Figura 2.10).

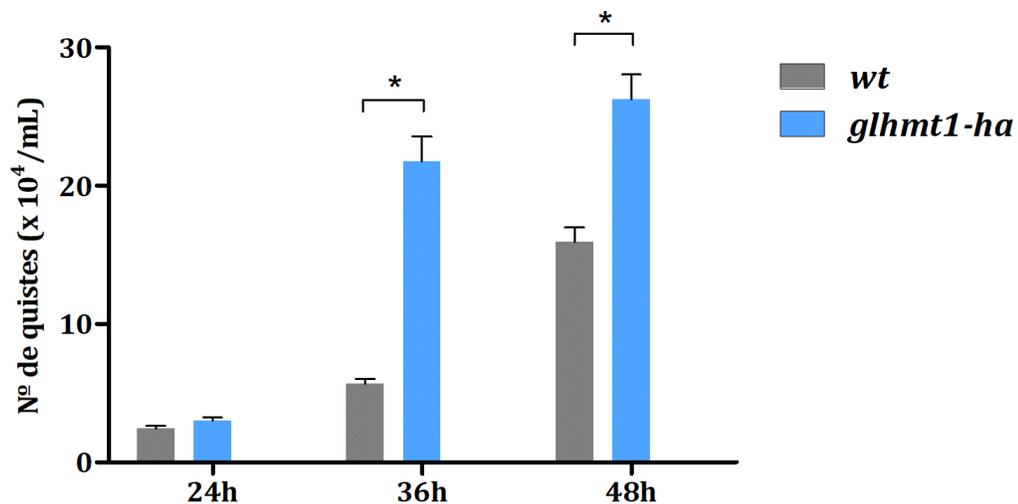


Figura 2.9: Enquistamiento de células transgénicas *glhmt1-ha*. Una cantidad aproximada de $2,5 \times 10^5$ trofozoítos de las cepas *glhmt1-ha* y *wt* fueron inoculados con medio de enquistamiento durante 48 horas. La producción de quistes fue analizada a las 24, 36 y 48 horas de enquistamiento. Referencia: *, $p < 0.05$, con respecto al control para ese tiempo.

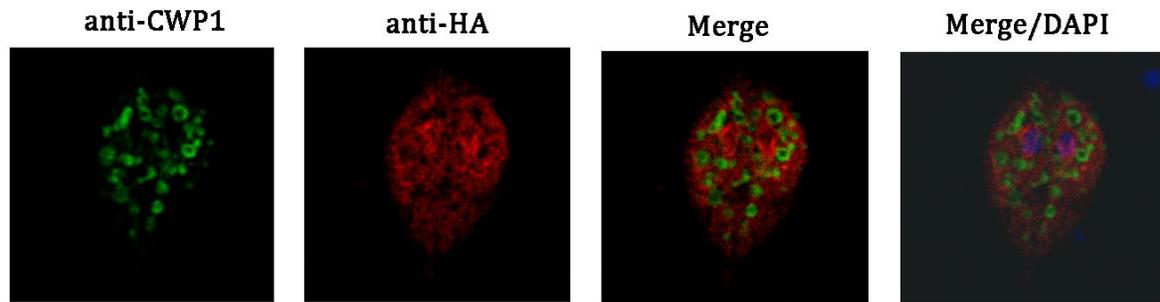


Figura 2.10: Localización de GHMT1 durante el proceso de enquistamiento. Se realizaron ensayos de IFA utilizando microscopía confocal de células *glhmt1-ha* a las 36 h de enquistamiento. GHMT1-HA fue marcado con Acm anti-HA conjugado con Texas Red-586 (rojo); CWP1 fue marcado con Acm anti-CWP1 conjugado con FITC (verde). Los núcleos fueron teñidos con DAPI (azul).

II. ii. 1.1.1.3.3 GHMT1 es un potenciador del proceso de enquistamiento

Para entender la participación de GHMT1 a lo largo del proceso de enquistamiento, se realizaron ensayos de IFA utilizando un anticuerpo contra una de las proteínas que participa en la formación de la pared del quiste (CWP1) como indicador de la progresión de este proceso. Debido a que el proceso de enquistamiento no es un evento sincronizado, se observaron tanto trofozoítos (T) que aún no han ingresado en este proceso como células que se encuentran en distintos estadios de enquistamiento (E). Dichos estadios pueden ser células en enquistamiento temprano (E1), células en enquistamiento tardío (E2) y quistes (Q). E1 corresponde a parásitos enquistando con un pequeño número y tamaño de ESVs conteniendo CWPs, E2 corresponde a parásitos enquistando con alta cantidad de ESVs de mayor tamaño, y Q corresponde a quistes formándose o quistes maduros con CWP1 marcando la superficie celular. En el panel superior derecho de la **Figura 2.11** se muestra, a modo de ejemplo, una célula en E1, E2 y Q.

Se encontró que en trofozoítos transgénicos *glhmt1-ha* había mayor cantidad de células en el estadio E1 a las 24 h.p.i. que en células *wt* (**Figura 2.11A**). Este hallazgo fue aún más evidente a las 36 h.p.i., en donde la mayoría de las células transfectadas *glhmt1-ha* se encontraban en E1 y E2, mientras que la mayoría de las células *wt* se encontraban en el estadio T (**Figura 2.11B**). Finalmente, luego de 48 h.p.i., una mayor cantidad de quistes fue producida por células *glhmt1-ha* comparado con células *wt*, resultado similar a aquel observado en la Figura 2.9 (**Figura 2.11C**).

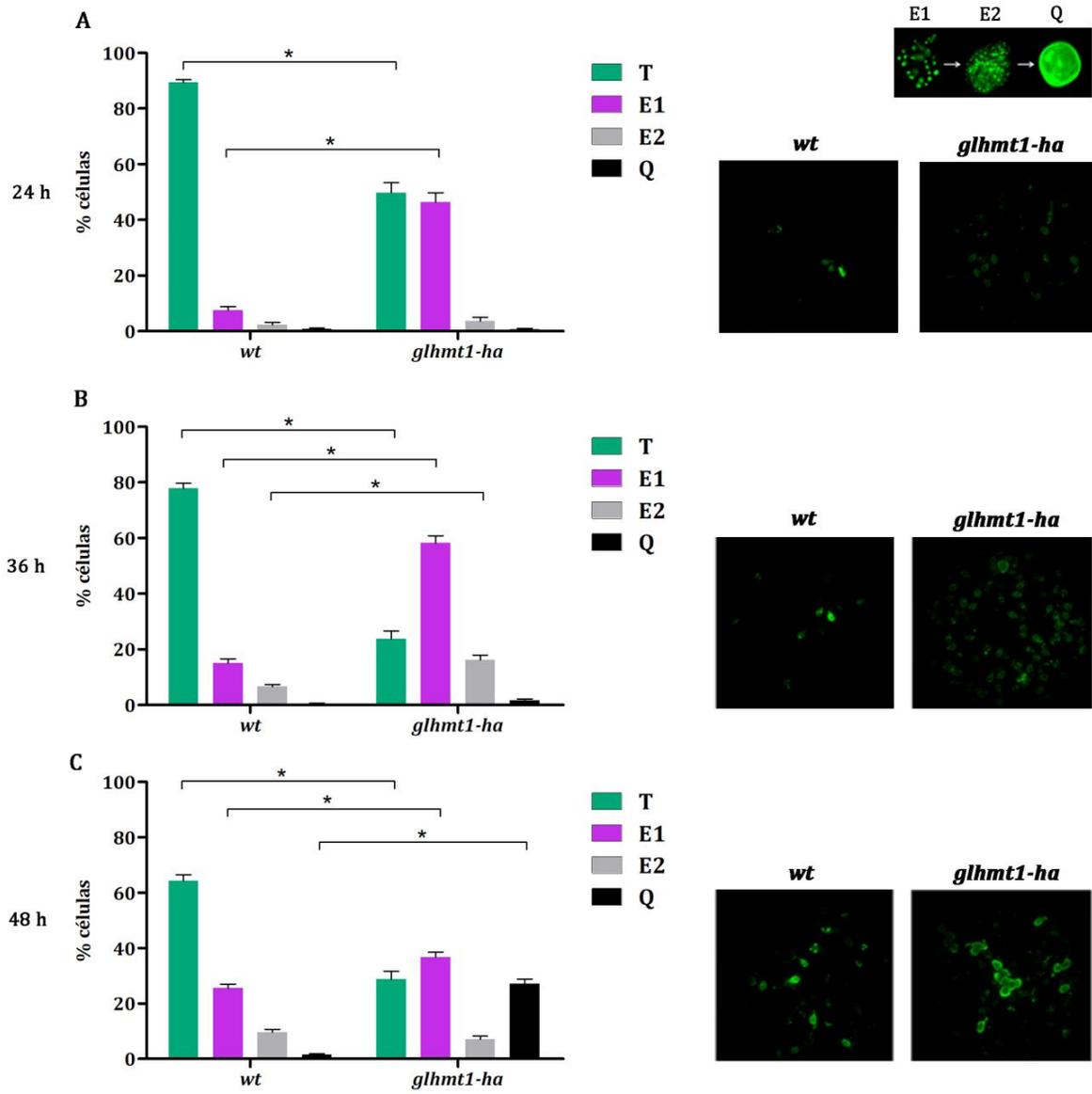


Figura 2.11: GIHMT1 como potenciador del proceso de enquistamiento. Porcentajes (promedio \pm SEM) de células *wt* y células transgénicas *glhmt1-ha* en diferentes estadios de enquistamiento: trofozoítos (T), enquistamiento temprano (E1), enquistamiento tardío (E2) y quistes (Q) analizados a diferentes tiempos de enquistamiento: **A)** 24 h; **B)** 36 h y **C)** 48 h. En cada uno de los tiempos, las células fueron tratadas con Acm anti-CWP1 conjugado con FITC (verde) y analizadas por microscopia de epifluorescencia como se muestra en los paneles derechos. Referencia: *, $p < 0.05$, con respecto al control para ese tiempo.

Por otra parte, se analizó si el incremento en la producción de quistes en *glhmt1-ha* estaba relacionado con un aumento en la abundancia de los transcritos de ARNm de las CWPs, las cuales son las principales proteínas que forman la pared del quiste, y el factor de transcripción Myb1-like protein, que ha sido indicado como regulador clave del proceso de enquistamiento. Se realizaron ensayos de PCR en tiempo real en células *glhmt1-ha* y en células *wt*. Los cambios en la abundancia del ARNm se expresaron como la relación entre los niveles de transcritos en células *glhmt1-ha* y *wt*. Se observó que la cinética de expresión del ARNm de *cwp1* mostró un pico muy temprano durante el enquistamiento, similar al gen *myb-1 like protein* que codifica para el factor de transcripción Myb1-like protein (**Figura 2.12**). Por otro lado, *cwp2* y *cwp3* mostraron un incremento en su expresión luego de las 6 h.p.i. y 12 h.p.i. respectivamente. A las 24 h.p.i., la expresión del transcritos de todas las proteínas decae, lo cual es necesario para completar el proceso de enquistamiento del parásito. Por lo tanto, se puede concluir que GLHMT1 tiene un rol crítico durante el proceso de enquistamiento en la regulación de la expresión de CWPs y en la producción de quistes.

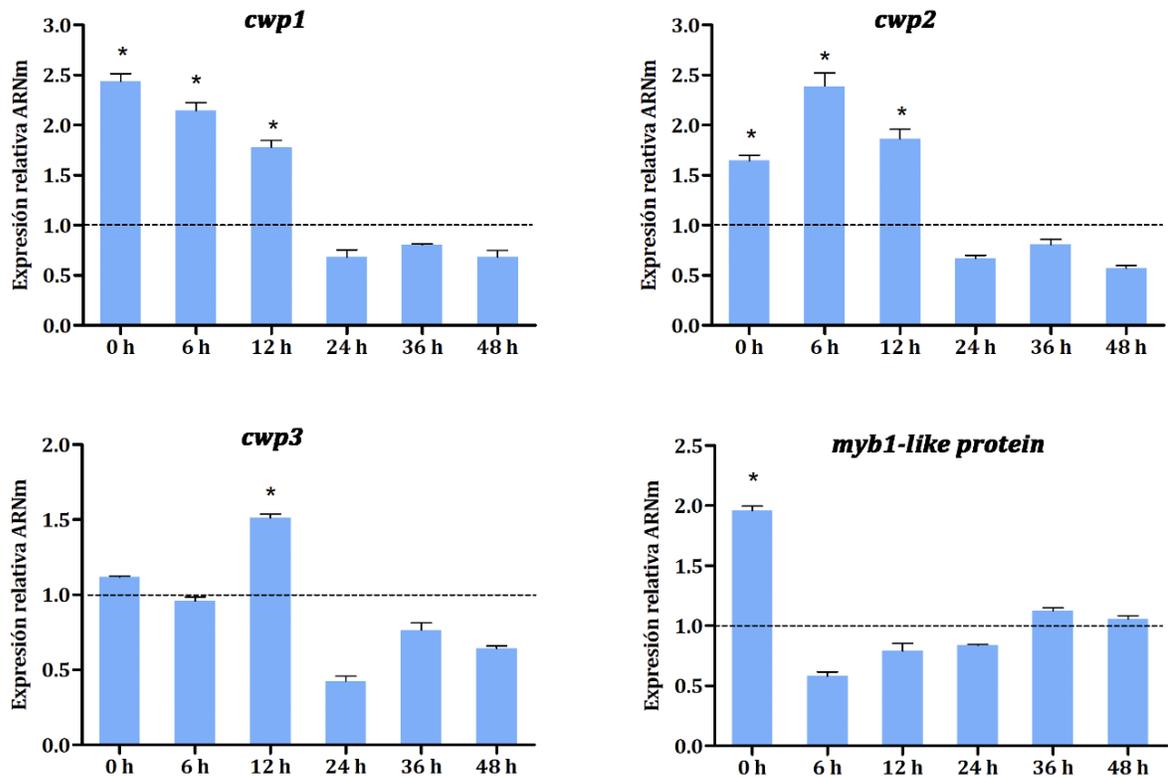


Figura 2.12: Expresión relativa de los genes específicos del enquistamiento en células *glhmt1-ha*. Análisis de la expresión génica de *cwp1-3* y *myb1-like protein* mediante ensayos de PCR en tiempo real en trofozoítos *glhmt1-ha* y *wt* a las 0, 6, 12, 24, 36 y 48 h de enquistamiento. Los niveles de transcritos fueron normalizados a los niveles de ARN del gen *18S* (ARNr). El cambio en la abundancia de la expresión del ARNm de cada gen en células *glhmt1-ha* fue relativizado a los niveles del transcrito en células *wt* (línea punteada). Referencia: *, $p < 0.05$.

II. ii. 1.1.2 El silenciamiento de GHMT1 produce una regulación negativa del proceso de enquistamiento

Con el fin de confirmar los resultados obtenidos referidos a la función de GHMT1 durante el proceso de enquistamiento, se realizó el silenciamiento de la enzima generando una cepa que expresa el anti-sentido de la secuencia del gen (células *glhmt1-as*). La disminución de la expresión de *hmt1* se corroboró por PCR en tiempo real en trofozoítos *glhmt1-as* (**Anexo V.A**).

Al inducir el proceso de enquistamiento y evaluar la producción de quistes luego de 48 h.p.i., se observó que el número de quistes fue significativamente menor en células *glhmt1-as* con respecto a células *wt*. (**Figura 2.13A**). Además, utilizando el Acm

anti-CWP1 por ensayos de IFA, se contabilizó el número de ESVs durante los primeros estadios del proceso de enquistamiento, y se encontraron un menor número de ESVs/célula en trofozoítos *glhmt1-as* comparado con trofozoítos *wt* (**Figura 2.13B**).

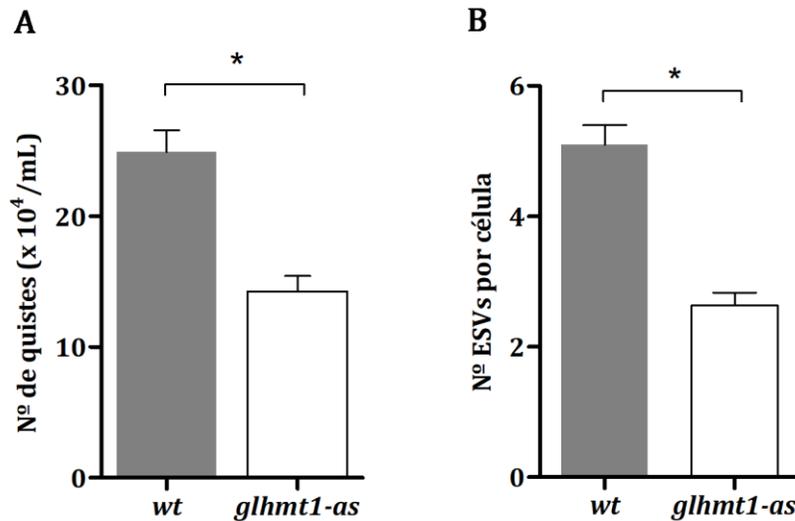


Figura 2.13: Efecto del silenciamiento de GHMT1 durante el proceso de enquistamiento. A) Producción de quistes cuantificada a las 48 h de enquistamiento en células *glhmt1-as* y *wt*. **B)** El número de ESVs/célula fue cuantificado a las 12 h de enquistamiento en células *glhmt1-as* y *wt*. Referencia: *, $p < 0.05$.

Finalmente, se evaluaron las diferencias en la abundancia del ARNm de los genes que codifican para CWP1-3 y Myb1-like protein en células *glhmt1-as*, y se encontró una disminución en los niveles de todos los ARNm evaluados, a diferentes tiempos de enquistamiento comparado con células *wt* (**Figura 2.14**). Por lo tanto, cuando la expresión de GHMT1 es reducida, ocurre una regulación negativa del proceso de enquistamiento, apoyando la idea de que GHMT1 está involucrada en la regulación positiva de los genes específicos del enquistamiento durante los primeros estadios del proceso.

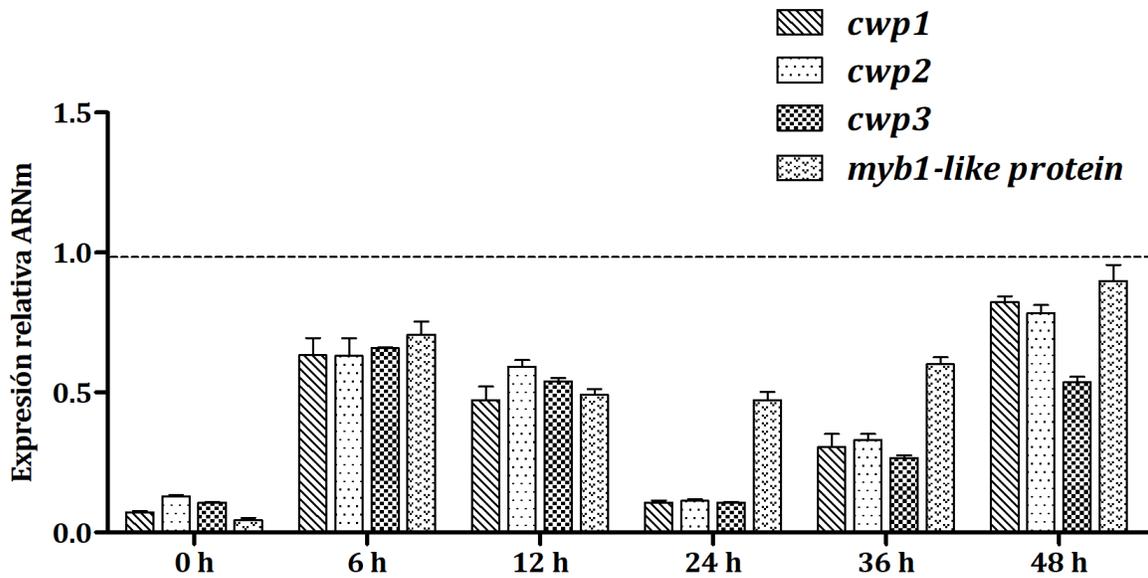


Figura 2.14: Efecto del silenciamiento de GlHMT1 durante el proceso de enquistamiento. Análisis de la expresión génica de *cwp1-3* y *myb1-like protein* mediante ensayos de PCR en tiempo real en trofozoítos *wt* y *glhmt1-as* a las 0, 6, 12, 24, 36 y 48 h de enquistamiento. Los niveles de transcritos fueron normalizados a los niveles de ARN del gen *18S* (ARNr). El cambio en la abundancia de la expresión del ARNm de cada gen en células *glhmt1-as* fue relativizado a los niveles del transcripto en células *wt* (línea punteada).

II. ii. 1.2 *G. lamblia* HMT2

II. ii. 1.2.1 Sobre-expresión de la proteína HMT2 en *G. lamblia*

Con el objetivo de estudiar la participación de la proteína HMT2 en *G. lamblia*, se generó un constructo que expresa HA-HMT2. Para ello se amplificó el gen *hmt2* utilizando cebadores específicos, se purificó el producto de PCR de 2034 pb y se clonó el gen que codifica para la proteína a sobre-expresar en el vector de expresión pTub-HA, el cual contiene un promotor de α 2-tubulina, la región 5' del gen β -giardina del parásito y se caracteriza además por expresar las proteínas con una etiqueta HA en el extremo amino terminal.

Trofozoítos de la cepa WB/1267 fueron transfectados establemente con el vector de expresión glHA-HMT2, generando una población policlonal de células *glhmt2-ha*. Los ensayos de western blot utilizando un Acm anti-HA para identificar la proteína GHMT2 revelaron una banda proteica correspondiente a ~76 kDa (**Anexo IV.C**).

II. ii. 1.2.1.1 GHMT2 es una proteína perinuclear y citoplasmática durante el crecimiento de *G. lamblia*

Con el fin de determinar la localización subcelular de glHA-HMT2, se realizaron estudios de localización de GHMT2 en trofozoítos transgénicos *glhmt2-ha*. La sobreexpresión de glHA-HMT2 mostró una localización tanto perinuclear y citoplasmática por ensayos de IFA utilizando microscopía confocal (**Figura 2.15**).

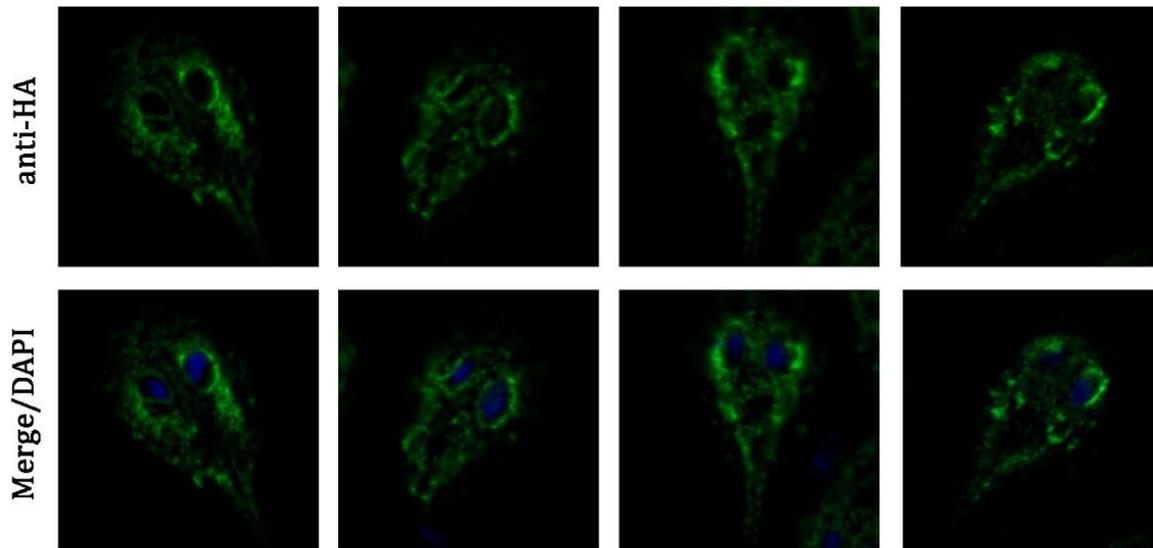


Figura 2.15: Localización de la proteína GHMT2 durante el crecimiento de *G. lamblia*. Ensayos de IFA utilizando microscopía confocal. GIHA-HMT2 fue marcado con Acm anti-HA conjugado con Alexa-488 (verde) en trofozoítos transgénicos *glhmt2-ha*. Los núcleos fueron teñidos con DAPI (azul).

II. ii. 1.2.1.2 Participación de GHMT2 durante el enquistamiento de *G. lamblia*

Para estudiar la expresión temporal de *hmt2* en trofozoítos *wt* a diferentes tiempos de enquistamiento, se realizaron ensayos de PCR en tiempo real. En la **Figura 2.16** se puede observar un incremento significativo en la expresión del ARNm de *hmt2* a las 12 h.p.i. Este aumento se hace más evidente a las 36 h.p.i., sin embargo su expresión disminuye hacia las 48 h.p.i.

Para evaluar si la sobre-expresión de GHMT2 alteraba el proceso de enquistamiento, se analizó la producción de quistes en células *glhmt2-ha* a las 24 y 48 horas de enquistamiento. En ambos períodos, se observó un aumento significativo del número de quistes producidos en células *glhmt2-ha* con respecto a las células control. (**Figura 2.17**).

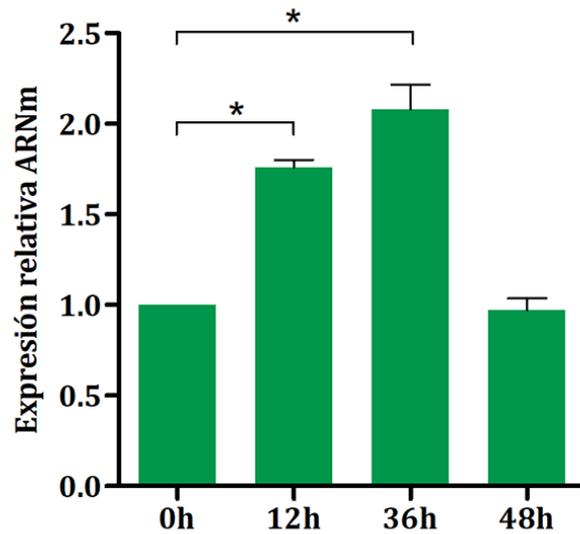


Figura 2.16. Expresión relativa de *hmt2* durante el enquistamiento en células *wt*. Análisis de la expresión génica de *hmt2* mediante ensayos de PCR en tiempo real en trofozoítos *wt* a las 0, 12, 36 y 48 h de enquistamiento, utilizando cebadores específicos para *hmt2*. Los niveles de transcritos fueron normalizados a los niveles de ARN del gen *18S* (ARNr). El cambio en la abundancia de la expresión del ARNm fue relativizado a los niveles del transcripto en células *wt* ($\Delta\Delta Ct$). Referencia: *, $p < 0.05$, con respecto al valor de normalización (*wt*).

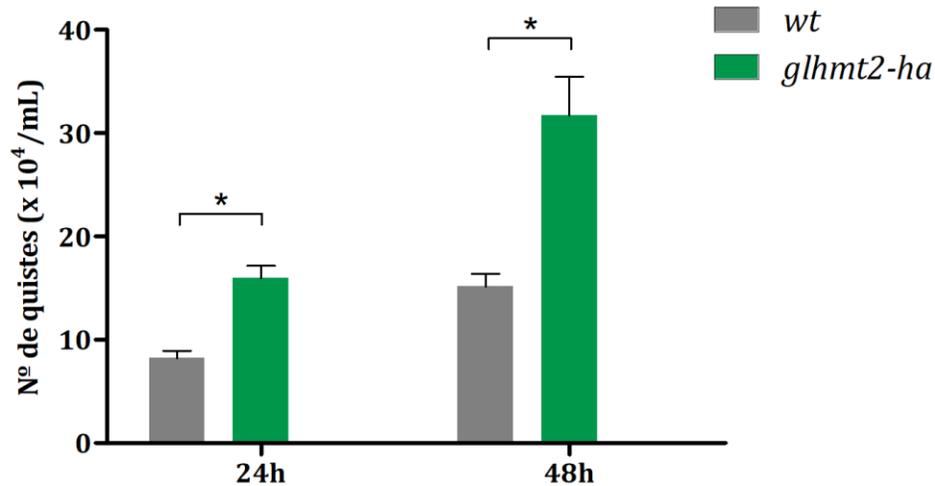


Figura 2.17: Enquistamiento de células transgénicas *glhmt2-ha*. Una cantidad aproximada $2,5 \times 10^5$ trofozoítos *glhmt2-ha* y *wt* fueron inoculados con medio de enquistamiento durante 48 horas. La producción de quistes fue analizada a las 24 y 48 horas de enquistamiento. Referencia: *, $p < 0.05$, con respecto al control para ese tiempo.

Por ensayos de IFA se observó que al inicio del enquistamiento la localización de la enzima GIHMT2 era idéntica a la observada durante la fase de crecimiento. Sin embargo, durante el desarrollo del enquistamiento, se va perdiendo la localización perinuclear tornándose exclusivamente citoplasmática (**Figura 2.18**).

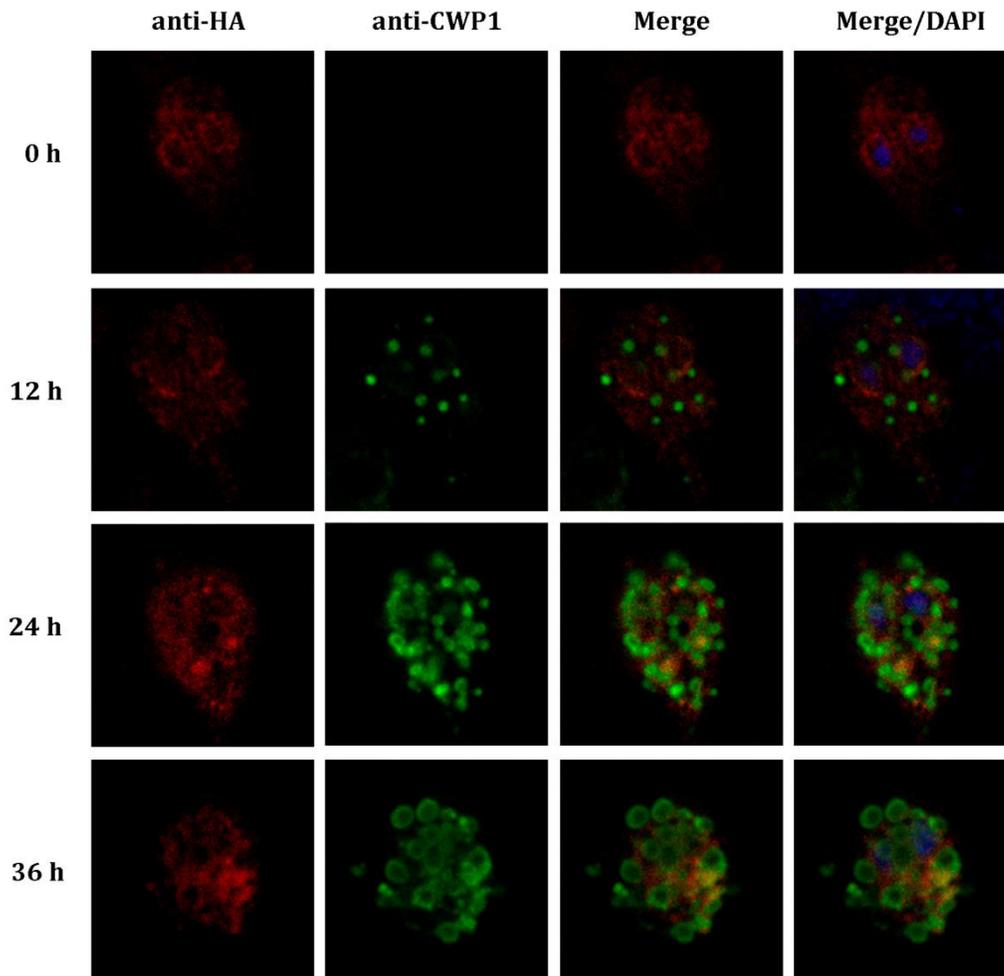


Figura 2.18: Localización de GIHMT2 durante el proceso de enquistamiento de *G. lamblia*. Ensayos de IFA utilizando microscopía confocal en células *glhmt2-ha* a las 0, 12, 24 y 36 h de enquistamiento. GIHA-HMT2 fue marcado con Acm anti-HA conjugado con Alexa-546 (rojo); CWP1 fue marcado con Acm anti-CWP1 conjugado con FITC (verde). Los núcleos fueron teñidos con DAPI (azul).

II. ii. 1.2.2 Silenciamiento de GIHMT2

Con el fin de determinar si la disminución de la expresión de GIHMT2 tiene algún impacto durante el proceso de enquistamiento, se realizó el silenciamiento de la expresión del gen *hmt2* que codifica para la enzima GIHMT2, generando el anti-sentido de la secuencia del gen (células *glhmt2-as*). La disminución de la expresión de *hmt2* se corroboró por PCR en tiempo real en trofozoítos *glhmt2-as* (**Anexo V.B**).

Al inducir el proceso de enquistamiento y evaluar la producción de quistes, no se encontraron diferencias significativas luego de las 24 y 48 h.p.i en células transfectadas *glhmt2-as* con respecto a células *wt*. (**Figura 2.19**).

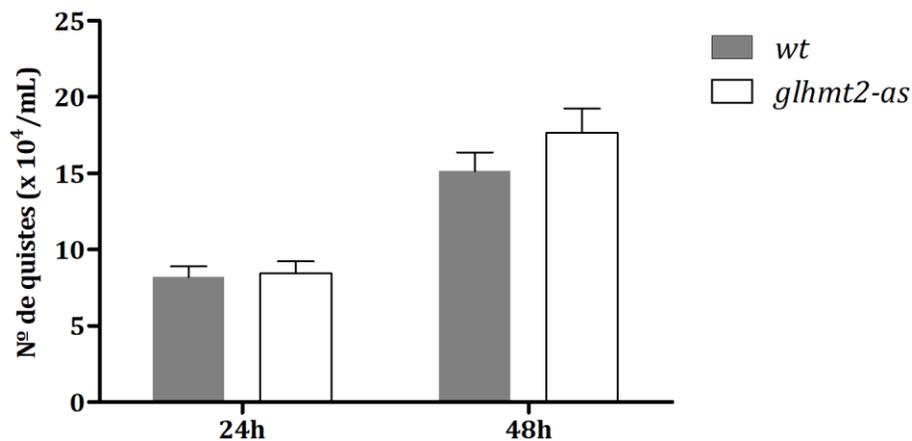


Figura 2.19: Efecto del silenciamiento de GIHMT2 durante el proceso de enquistamiento. Trofozoítos *wt* y *glhmt2-as* (aproximadamente $2,5 \times 10^5$) fueron inoculados en medio de enquistamiento. La producción de quistes fue analizada a las 24 y 48 h.

A partir de estos resultados se puede concluir que la enzima GIHMT2 tiene participación en el proceso de enquistamiento, ya que la expresión de su ARNm se ve aumentada a las 12 y 36 h.p.i. en trofozoítos *wt*. Por otro lado, la sobre-expresión de GIHMT2 estaría indicando una influencia positiva durante el proceso de enquistamiento, sin embargo, muy posiblemente no esté actuando como una enzima modificadora de histonas, ya que en ningún estadio se observa una localización nuclear de GIHMT2.

II. ii. 1.3 *G. lamblia* SET2

II. ii. 1.3.1 Sobre-expresión de la proteína SET2 en *G. lamblia*

Con el objetivo de estudiar la participación de la proteína SET2 en *G. lamblia*, se generó un constructo que expresa HA-SET2. Para ello se amplificó el gen *set2* utilizando cebadores específicos, se purificó el producto de PCR de 2079 pb y se clonó dicho gen en el vector de expresión pTub-HA.

Se transfectaron trofozoítos de la cepa WB/1267 con el plásmido secuenciado glHA-SET2, generando una población policlonal de células *glset2-ha*. Los ensayos de western blot utilizando un Acm glHA-SET2anti-HA para identificar la proteína G1SET2 revelaron una banda proteica correspondiente a ~76 kDa (**Anexo IV.D**).

II. ii. 1.3.1.1 G1SET2 es una proteína nuclear durante el crecimiento de *G. lamblia*

Con el fin de determinar la localización subcelular de glHA-SET2 durante el crecimiento, se realizaron estudios de localización de G1SET2 en trofozoítos transgénicos *glset2-ha*. La sobreexpresión de glHA-SET2 mostró una localización exclusivamente nuclear por ensayos de IFA utilizando microscopía confocal (**Figura 2.20**), la que se superpone con el ADN teñido con DAPI.

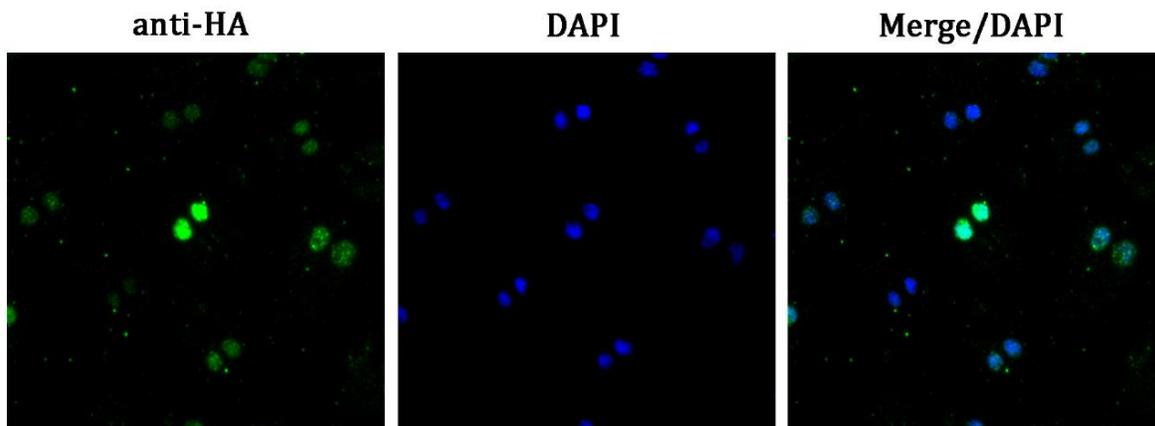


Figura 2.20: Localización de la proteína G1SET2 durante el crecimiento de *G. lamblia*. Ensayos de IFA utilizando microscopía confocal. GlHA-SET2 fue marcado con Acm anti-HA conjugado con Alexa-488 (verde) en trofozoítos transgénicos *glset2-ha*. Los núcleos fueron teñidos con DAPI (azul).

II. ii. 1.3.1.2 Participación de G1SET2 durante el enquistamiento de *G. lamblia*

Durante un análisis de la expresión temporal de *set2* mediante PCR en tiempo real en trofozoítos *wt* a diferentes tiempos de enquistamiento, se pudo observar un incremento significativo en la expresión del ARNm de *set2* a las 12 horas de inducido el proceso, y este aumento es más evidente a las 36 y 48 h.p.i (Figura 2.21).

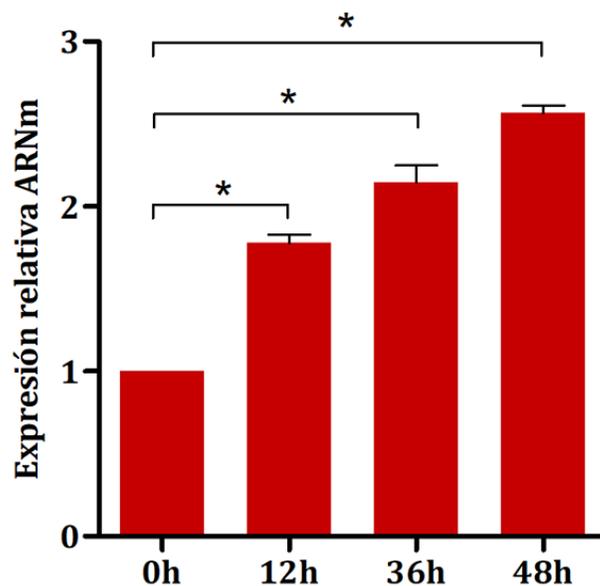


Figura 2.21. Expresión relativa de *set2* durante el enquistamiento en células *wild-type*. Análisis de la expresión génica de *set2* mediante ensayos de PCR en tiempo real en trofozoítos *wt* a las 0, 12, 36 y 48 h de enquistamiento, utilizando cebadores específicos para *set2*. Los niveles de transcritos fueron normalizados a los niveles de ARN del gen *18S* (ARNr). El cambio en la abundancia de la expresión del ARNm fue relativizado a los niveles del transcritos en células *wt* ($\Delta\Delta Ct$). Referencia: *, $p < 0.05$, con respecto al valor de normalización (*wt*).

Para evaluar si la sobre-expresión de G1SET2 altera el proceso de enquistamiento, se analizó la producción de quistes en células *glset2-ha* a las 24 y 48 horas de enquistamiento. Luego de las 24 h, no se observaron diferencias significativas en el recuento del número de quistes, sin embargo a las 48 h se observó una disminución de los mismos producidos en células transfectadas *glset2-ha* con respecto a las células control (Figura 2.22).

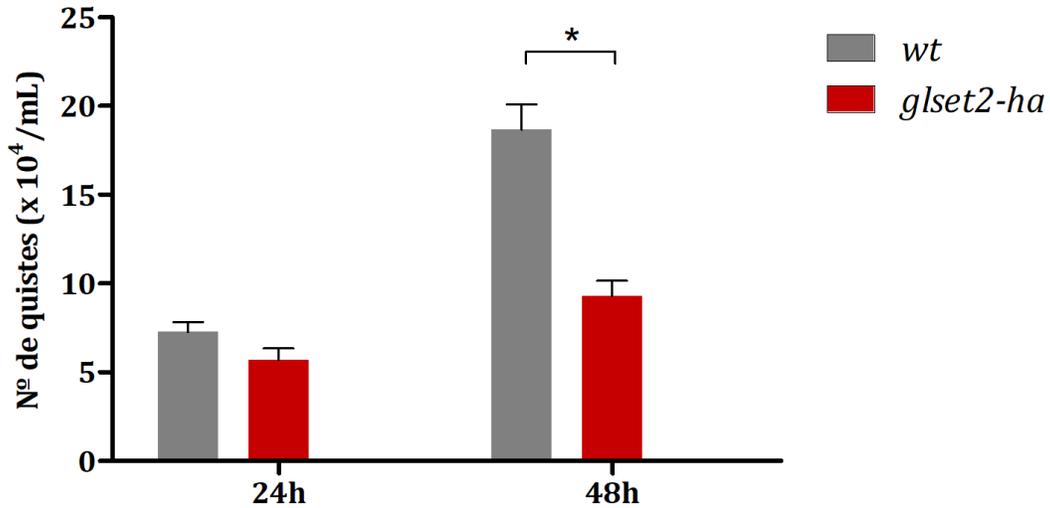


Figura 2.22: Enquistamiento de células transgénicas *glset2-ha*. Trofozoítos *glset2-ha* y *wt* (Aproximadamente $2,5 \times 10^5$) fueron inoculados con medio de enquistamiento durante 48 horas. La producción de quistes fue analizada a las 24 y 48 horas de enquistamiento. Referencia: *, $p < 0.05$, con respecto al control para ese tiempo.

A su vez, se observó por ensayos de IFA que la localización de la enzima G1SET2 durante todo el proceso de enquistamiento fue casi exclusivamente nuclear, conforme a la encontrada durante la fase de crecimiento (**Figura 2.23**).

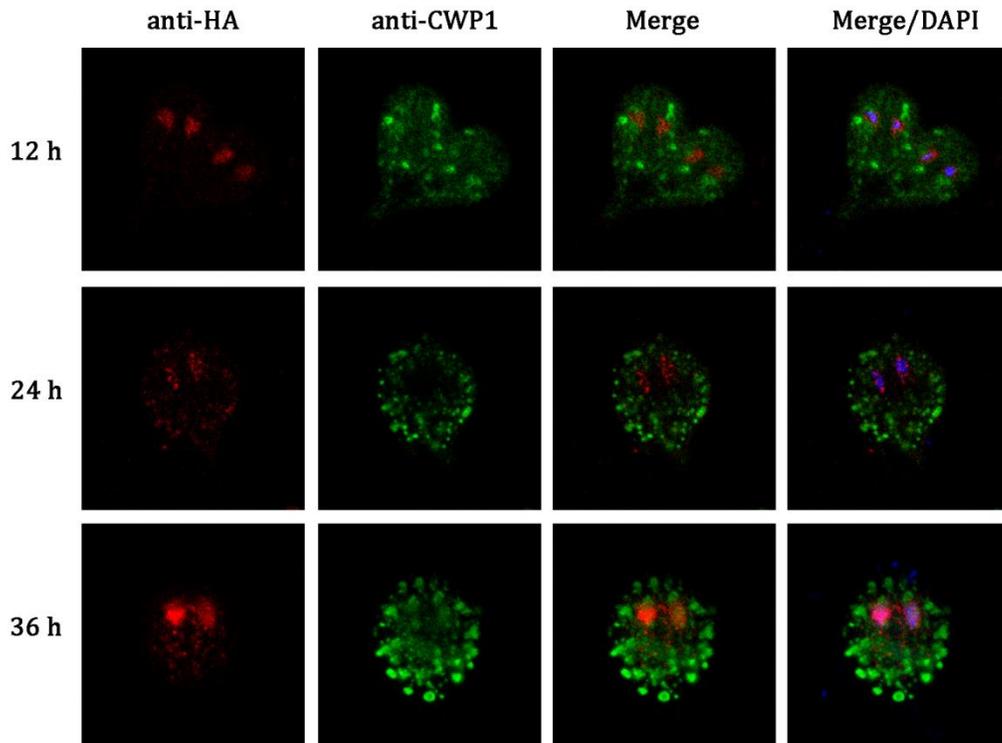


Figura 2.23: Localización de G1SET2 durante el proceso de enquistamiento de *G. lamblia*. Ensayos de IFA utilizando microscopía confocal de células *glset2-ha* a las 12, 24 y 36 h de enquistamiento. G1HA-SET2 fue marcada con Acm anti-HA conjugado con Alexa-546 (rojo); CWP1 fue marcado con Acm anti-CWP1 conjugado con FITC (verde). Los núcleos fueron teñidos con DAPI (azul).

II. ii. 1.3.2 Silenciamiento de G1SET2

Con el fin de investigar si la disminución de la expresión de G1SET2, tiene algún impacto durante el proceso de enquistamiento, se realizó el silenciamiento de la expresión del gen *set2* que codifica para la enzima G1SET2, generando el anti-sentido de la secuencia del gen (células *glset2-as*). La disminución de la expresión de *set2* se corroboró por PCR en tiempo real en trofozoítos *glset2-as* (**Anexo V.C**).

Al inducir el proceso de enquistamiento y evaluar la producción de quistes se encontraron diferencias significativas a las 48 h.p.i. El número de quistes producidos en células transfectadas *glset2-as* fue significativamente menor con respecto a células *wt*. (**Figura 2.24**).

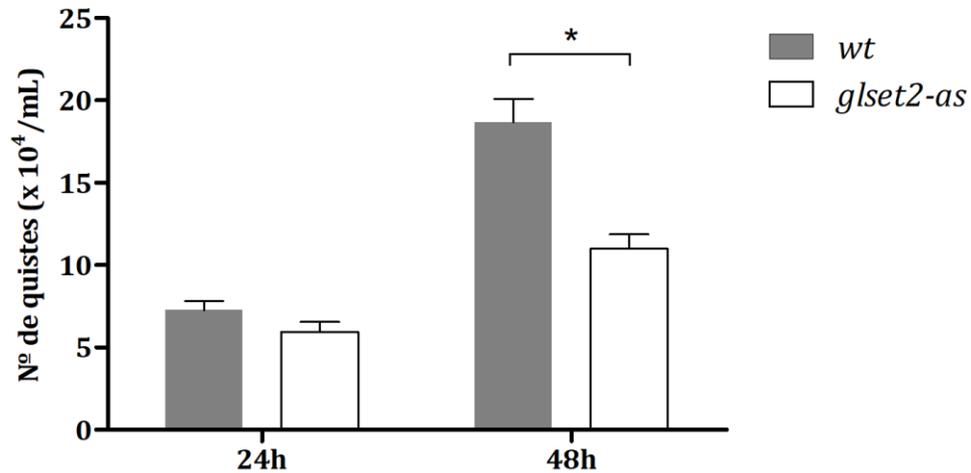


Figura 2.24: Efecto del silenciamiento de G1SET2 durante el proceso de enquistamiento. Trofozoítos *wt* y *glset2-as* (aproximadamente $2,5 \times 10^5$) fueron inoculados con medio de enquistamiento. La producción de quistes fue analizada a las 24 y 48 h. Referencia: *, $p < 0.05$, con respecto al control para ese tiempo.

Por lo tanto, se puede concluir que G1SET2 es una proteína de localización exclusivamente nuclear. Observando el aumento en la expresión de su ARNm a las 12, 36 y 48 h de enquistamiento, se podría concluir que G1SET2 estaría participando de este proceso. Por otro lado, en base a lo observado en cuanto a la producción de quistes, un menor número en células *glset2-ha* respecto al control, probablemente G1SET2 estaría regulando de manera negativa el proceso de enquistamiento.

II. iii. Discusión

Para completar su ciclo de vida, *G. lamblia* debe diferenciarse desde una forma móvil a un estadio de quiste latente, un proceso que requiere un sistema complejo para regular su expresión génica en respuesta a diferentes estímulos y cambios en su entorno. Actualmente se sabe que muchos de estos cambios se logran gracias a modificaciones post-traduccionales de histonas que tienen implicancia en la regulación génica.

Múltiples estudios sobre los distintos mecanismos biológicos descritos para *G. lamblia* han sido llevados a cabo mediante la transfección de plásmidos, tanto para la sobre-expresión de proteínas como para regular negativamente la expresión de diferentes genes (Davis-Hayman and Nash, 2002). Estas dos metodologías permiten inferir, aunque con ciertas limitaciones, el fenómeno en cuestión mediante el exceso o supresión de uno de los componentes del sistema global.

En este capítulo, se describió a GlHMT1, GlHMT2 y GlSET2 como enzimas involucradas en el proceso de enquistamiento. La expresión de GlHMT1, GlHMT2 y GlSET2 está regulada positivamente durante el enquistamiento, con un pico en su expresión entre las 6, 36 y 48 h.p.i. respectivamente, regresando luego a niveles basales en células *wild-type*, lo que añade nuevas ideas al control epigenético del proceso de enquistamiento.

La expresión génica en *G. lamblia* es dinámica, con un número considerable de genes, como *cwp1*, *cwp2* y *cwp3*, los cuales son expresados exclusivamente durante el proceso de enquistamiento, así como otros genes son regulados positivamente durante el mismo, como *myb-1 like protein*. En este trabajo, se observó que en células que sobre expresan GlHMT1, el incremento del ARNm del factor transcripcional Myb1-like protein fue previo a las 6 h.p.i., y posteriormente se observó un aumento en los niveles del ARNm de *cwps*, lo que coincide con resultados previos en donde la participación de Myb-1 like protein regula positivamente la expresión de las CWPs durante el inicio del proceso de enquistamiento (Huang et al., 2008; Sun et al., 2002). Además, existen otros factores transcripcionales cuya expresión incrementa significativamente durante el enquistamiento, como ARID1, GARP-like protein y WRKY (Pan et al., 2009; Sun et al., 2006; Wang et al., 2007).

Recientemente, Einarsson *et al.* (2016) describieron la eventualidad de la expresión génica durante el enquistamiento (Einarsson *et al.*, 2016). Con el fin de obtener altos niveles de quistes maduros, estos autores utilizaron un nuevo protocolo de enquistamiento en lugar del protocolo clásico de dos pasos. Posteriormente, y mediante ensayos de ARN-seq, estudiaron el perfil completo de expresión génica durante todo el proceso de enquistamiento. Encontraron que la mayoría de las enzimas modificadoras de histonas (HAT, HDAC y HMT) eran reguladas positivamente durante periodos de enquistamiento tardío (22-32 horas), y que los factores de transcripción WRKY y Myb1-like protein mostraban el mayor aumento a las 7 y 22 horas respectivamente. Teniendo en cuenta las diferencias en los protocolos de enquistamiento y el uso de diferentes aislados de *G. lamblia* (clon WB 1267 en el presente trabajo de tesis y clon WB C6 en Einarsson *et al.* 2016), pareciera que la progresión lineal del proceso es similar en ambas condiciones, con una regulación positiva temprana de Myb1-like protein, seguido de una regulación positiva de las enzimas modificadoras de la cromatina.

El panorama celular de la metilación de lisinas proporciona efectos funcionales contrastantes que van desde el silenciamiento hasta la activación de genes diana (revisado en Lanouette *et al.*, 2014; Thinnes *et al.*, 2014). Aquí, se encontró una clara regulación positiva del proceso de enquistamiento en las células de *G. lamblia* que sobre expresan GIHMT1, a la vez que se observó un aumento en la expresión del ARNm de *hmt2* y *set2* en células *wt* durante el proceso de enquistamiento. Sin embargo, sería de gran interés completar los estudios relacionados a la expresión de los genes específicos del enquistamiento en células *gl-hmt2ha*, ya que el aumento en la expresión del ARNm de *hmt2* en células *wt* y el aumento en la producción de quistes en células *gl-hmt2ha* con respecto al control no son suficientes para asumir que GIHMT2 tenga una función clave durante el enquistamiento. Por otro lado, el rol de GISET2 durante el enquistamiento no es del todo claro. Se observó que tanto la sobre-expresión como el silenciamiento de la proteína desencadenan el mismo fenotipo en relación al número de quistes. Esto puede deberse, probablemente, a que la disminución en la expresión de *set2* en células *glset2-as* fue parcial (**Anexo V.C**). Por otro lado, los posibles sustratos de estas enzimas no fueron estudiados experimentalmente. La presencia de mono, di y trimetilación de H3K4 y trimetilación H3K9 ha sido demostrada en este parásito

utilizando anticuerpos comerciales, lo que proporciona más evidencia de las funciones llevadas a cabo por estas enzimas (Carranza et al., 2016). Además, en otras células eucariotas, es bien conocido que una misma HMT puede poseer múltiples sustratos, incluidas proteínas no histonas. Por lo tanto, si bien los análisis bioinformáticos brindan una idea de los posibles sitios de sustrato de GHMT1, GHMT2 y G1SET2, no se puede descartar la posibilidad de que estas enzimas actúan sobre varios posibles sustratos. Experimentos adicionales utilizando células *glhmt2-ha* y *glset2-ha* son necesarios para terminar de clarificar la función de estas enzimas así como ensayos de actividad *in vitro* ayudarían a elucidar el/los sitio/s de acción de estas tres HMTs. Por otro lado, como se observó que GHMT2 no ingresa a los núcleos y, los resultados obtenidos en la red de interacción proteína-proteína indican que GHMT2 estaría interactuando con GHMT1, muy probablemente esta proteína esté cumpliendo una función sobre ciertas proteínas citoplasmáticas. Con respecto a la localización de GHMT1, que fue principalmente perinuclear y nuclear y teniendo en cuenta su rol clave en el proceso de enquistamiento podría considerarse como una enzima modificadora de histonas. La localización citoplasmática observada para GHMT1 podría deberse a que la proteína se encuentre en vías de síntesis, o en dirección a su destino, o que quizás se esté saturando el mecanismo por el cual la enzima ingresa a los núcleos considerando que bajo su promotor endógeno la localización citoplasmática es considerablemente menor que en células *glhmt1-ha*.

En células eucariotas, se ha encontrado que la mayoría de las modificaciones en proteínas histonas son reversibles, y las enzimas encargadas de eliminar dichas modificaciones han sido descritas. La metilación de lisinas en histonas puede ser revertida por dos familias de enzimas demetilinas, las amino oxidasas como la LSD1 (elimina mono y dimetilación de lisinas) y las hidroxilasas de la familia JmjC (elimina mono, di y trimetilación de lisinas) (Thinnes et al., 2014). Una característica interesante de *G. lamblia* es que no codifica para histonas demetilinas en su genoma, lo que sugiere que ésta modificación podría ser irreversible en el parásito. Sin embargo, antes de descartar esta posibilidad, se debe realizar un complejo estudio bioinformático para identificar enzimas hipotéticas, teniendo en cuenta las bajas similitudes entre las secuencias de aminoácidos de *G. lamblia* y la de otros grupos eucariotas. Además, la ausencia de arginina metiltransferasas (PRMT) en el genoma de

G. lamblia es un dato intrigante. Los estudios de espectrometría de masa de histonas durante el crecimiento y el enquistamiento ayudarán a desentrañar las modificaciones de histonas. Además, estos estudios darán una idea de las particularidades en cada etapa del ciclo de vida del parásito.

Hasta el momento, el único estímulo conocido que desencadena el enquistamiento es la carencia de colesterol, una característica típica de las partes inferiores del intestino (Lujan et al., 1996a). Se ha sugerido que los trofozoítos perciben esta diferencia en la concentración de colesterol, lo cual desencadena el proceso de enquistamiento. Sin embargo, la relación entre la falta de colesterol y la activación transcripcional de genes aún no está establecida. Del análisis de la red de interacción proteína-proteína predicha de GHMT1, se encontró una posible interacción de GHMT1 con HDAC (deacetilasa independiente de NAD⁺). Se observó que los inhibidores clásicos de HDAC (FR235222, TSA y NaB) disminuyen la producción de quistes al inhibir la expresión de moléculas específicas del enquistamiento (Carranza et al., 2016; Sonda et al., 2010). En las células de mamíferos, se ha descrito una interacción entre acetilación, deacetilación y la actividad de una HMT (Vaquero et al., 2007). Se descubrió que la actividad enzimática de SUV39H1 (lisina metiltransferasa) está regulada negativamente por la acetilación de su residuo Lys266, y que la deacetilación mediada por SIRT-1 revierte esta inhibición. Además, el residuo Lys266 está ubicado en un bucle expuesto que participa en mediar la interacción entre el dominio SET y el dominio post-SET rico en cisteína (Vaquero et al., 2007). Los autores proponen que la acetilación de la Lys266 podría alterar esta interacción entre dominios y afectar la actividad específica de la enzima, explicando el efecto estimulante de la deacetilación de Lys266 por la actividad de SUV39H1. Se exploró si GHMT1 poseía supuestos sitios de acetilación en su dominio SET, descubriendo que Lys220 es un posible sitio de acetilación. Esta lisina se encuentra en un bucle expuesto cercano al dominio post-SET (**Figura 2.4A**).

Además, Carranza *et al.* (2016) describieron las HDAC dependientes de NAD⁺, pertenecientes a la familia de sirtuinas, y además demostraron que estas enzimas participarían en las primeras etapas del enquistamiento funcionando probablemente como sensores metabólicos. Estos autores han postulado también que durante el proceso infeccioso en el intestino, la alta densidad parasitaria podría limitar la

disponibilidad de nutrientes, alterar el pH local e incrementar los niveles de NAD⁺, lo que podría activar a las sirtuinas (Carranza et al., 2016). La activación de sirtuinas llevaría a la deacetilación de residuos particulares, como H4K8ac y H4K16ac, en los cuales se observaron menores niveles de acetilación durante las primeras etapas del enquistamiento. Por lo tanto, podría ser posible explicar la acción de los inhibidores de HDAC por una doble función: la deacetilación de sitios particulares de histonas y como regulador de la actividad de GIHMT1. En la actualidad se están llevando a cabo estudios sobre la mutación de la Lys220 para probar esta posibilidad.

La diferenciación de trofozoíto a quiste es clave para la sobrevivencia del parásito en el medio ambiente y para la transmisión de la enfermedad. Teniendo en cuenta esto, el hallazgo de que al menos GIHMT1 es un regulador clave durante la fase temprana del enquistamiento ilumina claramente la idea de que el uso de inhibidores de HMTs podría bloquear efectivamente la producción de quistes y así reducir la transmisión de la enfermedad.

En la **Figura 2.25** se resume la participación de las enzimas modificadoras de histonas involucradas en el proceso de enquistamiento estudiadas hasta el momento en *G. lamblia* (como se mostró en el Capítulo I, Figura 1.8), y además se incorporaron las tres enzimas estudiadas en este Capítulo.

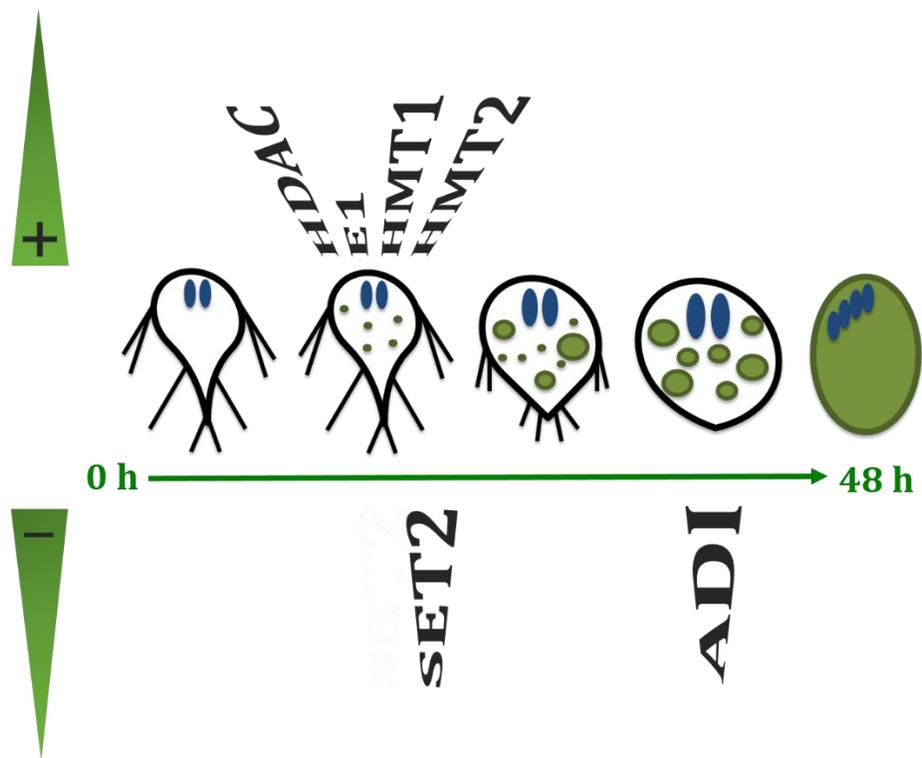
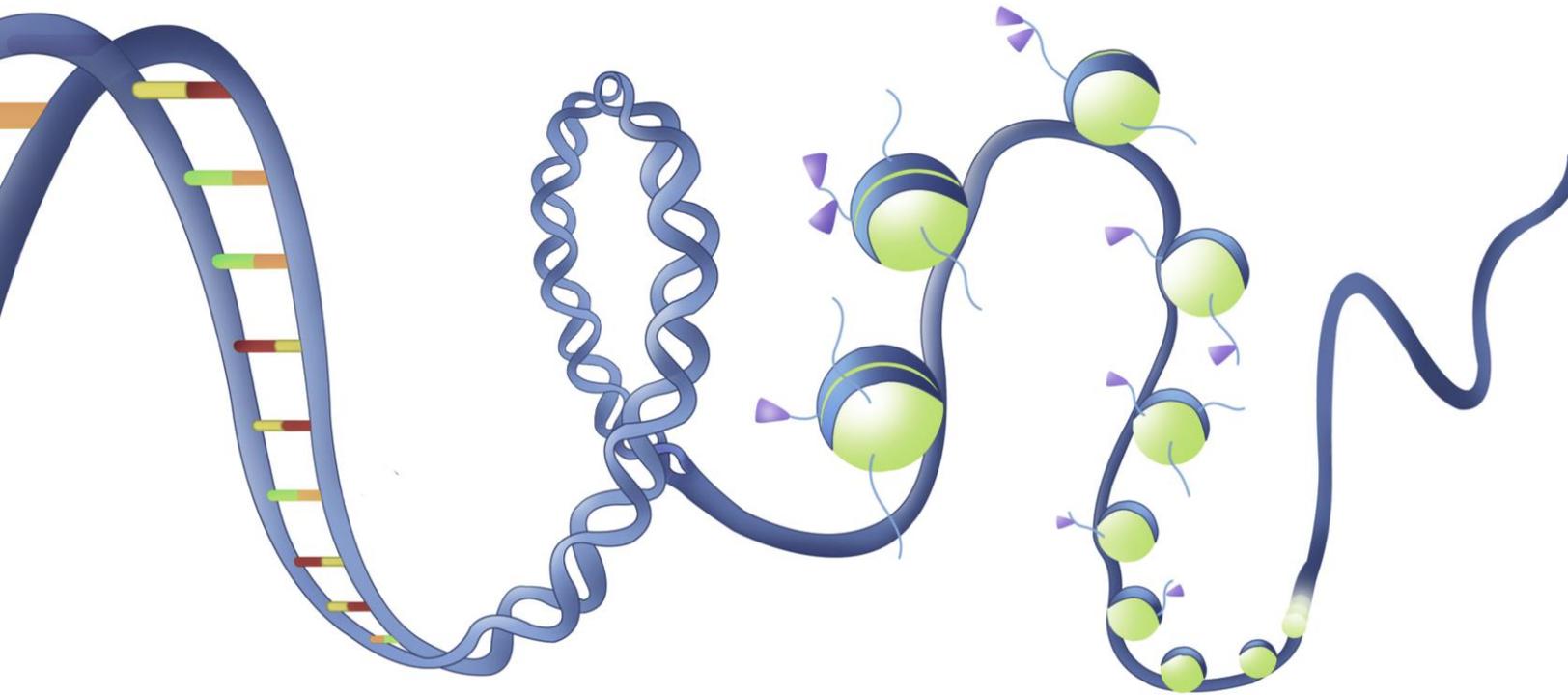


Figura 2.25: Participación de enzimas modificadoras de histonas durante el enquistamiento de *G. lamblia*. Representación esquemática del proceso de enquistamiento en donde se indican las enzimas modificadoras de histonas estudiadas hasta el momento y en el presente Capítulo. Los núcleos se representan en color azul y las ESVs conteniendo las CWPs en color verde. La flecha indica el progreso del proceso de enquistamiento a través del tiempo (0-48 h). “+” indica una regulación positiva del proceso; “-” indica una regulación negativa.

Capítulo III

MODIFICACIONES POST-TRADUCCIONALES DE HISTONAS EN *G. LAMBLIA*



Capítulo III: MODIFICACIONES POST-TRADUCCIONALES DE HISTONAS EN *G. LAMBLIA*

III. i. Introducción

Cada vez existen más evidencias que sugiere que las modificaciones post-traduccionales de histonas desempeñan un papel crucial en diversos procesos biológicos, como la diferenciación celular y el desarrollo de organismos, y que las modificaciones de las histonas contribuyen a ciertas enfermedades como el cáncer (Berdasco and Esteller, 2010; Fullgrabe et al., 2011). Se han descrito al menos once tipos de modificaciones post-traduccionales en más de 60 residuos de aminoácidos diferentes en histonas, que incluyen metilación, acetilación, propionilación, butirilación, formilación, fosforilación, ubiquitilación, sumoilación, citrulinación, isomerización de prolina y ribosilación de ADP (Martin and Zhang, 2007; Ruthenburg et al., 2007).

Se cree que las modificaciones post-traduccionales de histonas contribuyen a la regulación de la cromatina a través de dos mecanismos principales (Kouzarides, 2007; Ruthenburg et al., 2007). Primero, que las modificaciones post-traduccionales de histonas pueden modular directamente el empaquetamiento de la cromatina alterando la carga neta de las moléculas de histona o alterando las interacciones internucleosómicas, regulando así la estructura de la cromatina y el acceso de proteínas de unión al ADN, como los factores de transcripción. En segundo lugar, las modificaciones post-traduccionales de histonas regulan la estructura y función de la cromatina mediante el reclutamiento de proteínas específicas de unión a estas modificaciones, las cuales reconocen las histonas modificadas a través de pliegues estructurales especializados, tales como los bromo y cromo dominios y dedos PHD (del inglés, *Plant Homeodomain*) (Wysocka et al., 2005; Wysocka et al., 2006; Zeng and Zhou, 2002). Alternativamente, las modificaciones post-traduccionales de histonas también pueden funcionar inhibiendo la interacción de la cromatina con ligandos específicos (Margueron et al., 2005).

Si bien la mayoría de las modificaciones post-traduccionales de histonas conocidas se encuentran dentro del dominio amino terminal de las histonas, también se han encontrado modificaciones post-traduccionales de importancia crucial para las interacciones histona-ADN e histona-histona en el dominio globular de las histonas (Cosgrove et al., 2004; Garcia et al., 2007c; Mersfelder and Parthun, 2006). Nuevos sitios de modificaciones post-traduccionales, que se encuentran fuera de las colas amino terminales, se siguen descubriendo generalmente con ayuda de anticuerpos específicos o mediante métodos de espectrometría de masas (Chu et al., 2006; Garcia et al., 2007b; Johnson et al., 2004; Wisniewski et al., 2007). La identificación de la modificación O-GlcNAc (Sakabe et al., 2010) sugiere que aún pueden descubrirse modificaciones post-traduccionales de histonas adicionales.

Con el fin de comprender la implicancia de las modificaciones post-traduccionales de histonas y su relación con el proceso de diferenciación del parásito, se analizó la contraparte de las enzimas modificadoras de histonas, que son los residuos presentes en las histonas de *G. lamblia* y las modificaciones post-traduccionales presentes en ellas.

En *G. lamblia*, hasta el momento se han identificado dos copias de cada uno de los genes que codifican para las histonas H2A y H2B, cuatro copias para H3 y tres copias del gen de H4. Algunas especies de parásitos presentan un conector especializado, la Histona 1 (Figueiredo et al., 2009), sin embargo en *G. lamblia* no se ha encontrado el gen codificante para H1 (Yee et al., 2007).

III. ii. Resultados

III. ii. 1 Purificación de histonas

Para purificar las histonas de *G. lamblia*, se ensayaron varios protocolos que ya habían sido utilizados para este parásito (Carranza et al., 2016; Sonda et al., 2010; Triana et al., 2001), sin embargo, el mejor rendimiento se obtuvo utilizando un kit comercial para la purificación de histonas (Histone Extraction Kit, Abcam).

Se cultivaron trofozoítos de *G. lamblia* de la cepa salvaje y se llevó a cabo un ensayo de ultrapurificación, con el cual se logró una óptima purificación. La muestra se analizó por electroforesis en gel de poliacrilamida y luego por tinción con Azul de Coomasie. En la **Figura 3.1** pueden observarse las bandas que se lograron obtener de las histonas purificadas de *G. lamblia*, con pesos moleculares de entre 10-20 kDa, en concordancia con las masas moleculares predichas para las histonas de *G. lamblia* (~14 kDa para H2A, ~15 kDa para H2B, de ~16 kDa para H3 y ~11 kDa para H4).

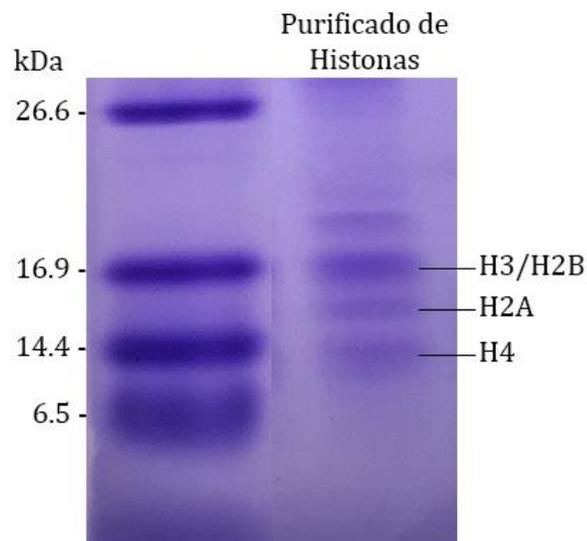


Figura 3.1. Purificación de histonas de *G. lamblia* de trofozoítos *wild-type* en crecimiento. La muestra resultante fue analizada por SDS-PAGE (16%). El gel fue teñido con solución de Coomasie R-250 0.2%. A la izquierda se muestra el marcador de peso molecular (kDa) y a la derecha la muestra de histonas purificadas de *G. lamblia*.

III. ii. 2 Modificaciones post-traduccionales de histonas en *G. lamblia*

Para realizar los ensayos de espectrometría de masa, las muestras de histonas purificadas de trofozoítos de *G. lamblia* (en fase exponencial) fueron liofilizadas y enviadas al laboratorio del Dr. Pawel Ciborowski en la Universidad de Nebraska, EE.UU. Allí se realizó el procesamiento y análisis de las mismas utilizando un espectrómetro de masa (LTQ-OrbitrapXL, ThermoScientific). A partir de estos ensayos, además de confirmar por espectrometría de masas la correspondencia de las bandas visualizadas previamente con las histonas de *G. lamblia* (H2A, H2B, H3 y H4), se pudo obtener el “mapa” de las modificaciones post-traduccionales de las histonas de *G. lamblia*.

Las proteínas histonas se caracterizan por presentar una alta proporción de residuos de lisina y arginina (Garcia et al., 2007a; Zee et al., 2010). El resultado de las digestiones de histonas con tripsina tiende a producir péptidos que son relativamente pequeños e hidrófilos, los cuales son difíciles de detectar posteriormente por espectrometría de masa, debido a la mala retención de la columna RP-HPLC (del inglés, *Reversed-Phase High Performance Liquid Chromatography*). Este problema se abordó utilizando una derivación química, la propionilación, que al modificar residuos de lisina evita que los mismos sean lisados por la tripsina (Garcia et al., 2007a). De esta manera, los péptidos que se obtienen son de una longitud adecuada para su posterior análisis por espectrometría de masa. Por este motivo, la propionilación aparecerá como una modificación derivada y no como una modificación real presente en algunos residuos de las histonas de *G. lamblia*.

A continuación se muestran las modificaciones obtenidas sólo en los extremos amino terminales. En general, se encontraron algunas modificaciones conservadas y otras particulares de *G. lamblia*, como ya había sucedido al estudiar otros parásitos. Se identificaron: fosforilación de serinas, treoninas y tirosinas; metilación de lisinas y argininas; ubiquitinación de lisinas y acetilación de lisinas. El hallazgo más interesante fue el hecho de observar argininas metiladas. Si bien era de sospechar que este residuo no escaparía a la metilación, en el genoma de *G. lamblia* no hay genes descritos como argininas-metil transferasas. Esto plantea la posibilidad de que las enzimas descritas en el Capítulo II (HMTs) puedan estar actuando tanto sobre residuos de lisinas como argininas. De manera general, también se observó que un mismo aminoácido presentaba distintas modificaciones post-traduccionales, como por ejemplo acetilación

o metilación, dos modificaciones con posibles acciones contrapuestas. A su vez, un mismo péptido presenta combinaciones diferentes, lo que plantea el interrogante si las distintas combinaciones están relacionadas a distintos estadios de crecimiento del parásito o a los mecanismos de adaptación.

III. ii. 2.1 Histona H2A

Alineamientos múltiples de secuencias mostraron que la histona H2A de *G. lamblia* (GL50803_27521) presenta bajo porcentaje de identidad en relación a histonas H2A de diversos organismos eucariotas (**Anexo VI y VII**).

Utilizando LTQ-Orbitrap, no se encontraron modificaciones en el extremo amino terminal de H2A (**Tabla 3.1**). Sin embargo, solo se obtuvieron tres péptidos correspondientes a la región amino terminal, por lo que no se puede descartar la posibilidad de que existan modificaciones post-traduccionales en esa región.

Tabla 3.1: Modificaciones post-traduccionales presentes en el extremo amino terminal de H2A de *G. lamblia*.

MSTKPVK DNSK	MK	SR SAR A	GISFPIGR IHRHLREGRY...
K.DNSK ^(+56.03)	MK ^(+56.03)	SR.S	
		R.A ^(+56.03)	GISFPIGR.I
		R.A	GISFPIGR.I

Los colores corresponden a las siguientes modificaciones: **propionilación (56.03)**
Cada renglón corresponde a cada uno de los péptidos obtenidos de H2A de *G. lamblia*.

III. ii. 2.2 Histona H2B

La histona H2B de *G. lamblia* (GL50803_121045) también muestra un bajo porcentaje de identidad con respecto a histonas H2b del resto de los organismos eucariotas (**Anexo VI y VII**).

A diferencia de H2A, en H2B se obtuvieron varias modificaciones interesantes y un mayor número de péptidos (**Tabla 3.2**). En el dominio amino terminal se observó acetilación, ubiquitinación, di y trimetilación de lisinas; fosforilación de treonina y lo más llamativo fue encontrar argininas metiladas. Además se observó que un mismo residuo podía presentar diferentes marcas independientes. Por ejemplo, K2 presentó tanto acetilación como ubiquitinación, K12 presentó ubiquitinación, acetilación y dimetilación; en tanto que K18 y K22 presentaron hasta cuatro marcas diferentes (acetilación, ubiquitinación, di y trimetilación). A su vez, se observó que R23 puede estar metilada o dimetilada.

Tabla 3.2: Modificaciones post-traduccionales presentes en el extremo amino terminal de H2B de *G. lamblia*.

2		7		8		12		18		22		23			
M S	K	V	ET	K	R	L MK	K	T	E	A	G D	K	GDAK	R	KHKRHET...
M.S ^(+56.03)	K ^(+42.01)	V	ET	K ^(+56.03)	R.	L									
M.S ^(+56.03)	K ^(+56.03)	V	ET	K ^(+56.03)	R.	L									
MS	K ^(+114.04)	V	ET	K.	R										
MS	K ^(+42.01)	V	ET ^(+79.97)	K ^(+70.09)	R ^(+14.02)	L.M									
MS	K ^(+56.03)	V	ET ^(+79.97)	K ^(+28.03)	R.	L									
	K.	V ^(+56.03)	ET	K ^(+56.03)	R.	L									
				R.	L MK ^(+56.03)	K ^(+56.03)	T	E	A	G.D					
					K.	K ^(+114.04)	T	E	A	G D	K	GDAK ^(+42.01)	R.	K	
					K.	K ^(+114.04)	T	E	A	G D	K ^(+42.01)	GDAKR.K			
					K.	K ^(+114.04)	T	E	A	G D	K	GDAK ^(+42.05)	R.	K	
					K.	K ^(+114.04)	T	E	A	G D	K ^(+114.04)	GDAK ^(+56.03)	R.	K	
					K.	K ^(+56.03)	T	E	A	G D	K ^(+56.03)	GDAK ^(+56.03)	R.	K	
					K.	K ^(+42.01)	T	E	A	G D	K ^(+42.01)	GDAK ^(+114.04)	R ^(+14.02)	K	
					K.	K ^(+56.03)	T	E	A	G D	K	GDAK ^(+56.03)	R.	K	
					K.	K ^(+56.03)	T	E	A	G D	K ^(+42.05)	GDAK ^(+56.03)	R.	K	
					K.	K ^(+28.03)	T	E	A	G D	K	GDAK ^(+56.03)	R.	K	
					K.		T	E	A	G D	K ^(+56.03)	GDAK ^(+28.03)	R ^(+28.03)	K	
					K.		T	E	A	G D	K ^(+28.03)	GDAK ^(+56.03)	R ^(+28.03)	K	
					K.		T ^(+56.03)	E	A	G D	K ^(+56.03)	GDAK ^(+56.03)	R.	K	
					K.		T ^(+56.03)	E	A	G D	K ^(+56.03)	GDAK	R.	K	
					K.		T	E	A	G D	K ^(+56.03)	GDAK ^(+56.03)	R.	K	
							T.	E ^(+56.03)	A	G D	K ^(+28.03)	GDAK ^(+42.01)	R.	K	
							T.	E	A	G D	K ^(+28.03)	GDAK ^(+56.03)	R.	K	
							T.	E	A	G D	K	GDAK ^(+70.09)	R.	K	
							T.	E ^(+56.03)	A	G D	K	GDAK	R.	K	
							T.	E	A	G D	K	GDAK	R.	K	
								E.	A ^(+56.03)	G D	K ^(+56.03)	GDAK ^(+56.03)	R.	K	
								E.	A ^(+56.03)	G D	K ^(+42.05)	GDAK ^(+114.04)	R.	K	
										G.D ^(+56.03)	K ^(+56.03)	GDAK ^(+56.03)	R.	K	
										G.D ^(+56.03)	K ^(+56.03)	GDAK ^(+114.04)	R.	K	
										G.D	K ^(+56.03)	GDAK ^(+56.03)	R.	K	

Los colores corresponden a las siguientes modificaciones: acetilación (42.01); monometilación/propionilación (70.09); dimetilación (28.03); trimetilación (42.05); fosforilación (79.97); ubiquitinación (114.04); metilación de R (14.02); propionilación (56.03). Cada renglón corresponde a cada uno de los péptidos obtenidos de H2B de *G. lamblia*.

III. ii. 2.3 Histona H3

Al realizar el alineamiento de secuencias con diversos organismos eucariotas, se observó que la histona H3 de *G. lamblia* (GL50803_135231) está muy conservada entre especies (**Anexo VI y VII**). Sin embargo, en algunos casos hay inserciones, por lo que las posiciones de los aminoácidos cambian con respecto a otros organismos ya descritos. Por ello, en la descripción, luego de nombrar el residuo y la posición de la modificación en *G. lamblia*, se coloca entre paréntesis la posición de ese residuo en la secuencia de humanos. En la **Tabla 3.3** se muestran los distintos péptidos obtenidos por espectrometría de masas y las modificaciones post-traduccionales que se observaron en ellos.

Con respecto a la acetilación de histonas, en la bibliografía se ha descrito ampliamente que K4 es un sustrato de acetilación. Sin embargo, en el análisis obtenido no se observó acetilación de ese residuo, aunque solo se obtuvo un péptido de esa región, por lo que no se puede descartar esa posibilidad. K9 está acetilada en *G. lamblia*. Esta modificación había sido previamente descrita en *G. lamblia* mediante la utilización de un anticuerpo comercial (anti-H3K9ac, Abcam), en donde observaron una marca nuclear débil (Carranza et al., 2016). Esta modificación además se ha descrito en *Plasmodium falciparum* (Bartfai et al., 2010) y en *T. gondii* (Gissot et al., 2007) como marcas de activación génica.

También se observó acetilación en la lisina 15 (K14), al igual que en *P. falciparum* (Cui et al., 2007). En células embrionarias de ratón se observó que la acetilación de ambos residuos (H3K9 y H3K14) facilita la expresión génica en promotores activos, mientras que la acetilación solo de H3K14 está relacionada selectivamente a genes que no se expresan, planteando que la acción coordinada de HAT y HDAC estaría regulando la expresión génica dependiendo del estímulo (Karmodiya et al., 2012). Como se puede observar en la **Tabla 3.3**, en esa región los péptidos no muestran acetilación simultánea de K9 y K15 (K14), por lo que posiblemente en las condiciones ensayadas, *G. lamblia* no haya co-acetilación en estos dos sitios.

Finalmente, se observó acetilación en la lisina 37 (K36) en H3. Esta modificación juega un rol importante en la activación transcripcional (Morris et al., 2007); Karmodiya, 2012). Como se puede observar en los resultados, este residuo parece ser blanco de varias modificaciones post-traduccionales, entre ellas di y trimetilación.

Con respecto a la metilación de lisinas, en *G. lamblia* se encontró dimetilación de K4, K9, K28 (K27) y K37 (K36) y además, trimetilación de K37 (K36). Éstas son algunas de las marcas epigenéticas más conservadas entre especies y más estudiadas en la actualidad, las cuales se discutirán al final de este capítulo.

Al igual que en H2B, se encontró monometilación de H3R2 y a su vez dimetilación de H3R18, dos marcas altamente conservadas y estudiadas en organismos superiores (Revisado en Blanc and Richard, 2017).

Tabla 3.3: Modificaciones post-traduccionales presentes en el extremo amino terminal de H3 de *G. lamblia*.

4		9		15			28			37										
MAR	TK	HTAR	K	T	T	SATK	APR	KTIAR	KAA	R	K	TAS	S	T	S	G	IK	K	TGR	K...
MAR ^(+14.02)	TK ^(+28.03)	HTAR.K																		
		R.K ^(+56.03)		T	T	SATK ^(+70.09)	APR ^(+28.03)	.K												
		R.K ^{(+56.03)(+56.03)}		T	T	SATK ^(+56.03)	APR.	K												
		R.K ^{(+56.03)(+56.03)}		T	T	SATK ^(+42.01)	APR.	K												
		R.K ^{(+56.03)(+42.01)}		T	T	SATK ^(+56.03)	APR.	K												
		R.K ^{(+56.03)(+28.03)}		T	T	SATK	APR.	K												
		R.K ^{(+56.03)(+114.04)}		T	T	SATK ^(+56.03)	APR.	K												
		R.K ^(+56.03)		T	T	SATK ^(+56.03)	APR.	K												
		R.K ^(+56.03)		T	T	SATK ^(+42.01)	APR.	K												
		K.		T ^(+56.03)	T	SATK ^(+42.01)	APR.	K												
				T.	T ^(+56.03)	SATK ^(+42.01)	APR.	K												
								R.K ^{(+56.03)(+56.03)}	TAS	S	T	S	G	IK ^(+28.03)	K ^(+56.03)	TGR.K				
								R.K ^{(+56.03)(+56.03)}	TAS	S	T	S	G	IK ^(+56.03)	K ^(+56.03)	TGR.K				
								R.K ^{(+56.03)(+28.03)}	TAS	S	T	S ^(+79.97)	G	IK ^(+42.05)	K	TGR.K				
								R.K ^(+56.03)	TAS	S	T	S	G	IK ^(+56.03)	K.	T				
									S.S ^(+56.03)	T	S	G	IK ^(+28.03)	K ^(+56.03)	TGR.K					
									S.	T ^(+56.03)	S	G	IK ^(+28.03)	K ^(+56.03)	TGR.K					
									S.	T ^(+56.03)	S	G	IK ^(+42.01)	K ^(+56.03)	TGR.K					
										T.	S ^(+56.03)	G	IK ^(+28.03)	K ^(+56.03)	TGR.K					
										T.	S ^(+56.03)	G	IK ^(+42.05)	K ^(+56.03)	TGR.K					
											S.	G ^(+56.03)	IK ^(+56.03)	K ^(+56.03)	TGR.K					

Los colores corresponden a las siguientes modificaciones: **acetilación (42.01)**; monometilación/propionilación (70.09); **dimetilación (28.03)**; trimetilación (42.05); fosforilación (79.97); ubiquitinación (114.04); **metilación de R (14.02)**; propionilación (56.03). Cada renglón corresponde a cada uno de los péptidos obtenidos de H3 en *G. lamblia*.

III. ii. 2.4 Histona H4

La histona H4 de *G. lamblia* (GL50803_135001), si bien muestra un alto porcentaje de identidad con histonas H4 de otros organismos eucariotas, presenta deleciones y sustituciones en algunos aminoácidos (**Anexo VI y VII**), es por eso que la localización de las modificaciones es diferente entre *G. lamblia* y otros organismos, aunque la región próxima a la modificación está conservada. Al igual que en H3, se colocará la inicial del aminoácido y el número de posición en *G. lamblia*, y entre paréntesis el mismo residuo pero con el número de posición correspondiente en otras células eucariotas.

Utilizando el LTQ-Orbitrap, se encontraron algunas modificaciones post-traduccionales de histonas conservadas en la región amino terminal. Las modificaciones encontradas para H4 fueron fosforilación, ubiquitinación, dimetilación, monometilación/propionilación y acetilación (**Tabla 3.4**).

Se observaron marcas de acetilación en K11 (K12), K13 (K16) y K27 (K31) que están asociadas a la activación transcripcional en organismos eucariotas (revisado en Barnes et al., 2019). Estas modificaciones fueron descritas en otros parásitos, como *T. gondii* y *P. falciparum*, pero en *T. cruzi* solo se encontró acetilación de K10 (K12) y K14 (K16) (de Jesus et al., 2016; Duffy et al., 2014; Nardelli et al., 2013).

No observamos acetilación en el residuo K5 a pesar de que esta modificación fue descrita en varios organismos, pero sí encontramos metilación, una marca que fue previamente descrita en otras células, aunque su implicancia es desconocida (Van Aller et al., 2012).

Las marcas represivas son conducidas por dimetilación en K11 (K12) y K19 (R23). Es interesante notar que en otros organismos esta R23 está metilada. En *S. cerevisiae* se ha estudiado si la mutación R23K es relevante para el silenciamiento telomérico, y se observó que la mutación no recuperó el fenotipo, sugiriendo que la metilación del residuo R23 tiene una función importante en el mantenimiento del silenciamiento (Yeom et al., 2018). Por lo tanto, sería de interés analizar cuál es la consecuencia de esta modificación durante el crecimiento de *G. lamblia*.

Una diferencia importante con otros organismos (incluyendo *P. falciparum* y *T. gondii*) es el reemplazo de R3 por lisina en la Histona 4 de *G. lamblia*. La metilación de esta arginina ha sido previamente identificada en *T. gondii* y *P. falciparum* utilizando

espectrometría de masa y/o ensayos bioquímicos (Cui and Miao, 2010; Saksouk et al., 2005; Trelle et al., 2009). Si bien en *G. lamblia* se encontró este péptido, no se encontró ninguna modificación en K3.

Por último, Carranza *et al.* (2016) observaron utilizando anticuerpos comerciales contra H4K8ac y H4K16ac una marca nuclear en trofozoítos de *G. lamblia* en crecimiento y una disminución en la intensidad de fluorescencia a medida que transcurría el enquistamiento. También observaron localización nuclear al utilizar los anticuerpos anti-H4K5ac y H4K12ac. Sin embargo, a excepción H4K12ac (K11 en *G. lamblia*) y H4K16ac (K13 en *G. lamblia*), H4K5ac y H4K8ac no pudieron ser detectadas mediante espectrometría de masa, apoyando la idea de que no todas las modificaciones post-traduccionales inferidas mediante la utilización de anticuerpos contra histonas pueden verificarse utilizando análisis de espectrometría de masas de histonas, como se ha demostrado en *T. gondii* (Nardelli et al., 2013). De aquí nace la necesidad de considerar técnicas complementarias para determinar cuáles son las modificaciones que se producen en las histonas de los distintos organismos.

Tabla 3.4: Modificaciones post-traduccionales presentes en el extremo amino terminal de H4 de *G. lamblia*.

5	7	11	13	19	27
MSGKG K	GKGY	GK	SK	R H	S K EK DTL G G I TK PAIR R.....
MSGKG K ^(+56.03)	GKGY ^(+79.97)	GK ^(+28.03)	SK ^(+42.01)	R.H	
G.K	GKGY ^(+79.97)	GK ^(+42.01)	SK ^(+114.04)	R.H	
MSGKG K ^(+70.09)	GKGY	GK ^(+70.09)	SK	R.H	
				R.H ^(+56.03)	S K ^(+56.03) EK ^(+56.03) DTL G. G
				R.H	S ^(+79.97) K EK ^(+28.03) DTL G. G
					K. EK ^(+56.03) DTL G G I TK ^(+56.03) PAIR.R
					K. DTL G G I TK ^(+56.03) PAIR.R
					K. DTL G G I TK ^(+56.03) PAIR.R
					L.G ^(+56.03) G I TK ^(+56.03) PAIR.R
					G. G ^(+56.03) I TK ^(+56.03) PAIR.R
					G. G ^(+56.03) I TK PAIR.R
					G. I ^(+56.03) TK ^(+56.03) PAIR.R
					I. TK ^(+114.04) PAIR.R
					I. TK ^(+42.01) PAIR.R

Los colores corresponden a las siguientes modificaciones: **acetilación** (42.01); **monometilación/propionilación** (70.09); **dimetilación** (28.03); **fosforilación** (79.97); **ubiquitinación** (114.04); **propionilación** (56.03). Cada renglón corresponde a cada uno de los péptidos obtenidos en H4 en *G. lamblia*.

III iii. Discusión

En este estudio, se describieron por primera vez las modificaciones post-traduccionales de histonas de trofozoítos de *G. lamblia* en fase exponencial. Con este análisis, se identificaron aproximadamente 23 residuos de los extremos amino-terminales de las histonas de *G. lamblia* susceptibles a sufrir modificaciones post-traduccionales. A su vez, se identificaron 44 marcas de histonas que hasta el momento se desconocía que estaban presentes en las histonas de trofozoítos, con excepción de tres marcas que ya habían sido observadas por ensayos de inmunofluorescencia utilizando anticuerpos comerciales (H3K4me2, H4K12ac y H4K16ac) (Carranza et al., 2016). Este trabajo proporciona una plataforma para el estudio de nuevos mecanismos de regulación de histonas en *G. lamblia*.

La histona H2A carece de muchas de las modificaciones de la región amino terminal que han hecho que H3 y H4 sean tan populares en la epigenética. En otros organismos se presentan variantes de H2A, las cuales aportan una gran diversidad a la composición de los nucleosomas. Las variantes de H2A difieren entre sí principalmente en su extremo C-terminal, que es responsable de la unión intra-nucleosómica y de la unión al ADN. El extremo amino terminal también se altera entre las variantes, que están involucradas en una organización de la cromatina de orden superior. Las variantes universales de H2A, H2A.X y H2A.Z, se encuentran en casi todos los organismos (Talbert and Henikoff, 2010), sin embargo no están presentes en la base de datos de *G. lamblia*.

Una modificación notable de H2A es la monoubiquitinación de K119 (H2Aub) realizada por el *Polycomb Repressor Complex 1* (PRC1) que es responsable del silenciamiento epigenético, particularmente en los genes *Hox* durante el desarrollo (Osley, 2006). También se ha informado para H2A, acetilación en K5 y K9 (Beck et al., 2006), fosforilación en S1 (Zhang et al., 2004) y metilación en R3 en células germinales de ratón (Ancelin et al., 2006). Muchas de estas modificaciones están involucradas en la respuesta temprana al daño del ADN (Ikura et al., 2007).

Con respecto a H2B, ésta forma un tetrámero compuesto por dos dímeros H2A-H2B. Este tetrámero y sus componentes se intercambian fácilmente dentro y fuera del nucleosoma en comparación con H3 y H4, por lo que es menos probable que las

modificaciones en H2A y H2B se mantengan en la cromatina (Kimura and Cook, 2001). Esto puede ser parte de la razón por la cual las modificaciones en H2A/H2B han sido menos estudiadas que H3 y H4, lo cual no le resta importancia al posible impacto que las modificaciones post-traduccionales en H2B pueden tener en cuanto a la dinámica de la cromatina.

Al igual que las otras histonas, H2B presenta varias modificaciones del extremo amino terminal. Éstas incluyen la acetilación en K5, K12, K15 y K20 y la fosforilación en S14 en humanos (Allis et al., 2007; Cheung et al., 2003). El papel exacto de estas modificaciones aún no se comprende. Sin embargo, está claro que ciertas acetilaciones de H2A y H2B se agrupan con patrones de acetilaciones conocidos de H3 y H4, como se observó en *S. cerevisiae* (Liu et al., 2005). Esto implica que las modificaciones de H2A y H2B contribuyen a la transcripción, pero puede que no proporcionen una única información.

La ubiquitinación tiene importantes consecuencias estéricas para el nucleosoma. A diferencia de H2A, la monoubiquitinación de H2B parece tener un efecto positivo en la transcripción. La monoubiquitinación de H2B (H2Bub) ocurre en K120 en mamíferos (Zhu et al., 2005). H2Bub1 está asociado con los ORF de genes transcritos activamente y se correlaciona con el nivel de expresión génica, lo que sugiere un papel importante en el alargamiento transcripcional (Minsky et al., 2008). La ubiquitinación de H2B es necesaria para que se deposite la di y trimetilación de H3K4 (activadores transcripcionales) (Shahbazian et al., 2005). Sin embargo, H2Bub también se asocia con el bloqueo de la transcripción de ciertos genes (Shema et al., 2008). Estos resultados aparentemente contradictorios sugieren un papel complejo para H2Bub que aún no se ha caracterizado por completo. Más allá de su papel en la transcripción, H2Bub también parece ser crítico para las respuestas al daño del ADN y actúa como supresor tumoral por lo que puede ser de gran importancia en cáncer (Johnsen, 2012).

Modificaciones en H3K4 se asocian con activación. Ya sea que este residuo esté metilado o acetilado, este sitio activará la transcripción de genes muy rápidamente debido a que todas las marcas de acetilación de todos los residuos de histonas son activadoras de la transcripción. Sin embargo, el verdadero interés en H3K4 radica en su metilación, ya que esta modificación está estrechamente asociada con promotores de genes activos. Al igual que todos los residuos de lisina, H3K4 puede ser mono, di o

trimetilado, y cada uno tiene distribuciones ligeramente diferentes. En *G. lamblia* este residuo se encuentra dimetilado, sin embargo la marca más estudiada por los investigadores es H3K4me3, ya que es una modificación asociada con los sitios de inicio de la transcripción de genes transcritos activamente (Barski et al., 2007).

De qué manera un pequeño grupo metilo puede ser tan importante para la transcripción sigue siendo un área activa de investigación. Los estados específicos de metilación de histonas regulan la transcripción al promover la unión de factores de transcripción positivos y bloquear los negativos. Por ejemplo, H3K4me3 recluta los factores de remodelación de la cromatina CHD1 (Flanagan et al., 2005) y BPTF (Li et al., 2006) que abren la cromatina, al mismo tiempo que evitan la unión del represor NuRD (Nishioka et al., 2002) y un complejo inhibidor de histona acetilasa (Schneider et al., 2004). El vínculo entre H3K4 y la transcripción es claro a medida que se van creando relaciones en el mundo epigenético. La excepción más notable es la existencia de "dominios bivalentes" donde H3K4me3 utiliza el mismo promotor que las marcas represivas, como H3K27me3, a menudo en genes importantes del desarrollo (Bernstein et al., 2006). Si bien su papel aún se desconoce en gran medida, se cree que estos dominios tienen un rol en mantener inactivos los promotores de genes del desarrollo, aunque "listos" para ser transcritos (Voigt et al., 2013). Esto tiene sentido, ya que H3K4me3 parece ser muy importante en el desarrollo. Un artículo que ha aclarado aún más el mecanismo por el cual H3K4me3 promueve la rápida activación de genes (Lauberth et al., 2013), demuestra cómo algunas interacciones específicas de proteínas con H3K4me3 dirigen la formación del complejo de pre-iniciación en promotores regulados por p53.

En *G. lamblia*, H3K9 puede estar acetilada o dimetilada cumpliendo una doble función. Al ser acetilada, puede activar genes o silenciarlos con la misma facilidad que cuando se metila. H3K9ac es una modificación particularmente importante ya que está altamente correlacionada con promotores activos. H3K9ac también tiene una alta coincidencia con H3K14ac y H3K4me3, debido a que estas tres marcas son el sello distintivo de los promotores de genes activos (Karmodiya et al., 2012).

Las mono, di y trimetilaciones de H3K9 tienen distribuciones muy distintas. H3K9me1 se enriquece en el sitio de inicio de la transcripción de genes activos (Barski et al., 2007). La metilación de H3K9 es la marca de la heterocromatina, el estado

condensado transcripcionalmente inactivo de la cromatina. H3K9me3 une la proteína de heterocromatina 1 (HP1) con la heterocromatina constitutiva (Lehnertz et al., 2003). HP1 es responsable de la represión transcripcional y de la real formación y mantenimiento de la heterocromatina. HP1 también recluta la ADN metiltransferasa 3b, proporcionando uno de los mejores ejemplos de la interacción entre la metilación de histonas y la metilación de ADN.

Por otra parte, H3K9me2 es una marca característica del cromosoma X inactivado (Xi) (Rougeulle et al., 2004). Un reciente artículo describe la implicancia de una nueva proteína en la inactivación del cromosoma X mediada por H3K9me2. Se demostró que la proteína CDYL (del inglés, *Chromodomain Y-like protein*) no solo se une a H3K9me2 y H3K27me3 en el Xi, sino también a la histona metiltransferasa G9a de H3K9 (Escamilla-Del-Arenal et al., 2013).

H3K27 es una marca conocida por concluir la transcripción. Cuando H3K27 se trimetila, se asocia estrechamente con promotores de genes inactivos. Actúa en oposición a H3K4me3. Debido a su efecto dramático y predecible en la expresión génica, H3K27me3 es una de las marcas favoritas de los investigadores epigenéticos que estudian genes inactivos.

La mayoría de las metilaciones de histonas son catalizadas por muchas enzimas. H3K27me3 se distingue porque solo tiene una metiltransferasa conocida, EZH2 (Kuzmichev et al., 2002). EZH2 es parte del complejo PRC2 que es el responsable de la represión de muchos genes involucrados en el desarrollo y la diferenciación celular (Boyer et al., 2006; Bracken et al., 2006). Por lo tanto, se cree que H3K27me3 es fundamental para la represión de los genes del desarrollo. H3K27me3 también es una marca importante del cromosoma X inactivo (Xi) (Rougeulle et al., 2004).

En *G. lamblia*, se observó dimetilación de H3K28 (K27). Los estados de mono y dimetilación son menos estudiados; sin embargo, H3K27me2 muestra una distribución similar a H3K27, mientras que H3K27me1 se asocia con promotores activos (Barski et al., 2007). Su papel sigue siendo un tanto difícil de descubrir, sin embargo, un estudio reciente demostró que el complejo PRC2 (del inglés, *Polycomb repressive complex 2*) en realidad controla las tres formas de metilación de H3K27 (Ferrari et al., 2014). Este artículo respalda hallazgos anteriores sobre la distribución de H3K27me1/me2, en donde se había demostrado que H3K27me1 afectaba positivamente la transcripción,

mientras que H3K27me2 tenía una amplia distribución y función en el silenciamiento de potenciadores de tipos celulares no específicos (Ferrari et al., 2014). Además, se ha informado acerca de la acetilación de H3K27. Debido a que un residuo de lisina no puede estar metilado y acetilado al mismo tiempo, se esperaría que H3K27ac sea antagónica a la represión de la expresión génica por H3K27me2/me3. De hecho, los datos muestran que H3K27ac está asociado con la transcripción activa y el antagonismo de los genes regulados por H3K27me3 (Tie et al., 2009).

Con respecto a H3K36, las modificaciones que ocurren en ese residuo son muy diversas y no comparten mucha similitud entre ellas. La histona H3 de *G. lamblia* presenta acetilación, di y trimetilación en este residuo. H3K36 presenta estados de metilación y acetilación funcionalmente relevantes. La acetilación de H3K36 ha sido caracterizada recientemente y su patrón de distribución en el genoma es similar a otras acetilaciones comunes de H3. Del mismo modo, esta modificación juega un papel en la activación transcripcional (Morris et al., 2007).

Los estados de mono, di y trimetilación difieren entre sí en sus distribuciones y roles funcionales. El máximo grado de metilación de este residuo (H3K36me3) está asociado al extremo 3' de genes activos (Barski et al., 2007). En levaduras se ha demostrado que H3K36me3 se deposita en las histonas a medida que son desplazadas por la ARN polimerasa II (ARN pol II) durante la transcripción. H3K36me3 luego sirve como una marca para que las HDAC se unan y deactilen las histonas, evitando la transcripción de fuga a raíz de ARN pol II (Carrozza et al., 2005; Joshi and Struhl, 2005). La evidencia experimental sugiere que esto también puede suceder en humanos, sin embargo, H3K9 es empleada junto con H3K36 para la transcripción represiva inusual (Bartke et al., 2010).

H3K36me3 también puede estar involucrada en la definición de exones. En general, los exones están enriquecidos en los nucleosomas, pero éstos también están enriquecidos en determinadas modificaciones de histonas que incluyen H3K79, H4K20 y especialmente H3K36me3 (Schwartz et al., 2009). Se cree que este patrón influye de alguna manera en el empalme alternativo (Luco et al., 2010). El rol de H3K36me1 no está del todo claro, sin embargo H3K36me2 está relativamente bien caracterizado. Por ejemplo, H3K36me2 contribuye en la reparación de rupturas de la doble hebra de ADN.

H3K36me2 es depositada cerca de las rupturas de la doble hebra, y luego sirve para reclutar factores de reparación temprana como NBS1 y Ku70 (Fnu et al., 2011).

Las modificaciones de H4 no están tan bien caracterizadas como las de H3. H4 presenta mucha menos variación de secuencia entre especies que las otras histonas, lo que probablemente esté relacionado con su función, relacionada a la organización de la estructura de la cromatina (Thatcher and Gorovsky, 1994).

H4K5 es el residuo de lisina más cercano a la cola amino terminal de la histona H4. La histona H4 forma un tetrámero firme con la histona H3. Al igual que la histona H3, H4 tiene una larga cola amino terminal que está sujeta a diversas acetilaciones y metilaciones asociadas con muchos procesos celulares.

A pesar de haber encontrado monometilación en H4K5 de *G. lamblia*, en general no hay estudios que demuestren que este residuo pueda ser metilado, solo existen evidencias sobre su acetilación. La acetilación de H4K5 había sido observada en *G. lamblia*, por ensayos de IF. Como todas las acetilaciones, H4K5ac es catalizada por varias enzimas, incluidas las proteínas Tip60 y CBP/p300 en mamíferos (Kimura and Horikoshi, 1998; Schiltz et al., 1999). CBP/p300 son importantes activadores transcripcionales que sirven para abrir el sitio de inicio de transcripción de la cromatina acetilando histonas, y forman un complejo con la maquinaria transcripcional basal.

Ciertos genes específicos de un tipo celular están marcados epigenéticamente de manera tal de evitar que se compacten durante la mitosis y asegurar una transcripción rápida. H4K5ac ha sido implicado como una de esas marcas (Zhao et al., 2011). Otros estudios han encontrado que H4K5ac puede servir como un iniciador para la transcripción rápida de ciertos genes, por ejemplo genes expresados durante el proceso de aprendizaje (Park et al., 2013).

H4K8 es otra lisina en la cola de la histona H4 que no recibe mucha atención. Al igual que los demás en este grupo, solo se sabe que está acetilado, y hasta ahora no se ha demostrado que esté metilado. Se sabe que este grupo de lisinas actúa como activadoras de la transcripción (Wang et al., 2008). Estas lisinas también son un excelente ejemplo de la hipótesis del código de histonas en acción. Se propone que H4K8ac es parte de una "columna vertebral" de 17 modificaciones que ocupan la mayoría de los promotores activos. H4K8ac se encontró con mayor frecuencia en

promotores activos y regiones transcritas que otras modificaciones que se encontraron más en sitios de inicio de la transcripción (Wang et al., 2008).

H4K8ac es catalizado y leído por un grupo de enzimas ligeramente diferente que otras lisinas de H4. Varias acetiltransferasas catalizan H4K8ac. En levadura, la acetiltransferasa GCN5 actúa sobre H4K8. GCN5 es parte del complejo co-activador SAGA (Larschan and Winston, 2001). Curiosamente, las proteínas de amplia acción, CBP/p300, no parecen leer H4K8. Sin embargo, H4K8 se une al complejo SWI/SNF (Agalioti et al., 2002). Estos datos son significativos porque CBP/p300 interactúa con el complejo de iniciación ARN pol II, mientras que SWI/SNF interactúa con el complejo de alargamiento (Cho et al., 1998). Esto sugiere que H4K8ac está involucrada en el alargamiento transcripcional, más que en la iniciación.

H4K12 es otro residuo en la región amino terminal de la histona H4 que se ha descrito como acetilada y no metilada. Al igual que H4K8ac, H4K12ac es parte de una "columna vertebral" de modificaciones de histonas que están asociadas con promotores activos (Wang et al., 2008). H4K12ac parece ser vital para el aprendizaje y la memoria. Un trabajo sobre H4K12ac mostró su importancia en el control de la expresión génica en el hipocampo asociada con la consolidación de la memoria (Peleg et al., 2010).

También se ha demostrado que H4K12ac es importante en la influencia paterna en la expresión génica temprana en el cigoto. Las acetilaciones de lisinas de H4 que pasan al cigoto pueden estar involucradas en el desarrollo embrionario temprano (van der Heijden et al., 2006). Otros estudios encontraron que H4K12ac se enriqueció alrededor de los sitios de inicio de la transcripción y que varios de estos genes se expresan a altos niveles en el cigoto temprano (Paradowska et al., 2012).

En relación al residuo H4K16, también presenta acetilación y no metilación. Si bien H4K16ac está asociado con la activación transcripcional, también puede estar relacionado con la represión. El bromodominio de TIP5, la subunidad mayor de NoRC que reconoce residuos de lisina acetilados, se une a H4K16ac. Después de la unión, el complejo NoRC sirve para silenciar el ADN reclutando HAT y DNMTs (Zhou and Grummt, 2005). Además, H4K16ac controla tanto las interacciones a nivel de nucleosomas como la estructura de la cromatina de orden superior (Shogren-Knaak et al., 2006). En términos de dinámica a nivel de nucleosomas, H4K16ac inhibe a la enzima ACF, impidiendo crear nucleosomas espaciados uniformemente, lo que facilita la

compactación de la cromatina y la represión transcripcional (Blosser et al., 2009). H4K16ac también inhibe la formación de la fibra de 30 nm y las interacciones entre fibras (Shogren-Knaak et al., 2006). Los resultados en conjunto sugieren que la región amino terminal de la histona H4 tiene un papel muy importante en el ensamblaje de la estructura de cromatina de orden superior. Esto también se refleja en el hecho de que H4 tiene una variación muy baja de secuencia entre diferentes especies (Thatcher and Gorovsky, 1994). A su vez, en casi todos los tumores humanos y líneas celulares de cáncer hay una reducción en H4K16ac. Esta reducción coexiste con una disminución en la metilación del ADN, aunque este mecanismo en la génesis tumoral aún no está claro (Fraga et al., 2005).

A diferencia de las otras lisinas de H4, donde la mayoría presenta acetilación y no metilación, el residuo H4K20 puede ser mono, di o trimetilado. En *G. lamblia* se observó dimetilación de H4K19. H4K20me1 está asociado con la activación transcripcional. Los grupos de genes más altamente transcritos tienden a tener presente H4K20me1 además del grupo central de modificaciones activas en los promotores (Wang et al., 2008). La enzima encargada de esta modificación, PR-Set7 (Beck et al., 2012), también es importante para la regulación del ciclo celular. En cuanto a la dimetilación de H4K20, se cree que es importante para el control del ciclo celular, particularmente para marcar los puntos de origen de replicación del ADN (Kuo et al., 2012). H4K20me2 también es importante en la respuesta al daño del ADN (Botuyan et al., 2006). La trimetilación de H4K20 cumple una función muy diferente a la de H4K20me1 y H4K20me2. En general, H4K20me3 está asociada con la represión de la transcripción cuando está presente en regiones promotoras (Wang et al., 2008). H4K20me3 también parece ser importante para silenciar secuencias repetitivas de ADN y transposones (Schotta et al., 2004). La pérdida de H4K20me3 junto con la reducción de H4K16ac, es una característica casi universal de cáncer en humanos (Fraga et al., 2005).

En cuanto a la metilación de argininas, en eucariotas se han descrito tres formas de metilación en este residuo; monometil-arginina, dimetil-arginina simétrica (Rme2s) y dimetil-arginina asimétrica (Rme2a). Se sabe que la metilación de argininas desempeña un papel importante en la regulación génica debido a la capacidad de las PRMTs de depositar activadores claves (H3R2me2s, H3R17me2a, H3R26me2a,

H4R3me2a) o represivos (H3R2me2a, H3R8me2a, H3R8me2s, H4R3me2s, H4R3me2s) (revisado en Blanc and Richard, 2017).

Se ha descrito que la metilación de H3R2, por la proteína PRMT6, contrarresta la marca de activación de H3K4me3, convirtiéndola en un represor transcripcional. La trombospondina-1 (TSP-1) fue el primer blanco caracterizado que es reprimido transcripcionalmente por PRMT6 (Michaud-Levesque and Richard, 2009). Sin embargo, la función de PRMT6 no está completamente dilucidada, ya que se ha demostrado que funciona como un co-activador con receptores nucleares (Harrison et al., 2010). En ciertos contextos, PRMT6 puede metilar H3R2 y reprimir la transcripción, y en otros contextos, puede metilar H4R3/H2AR3 y activar la transcripción (Hyllus et al., 2007).

A su vez, se ha propuesto que existe una interrelación entre la metilación de argininas y lisinas (Migliori et al., 2010). Existen varios pares de arginina/lisina, donde ambos residuos se encuentran metilados. Uno de ellos, el par H3R2/H3K4 el cual se observó en *G. lamblia*, ha sido bien definido. En las células de mamíferos, estas dos marcas pueden coexistir, porque PRMT6 puede metilar fuertemente los péptidos H3K4me1 y H3K4me2, y puede metilar débilmente el péptido H3K4me3 (Iberg et al., 2008). Sin embargo, la metilación previa del sitio H3R2 esencialmente evita que el complejo MLL1 (que codifica para una HKMT) metile H3K4 (Hyllus et al., 2007). No está claro si otras metiltransferasas de H3K4 están activas en un sustrato H3R2me2a (hay al menos nueve de ellas) (revisado en Di Lorenzo and Bedford, 2011). Por lo tanto, PRMT6 funciona como un represor transcripcional al bloquear el reclutamiento de activadores transcripcionales a la marca metilada H3K4.

Por último, en *G. lamblia* se encontró H3R18me2. Se ha informado que la metilación de H3R17 en células embrionarias, llevada a cabo por CARM1, es necesaria tanto para el establecimiento como para el mantenimiento del linaje astrogial (Selvi et al., 2015). A su vez, CARM1 es necesario para el mantenimiento epigenético de la pluripotencia y la autorrenovación, ya que metila H3R17 y H3R26 en los genes centrales de pluripotencia (Torres-Padilla et al., 2007; Wu et al., 2009).

Como se puede observar, existen muchas modificaciones post-traduccionales de histonas que parecen estar conservadas evolutivamente entre especies. Si bien aún quedan por descifrar las funciones de muchas de ellas, el análisis de las modificaciones

post-traduccionales de las histonas de *G. lamblia* muestra marcas conservadas y otras inesperadas que probablemente reflejen importantes adaptaciones biológicas. Por otro lado, la mayoría de los estudios realizados en células eucariotas se han obtenido a partir de líneas celulares, por lo que aún hay un campo más amplio a la hora de realizar comparaciones cuando se comiencen a describir estas modificaciones post-traduccionales en células no tumorales. Por lo tanto, creemos que esta primera descripción se verá en un futuro enriquecida no sólo por la utilización de equipos de avanzada de espectrometría de masa, que pueden identificar cada vez mayores modificaciones post-traduccionales, sino además por las descripciones en otros tipos celulares. De este modo, las modificaciones post-traduccionales que se han descrito como únicas en parásitos y que se sugieren como adaptaciones biológicas, quizás emerjan descritas en otras células en un futuro cercano.

Los avances en la comprensión de los reguladores génicos a nivel epigenético en los metazoos han llevado al desarrollo de nuevos compuestos que interfieren con los estados patógenos. Dada la importancia de la epigenética en la biología de los parásitos, la maquinaria epigenética de parásitos tiene potencial como nueva vía de investigación para el desarrollo de nuevos tratamientos de fármacos contra infecciones causadas por parásitos protozoarios.

En la **Figura 3.2** se resumen las modificaciones post-traduccionales encontradas en cada uno de los extremos amino terminales de las histonas de *G. lamblia*. También se indican los ensayos a tener en cuenta para completar los estudios funcionales de las enzimas HMTs que se observaron en los núcleos de *G. lamblia*, estudiadas en el Capítulo II.

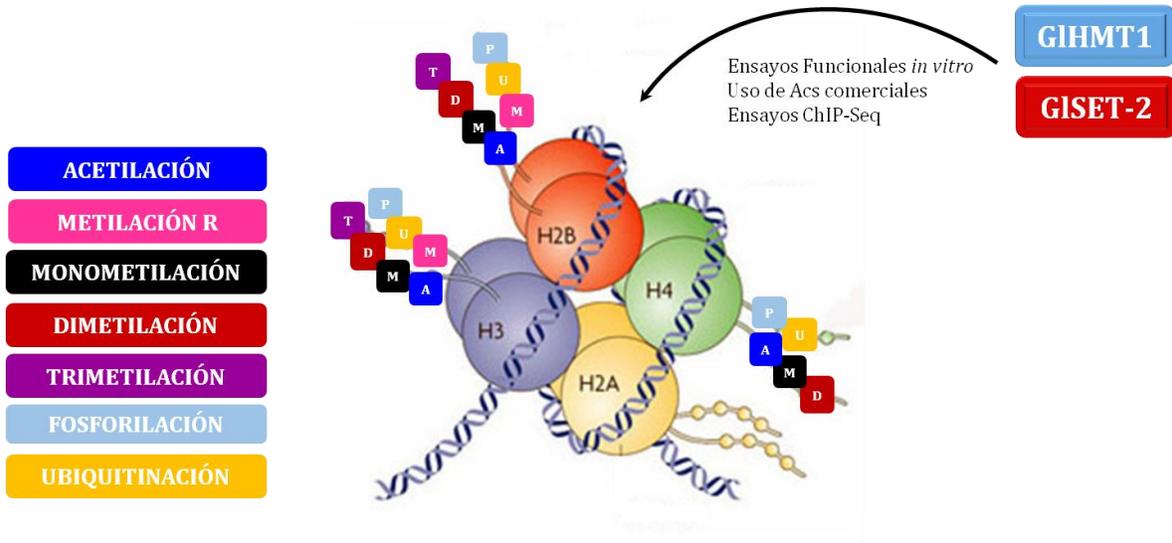
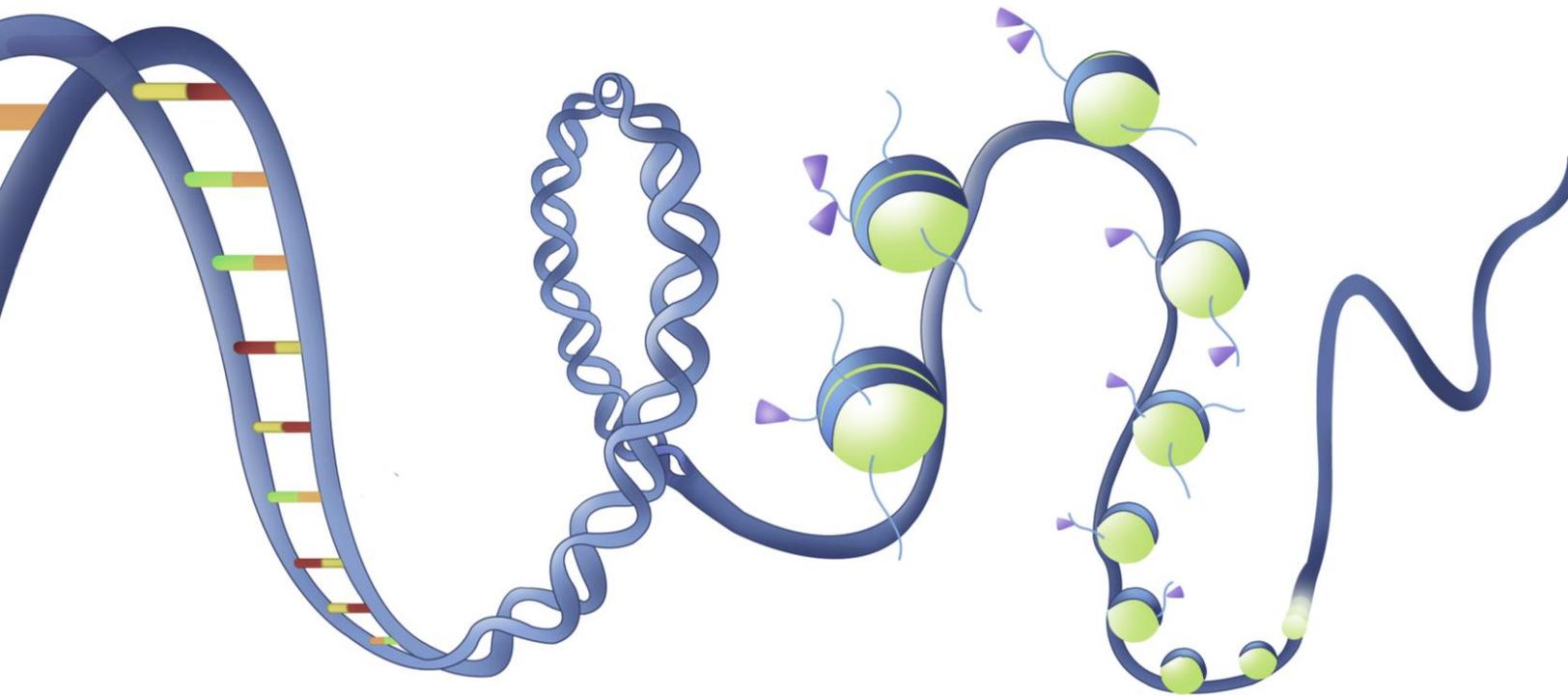


Figura 3.2: Resumen Capítulo III. Modificaciones post-traduccionales encontradas en cada uno de los extremos amino terminales de las histonas de *G. lamblia*. Debajo de la flecha se indican los ensayos a tener en cuenta para completar los estudios funcionales de las enzimas que se observaron en los núcleos de *G. lamblia*, GIHMT1 y GISET2, estudiadas en el Capítulo II.

Capítulo IV

CONCLUSIONES GENERALES



Capítulo IV: CONCLUSIONES GENERALES

La presencia de un genoma completamente secuenciado, la posibilidad de manipularlo genéticamente, y la capacidad de reproducir fácilmente su ciclo de vida *in vitro* hacen de *G. lamblia* un interesante organismo para la comprensión de varias funciones celulares y vías bioquímicas. En el presente *Trabajo de Tesis*, se abordaron temas relacionados con la epigenética de este parásito, describiendo las histonas metiltransferasas y las modificaciones post-traduccionales de histonas. El análisis del genoma de *G. lamblia* reveló la presencia de enzimas responsables de modificaciones post-traduccionales en las histonas, lo que sugiere que los mecanismos epigenéticos regularían la expresión génica en este parásito. Tres de estas enzimas fueron de principal interés en el presente trabajo, sugiriendo que la metilación de histonas es un posible disparador del proceso de enquistamiento. Se analizó el rol de la enzima GHMT1, observando que la sobre-expresión de esta enzima resultaba en una mayor producción de quistes. Asimismo, el análisis en intervalos de tiempo demostró que la sobre-expresión de GHMT1 inducía el proceso de enquistamiento más rápida y tempranamente con respecto al control, lo cual sugiere que la participación de esta enzima es crítica para el éxito y la sincronización del proceso de enquistamiento. A su vez, se describieron otras dos HMTs, GHMT2 y GISET2. Con respecto a HMT2, se observó que presenta una localización perinuclear durante el crecimiento del parásito, esa localización se va modificando hasta llegar a ser citoplasmática durante el enquistamiento y su sobre-expresión regularía de manera positiva el proceso. GISET2 presenta localización exclusivamente nuclear, y su sobre-expresión indicaría que estaría regulando de manera negativa el proceso de enquistamiento. Sin embargo, futuros estudios son necesarios para poder identificar los posibles sustratos de estas enzimas, como así también las proteínas con las cuales podrían estar interactuando o regulando, como por ejemplo proteínas no histonas.

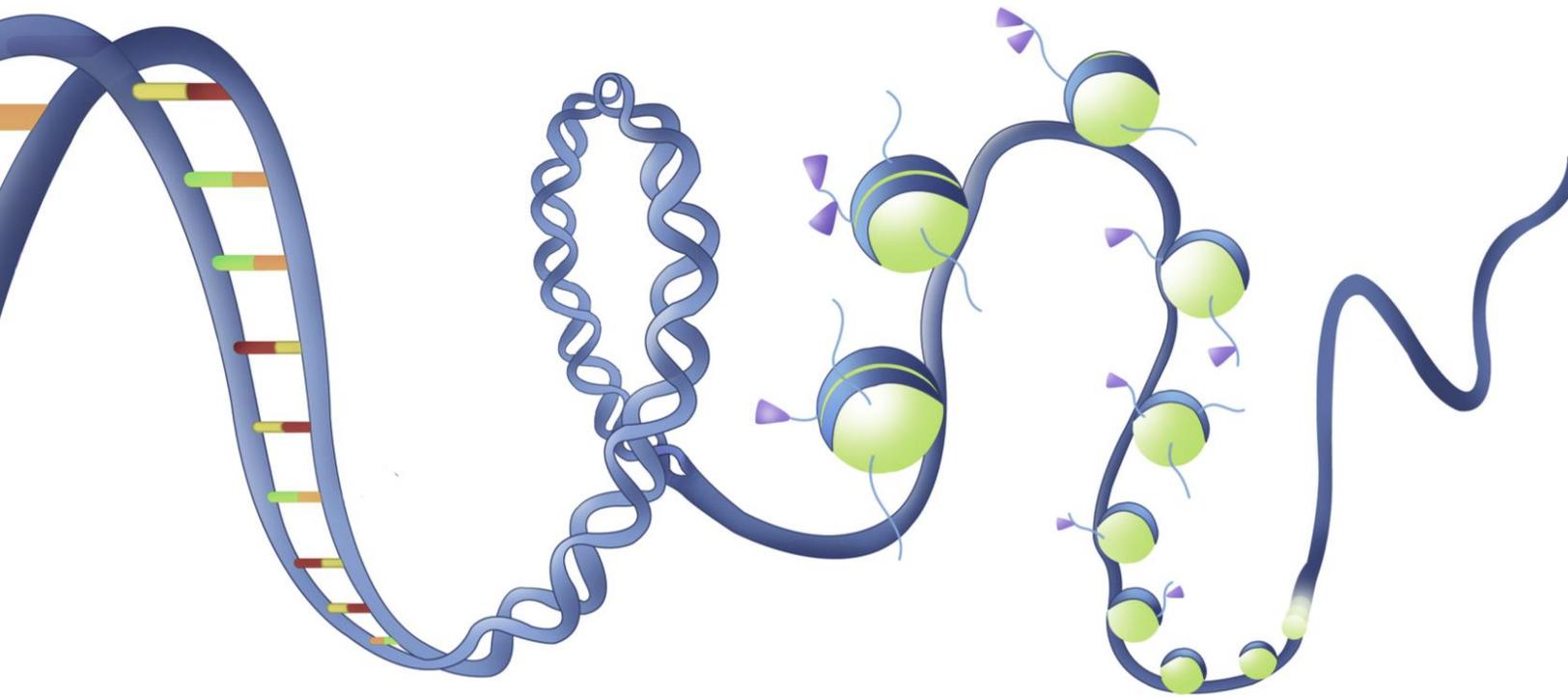
Las modificaciones post-traduccionales de histonas se encuentran hoy en día en el corazón del campo de la epigenética y la transducción de señales. Las modificaciones post-traduccionales están involucradas en casi todas las cascadas de señalización, a

menudo iniciando o amplificando señales dinámicas, que pueden ajustarse finamente para adaptarse a los requisitos celulares. Haber podido obtener por primera vez el “mapa” de las modificaciones post-traduccionales de las histonas de trofozoítos de *G. lamblia* es el principio de un estudio más profundo para lograr una mayor comprensión de este tipo de regulación. Cada respuesta genera aún más preguntas que conducen a la incorporación de ensayos tales como inmunoprecipitación de la cromatina seguido de secuenciamiento, los que permitirían avalar la presencia de estas marcas y las correlacionen con la expresión génica. A su vez, la purificación de histonas en diferentes etapas de enquistamiento y la posterior identificación de las modificaciones post-traduccionales de histonas serán etapas críticas para poder realizar una comparación entre los dos estadios del parásito, trofozoíto y quiste. Finalmente, la implementación de ensayos *in vitro* para identificar los sustratos de cada enzima serán claves para completar los estudios referidos a epigenética en *G. lamblia*.

El presente *Trabajo de Tesis* respalda en cierta manera la importancia de los mecanismos epigenéticos que influyen en la regulación de la expresión génica del parásito. Se sugiere que las enzimas que depositan y eliminan las modificaciones post-traduccionales son los blancos principales que ayudarán a desarrollar tratamientos para suprimir eficientemente la producción de quistes y, por lo tanto, reducir la transmisión de la enfermedad.

Capítulo V

MATERIALES Y MÉTODOS



Capítulo V: MATERIALES Y MÉTODOS

V. 1 Organismos y Cultivo *in vitro*

Los trofozoítos de *G. lamblia* se adquirieron en *American Type Culture Collection* (ATCC 50582) y son provenientes de la cepa WB, clon 1267 (Gillin et al., 1990). Para cultivarlos axénicamente se utilizó medio TYI-S-33 (pH 7) suplementado con 10% v/v de suero bovino adulto y 5% p/v de bilis bovina (medio completo de crecimiento) (Diamond et al., 1978). Todos los cultivos se realizaron en tubos de borosilicato con tapa a rosca (Eurotubo®, Deltalab), que se completaron con un volumen total de 14 ml con medio completo de crecimiento y con 100 µl de trofozoítos de *G. lamblia*. Los tubos se colocaron dentro de una estufa de cultivo a 37 °C en gradillas que se orientaron inclinadas en ángulos de aproximadamente 45° (lo que permita una mayor adhesión de los trofozoítos a las paredes del tubo). Luego de 30 min comienza a observarse la adhesión de los trofozoítos a las paredes del tubo a través de su disco ventral. De este modo, y de manera similar a lo que ocurre *in vivo*, se produce la división de las células obteniéndose a las 48h una monocapa de trofozoítos en etapas de crecimiento.

V. 1.1 Curva de Crecimiento Celular

Los trofozoítos fueron despegados de las paredes de los tubos mediante enfriamiento a 4°C durante 15 min y luego recuperados por centrifugación a 1455 x g por 15 min a 4 °C. Resuspendidos en medio o PBS (del inglés, *phosphate buffer saline*) se contaron en cámara de Neubauer y a cada tubo se les adicionó el volumen correspondiente que contuviese 5×10^5 células. Luego se incubaron a 37 °C y a cada tiempo evaluado las células fueron cosechadas como se mencionó anteriormente. Las células fueron contadas en cámara de Neubauer en presencia de Azul de Tripán 0,01% p/v, para distinguir tanto las vivas como las muertas. La *relación de crecimiento* final se calculó como el valor de células vivas a un dado tiempo, dividido por la cantidad de células iniciales (5×10^5).

V. 1.2 Enquistamiento

El proceso de enquistamiento *in vitro*, se llevó a cabo en dos etapas. En la primera, se descartó el medio de crecimiento de los trofozoítos cultivados hasta confluencia durante 24h y los tubos, conteniendo trofozoítos adheridos a su pared, se completaron con medio de pre-enquistamiento (PE) (medio completo de crecimiento sin bilis bovina). Finalmente, el medio de PE fue reemplazado por medio de enquistamiento, que posee una concentración de bilis porcina de 0.45%, y de ácido láctico al 0.01%, cambiándose el pH del medio a 7.8 (Boucher and Gillin, 1990). Este cambio de medio induce la diferenciación de trofozoítos a quistes, los cuales pierden la capacidad de adherencia y permanecen libres en el medio de enquistamiento. El periodo de enquistamiento para cada experimento en particular se detalla en la sección de Resultados.

Para recolectar los quistes, a cada tiempo de evaluación se centrifugaron los tubos a 1455 x g durante 15 min, sin previo enfriamiento de los mismos. Se los resuspendió en PBS y se los contó en cámara de Neubauer.

V. 1.3 Evaluación de Estadios y recuento de ESVs

Los quistes fueron recolectados junto con las células pegadas, es decir, se enfriaron los tubos por 15 min para luego ser centrifugados 1455 x g por 15 min a 4 °C. Se resuspendieron en PBSm (PBS + medio de crecimiento al 1%, pH 7,4) para realizar ensayos de inmunofluorescencia (IFA) y contar las células en los diferentes estadios y/o ESVs por campo para cada tiempo de evaluación.

V. 2 Análisis Bioinformáticos (*in silico*)

V. 2.1 Minería de Datos

Utilizando EuPathDB (<https://eupathdb.org/eupathdb/>) (Aurrecoechea et al., 2017) se obtuvieron los proteomas completos de los siguientes protozoarios: *C. parvum*, *P. falciparum*, *T. gondii*, *T. vaginalis*, *T. cruzi*, y *G. lamblia* ensamblajes A, A2, B, B2, y E. El perfil HMM para el dominio SET (PF00856) fue obtenido de Pfam (<https://pfam.xfam.org/>) (Finn et al., 2014). Las secuencias conteniendo el dominio SET fueron reunidas utilizando HMMER (Finn et al., 2011). Ambas búsquedas se

realizaron con la configuración predeterminada. Se recaudaron un total de 196 secuencias y cada una fue escaneada con los servidores Prosite y Pfam (<http://prosite.expasy.org/>) para encontrar señales y dominios específicos. Estas secuencias fueron usadas para crear un archivo de entrada para realizar un alineamiento múltiple de secuencias o MSA (del inglés, *Multiple Sequence Alignment*) en la versión en línea de MAFFT (<http://mafft.cbrc.jp/alignment/server/>) con los ajustes predeterminados (Kato et al., 2002; Kato and Standley, 2013). El alineamiento resultante se curó a mano bajo criterio físico-químico de los aminoácidos y fue utilizado para crear un perfil HMM con toda la extensión de secuencia de dicho alineamiento (Eddy, 1998).

V. 2.2 Reconstrucción Filogenética

El análisis filogenético fue llevado a cabo bajo Máxima Verosimilitud o ML (del inglés, *Maximun Likelihood*) utilizando PHYML con pruebas de relación de verosimilitud aproximada o aLRT (del inglés, *approximate Likelihood-Ratio Test*) de 100 interacciones con los ajustes por defecto (Guindon et al., 2010). Las secuencias se agruparon en clados monofiléticos. Solo aquellos grupos con más de 10 secuencias fueron considerados para la reconstrucción. El agrupamiento fue analizado por HMMerCTTer (<http://lidecc.cs.uns.edu.ar/cab2c2015/proceedings/handle/1234/127>) y SDPFOX (<http://bioinf.fbb.msu.ru/SDPfoxWeb/main.jsp>) (Mazin et al., 2010). El porcentaje máximo permitido de brechas se estableció en 90%, lo que resultó en seis grupos bien definidos. Para mejorar la visualización del árbol, la filogenia fue editada con iTOL (<http://itol.embl.de/>) (Letunic and Bork, 2011).

V. 2.3 Análisis Estructural

Para analizar la estructura de la proteína codificada por el gen GL50803_9130, se predijo la estructura 3D utilizando tres servidores distintos: I-TASSER (<http://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER>) (Yang et al., 2015; Yang and Zhang, 2015), PHYRE2 (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/~phyre2>) (Kelley et al., 2015), y RAPTORX (<http://raptorx.uchicago.edu/>) (Kallberg et al., 2012).

Para la visualización de estas estructuras se utilizó el programa VMD, además de ser usado para realizar los alineamientos 3D paralelamente a RaptorX (Eargle et al., 2006;

Humphrey et al., 1996; Wang et al., 2011). Estos alineamientos 3D fueron llevados a cabo tanto para evaluar la estructura predicha, como para compararlas con estructuras cristalográficas. La estructura de ASHL1 de *H. sapiens* fue obtenida del banco de datos de proteínas o PDB (del inglés, *Protein Data Bank*) (<http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>) bajo la identificación 3OPE (An et al., 2011). La predicción del sitio de localización nuclear NLS fue llevada a cabo por cNLS Mapper (http://nlsmapper.iab.keio.ac.jp/cgi-bin/NLS_Mapper_form.cgi) y NUCPRED (<https://www.sbc.su.se/~maccallr/nucpred>) (Brameier et al., 2007; Kosugi et al., 2009).

Los análisis de coevolución fueron realizados por MISTIC (<http://mistic.leloir.org.ar/index.php>) bajo configuraciones predeterminadas con la estructura obtenida de I-TASSER y la secuencia de estructura obtenida de I-TASSER y, la secuencia de GL50803_9130 primero en el MSA (Simonetti et al., 2013).

Se predijeron interacciones proteína-proteína con histona metiltransferasa 1, combinando el enfoque Interlogog (Zamponi N, resultados no publicados), e información recuperada de la base de datos STRING. Solo se consideraron las interacciones validadas experimentalmente con puntuaciones superiores a 900 (STRING v10: redes de interacción proteína-proteína, integradas sobre el árbol de la vida).

V. 3 Purificación y Análisis de Ácidos Nucleicos

El ARN total fue extraído a partir de trofozoítos y quistes, de acuerdo a lo informado (Lujan et al., 1995a). Para ello, el ARN se aisló usando el reactivo Trizol (Invitrogen Corporation, Carlsbad CA, US) y una segunda purificación se realizó utilizando el sistema de aislamiento de ARN total SV (Promega, Madison, WI, US). El ARN extraído se trató con la enzima ADNsa I libre de ARNsa (Promega, Madison, WI, US).

El ADN genómico fue purificado siguiendo el protocolo de extracción con fenol y precipitación con alcohol isopropílico (Sambrook and Gething, 1989).

V. 4 Retrotranscripción por Reacción en Cadena de la Polimerasa (RT-PCR)

El ARN total de las células de la cepa salvaje (*wt*) y de las células que sobre-expresan *GHMT1*, *GHMT2* y *GISET2* en crecimiento y a diferentes tiempos de enquistamiento fue extraído y purificado. Se retro-transcribieron 2 µg de RNA de cada condición utilizando la enzima transcriptasa reversa M-MLV (Promega, Madison, WI, US) y Oligo (dT) 15 primer (Biodynamics) en un volumen final de 20 µL por reacción bajo las siguientes condiciones: 60 min a 37°, 5 min a 95° y 50 min a 10° obteniendo finalmente el ADNc.

V. 5 PCR en Tiempo Real

Los ADNc fueron utilizados para el análisis de la expresión de genes utilizando la mezcla *PCR SYBR Green Master Mix* para qPCR (Thermo Fisher Scientific Inc), ADNc de simple cadena (100 ng) y cebadores a una concentración de 800 nM, en un volumen final de 20 µL por reacción. Los ensayos se realizaron en un equipo 7500 estándar (Applied Biosystems, USA), bajo las siguientes condiciones: 2 min a 50 °C, 10 min a 95 °C y 40 ciclos de [95 °C por 15 s y 60 °C por 1 min]. Como control endógeno se utilizó el gen *18S*. En cada corrida se realizaron dos réplicas para cada par de cebadores, para cada cepa y cada condición. Los ensayos se realizaron por triplicado. Los niveles de los transcriptos de cada gen fueron normalizados a los niveles de ARNm del gen endógeno *18S* y calculados utilizando el método comparativo $\Delta\Delta C_t$ (Livak and Schmittgen, 2001) y la condición *wt* como segundo normalizador. El análisis estadístico de los datos se llevó a cabo utilizando el programa *GraphPad Prism* (GraphPad Software, Inc.). La significancia estadística se delimitó en valor $p < 0,05$. Los datos se representan como media \pm EEM. Todos los cebadores fueron sintetizados por Invitrogen (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, US) para la detección de los genes *18S*, *cwp1*, *cwp2*, *cwp3*, *myb1-like protein*, *hmt1*, *hmt2*, y *set2*, y se detallan en la **Tabla 5.1**. La eficiencia de los cebadores fue puesta a punto mediante ensayos de PCR en tiempo real utilizando cuatro diluciones seriadas de ADNc (desde 10 ng/µl hasta 0,01 ng/µl).

Tabla 5.1: Secuencia de cebadores utilizados en ensayos de PCR en tiempo real

Cebadores	Secuencia (5'-3')	Eficiencia (%)
18s_real_Fw	AAGACCGCCTCTGTCAATCAA	93
18s_real_Rv	GTTTACGGCCGGGAATACG	
cwp1_real_Fw	AACGCTCTCACAGGCTCCAT	105
cwp1_real_Rv	AGGTGGAGCTCCTTGAGAAATTG	
cwp2_real_Fw	TAGGCTGCTTCCCACTTTTGAG	90.9
cwp2_real_Rv	CGGGCCCGCAAGGT	
cwp3_real_Fw	GCAAATTGGATGCCAAACAA	88
cwp3_real_Rv	GACTCCGATCCAGTCGCAGTA	
myb1_real_Fw	TCCCTAATGACGCCAAACG	99
myb1_real_Rv	AGCACGCAGAGGCCAAGT	
hmt 1_real_Fw	AAGCTGTGAGCTCAGGAAGG	103.6
hmt 1_real_Rv	CTGCGCAGCACTCTTTGTAG	
hmt 2_real_Fw	TCGGCTCTACCTTCCAGACA	92.1
hmt 2_real_Rv	CTGGTCTGCTCTGGTCACTG	
set 2_real_Fw	GCTCCAGTCATCCACAGAG	93.6
set 2_real_Rv	GTCATACTGAAGCCACCCA	

Fw: sentido Rv: anti-sentido

V. 6 Amplificación y Clonado de Proteínas

V. 6.1 Amplificación de genes para la sobre-expresión de proteínas

Las secuencias de los genes que codifican para las proteínas de interés fueron obtenidas de la base de datos de *Giardia*. El ADN genómico de *G. lamblia* fue utilizado como templado para amplificar, mediante la reacción en cadena de la polimerasa o PCR (del inglés, *Polymerase Chain Reaction*), la secuencia codificante de cada gen de interés (considerando que este parásito carece de intrones). Se diseñaron manualmente cebadores para cada gen (Tabla 5.2), a los fines de permitir el clonado de los fragmentos de interés en un vector específico para *G. lamblia*. En cada cebador, se subraya la secuencia reconocida por cada enzima de restricción utilizada. Todos los primers fueron sintetizados por Invitrogen (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, US) y almacenados a -20 °C. Las diluciones se realizaron en agua tratada con Dietil-pirocarbonato.

La amplificación por PCR se llevó a cabo empleando la enzima *Taq Platinum High Fidelity* (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, US) de acuerdo a las siguientes condiciones de reacción: 2 min a 94 °C, 30 ciclos de [30 s a 94 °C, 30 s a 55 °C y 2 min a 72 °C] y luego 10 min a 72 °C para la extensión final. El análisis de los productos de PCR se realizó sembrando 5 µL del producto de reacción en geles de agarosa. Éstos fueron preparados en solución tampón TAE (Tris-Acetato 0,04 M, EDTA 1 mM, pH 8) al 1,2% de agarosa y con el agregado de *SYBR® Safe DNA Stain* (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, US) para el teñido de las bandas. Las muestras fueron sembradas con solución de siembra (Azul de bromofenol 0,09% p/v, Xileno Cianol FF 0,09% v/v, Glicerol 60% v/v). Las electroforesis fueron realizadas en la misma solución TAE durante 40 min a 100 V y finalmente se visualizaron mediante la exposición a *Safe Image™ Blue-Light Transilluminator* (Invitrogen). Los productos de PCR se purificaron mediante el empleo de un ensayo comercial *Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System* (Promega, Madison, WI, US).

Tabla 5.2: Secuencia de cebadores diseñados para el clonado y expresión de proteínas

Cebadores	Secuencia (5'-3')
hmt 1_Fw	CATT CCATGGG CAAAGTAATGGCAATGAAG
hmt 1_Rv	CATT GATATC TGTCCTTAACTTTGGTGCATC
hmt 1 pe_Fw	CATT TCTAGAC GATGAATTCGTGAAATCTCTTG
hmt 2_Fw	CATT GGATCC ATGCAGTTTCTATCAACATCAAGC
hmt 2_Rv	CATT GCGGCCG CTTAGTGAATCTCCTCATTGGCTTC
set 2_Fw	CATT GGATCC ATGTCAGCTGACTACCGATTACGC
set 2_Rv	CATT GCGGCCG CTCAATTCATATAAAGTCTACATCG

Fw: sentido; **Rv:** anti-sentido; **CCATGG** secuencia reconocida por *NcoI*; **GATATC** secuencia reconocida por *EcoRV*; **TCTAGA** secuencia reconocida por *XbaI*; **GGATCC** secuencia reconocida por *BamHI*; **GCGGCCGC** secuencia reconocida por *NotI*.

V. 6.2 Vectores de expresión en *G. lamblia*

Para expresar constitutivamente la enzima GlHMT1, se utilizó el vector pTubApa-H7-HApac (**Figura 5.1**). Este plásmido permite la expresión constitutiva y

estable de genes en trofozoítos de *G. lamblia* gracias a la presencia del promotor de tubulina y a la selección con el antibiótico puromicina, respectivamente. El *cassette* de puromicina se encuentra bajo el control del promotor endógeno no regulado de *gdh*. Las proteínas se expresan fusionadas a 3 repeticiones en tándem de la proteína hemaglutinina (HA) del subtipo H3 del virus influenza (YPYDVPDYA) en su extremo carboxilo-terminal antes del codón de terminación TAA. El plásmido pTubH7HApac posee el gen de la VSPH7 de la cepa GS de *G. lamblia* que puede ser removido con las endonucleasas *NcoI/ApaI* y *EcoRV* (Invitrogen) posibilitando el clonado de otros genes en dicho vector. El clonado de marco de lectura abierto (*ORF* del inglés, *Open Reading Frame*) de cada una de las proteínas en el vector de pTubApa-H7-HApac permite expresarlas constitutivamente para su posterior localización subcelular en trofozoítos de *G. lamblia* (Touz et al., 2002; Touz et al., 2004; Touz et al., 2003).

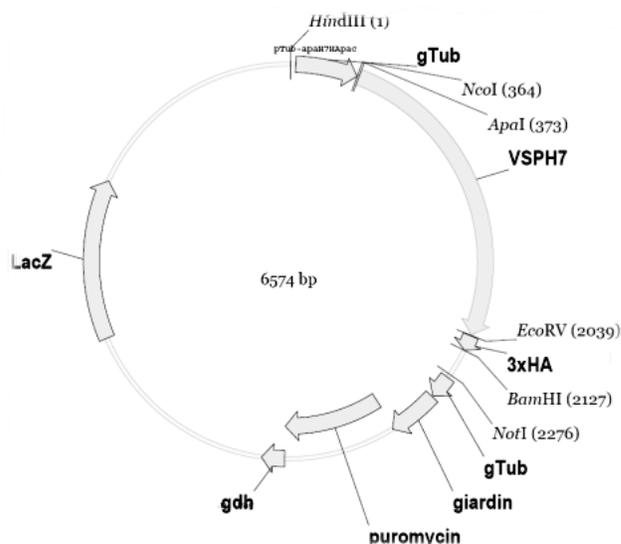


Figura 5.1: Vector pTubApa-H7-HApac. El vector original expresa a la proteína VSPH7-HA mediante promotores de tubulina. Contiene además el gen *puromicina* y *LacZ* para expresar células estables en *G. lamblia* y *E. coli*, respectivamente. Para clonar un nuevo gen que exprese una proteína de fusión-HA, el vector puede ser restringido con las enzimas *NcoI* o *ApaI* (región 5') y *EcoRV* (región 3').

Para expresar endógenamente la enzima GIHMT1, se construyó el vector eHMT1-HA reemplazando el promotor de tubulina de pTubApa-H7-HApac (**Figura 5.1**) por una secuencia que contenía el posible promotor endógeno, en este caso utilizando el cebador hmt1 pe_Fw (**Tabla 5.2**).

Para la expresión de las enzimas GIHMT2 y GISET2 se utilizó el vector de expresión pTub-HA (**Figura 5.2**). Este vector también es específico para *G. lamblia*, fue construido en colaboración con el Dr. Aron Neiman de la Universidad de Stony Brook (NY, US) y contiene el promotor de $\alpha 2$ -tubulina y la región 5' del gen β -giardina del

parásito. Se caracteriza, además por expresar las proteínas con una etiqueta HA en el extremo amino terminal.

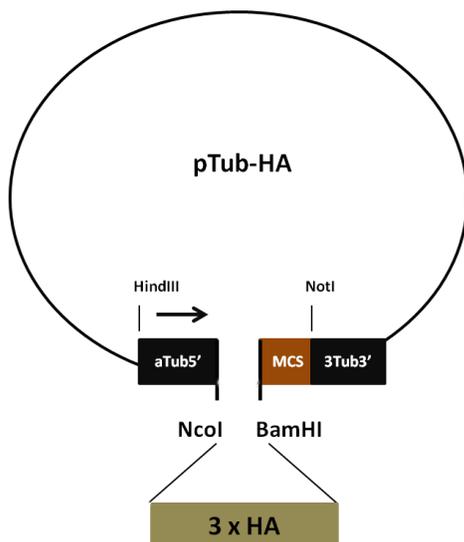


Figura 5.2: Vector pTub-HA. Este vector permite la expresión de proteínas fusionadas a 3 repeticiones en tándem de la proteína hemaglutinina (HA) en su extremo amino- terminal. Para clonar el gen de interés el vector contiene una región de policlonado (*MCS* del inglés, *Multiple Clonaje Sequence*) puede ser restringida con las enzimas *BamHI* (región 5') y *NotI* (región 3').

V. 6.3 Corte del vector e inserto utilizando enzimas de restricción

El marco de lectura abierto que codifica para cada gen de interés fue clonado en el vector de expresión correspondiente, según cada caso. Para *hmt1*, el fragmento de 897pb fue incubado con *NcoI/EcoRV* por 2 h a 37 °C (corte) y luego 10 min a 70 °C (inactivación de la enzima). Para *hmt2* y *set2*, los fragmentos de 2034 pb y 2079 pb, respectivamente, fueron incubados cada uno con *BamHI/NotI* por 2 h a 37 °C (corte) y 10 min a 70 °C (inactivación de la enzima). Se adicionó además los reactivos comerciales BSA 10X, Buffer 3 para todos los casos. Todas las enzimas de restricción utilizadas, a excepción de *BamHI* (Fermentas), pertenecen a New England, Biolabs.

Los productos de restricción se chequearon en gel de agarosa al 1% como se detalla en la Sección V. 6.1 y el vector se purificó a partir del gel mediante el empleo del ensayo comercial *Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System* (Promega, Madison, WI, US).

V. 6.4 Ligación del producto de corte

Los insertos y vectores se ligaron mediante la incubación con la enzima T4 ADN Ligasa (Fermentas) por 16 h a 16 °C, seguido de 10 min a 70 °C para inactivar la enzima. La relación inserto:vector fue de 3:1 para todos los casos y de 7:1 para *hmt2*.

V. 6.5 Preparación de bacterias competentes

Bacterias *Escherichia coli* (Top10) fueron crecidas en 5 mL de LB/Tetraciclina estéril (Peptona 1% p/v, extracto de levadura 0,5% p/v, Tetraciclina (Tet) 15 mg/mL en 100 mL de agua destilada) a 37 °C en agitación toda la noche. Luego 1 mL de este cultivo fue empleado para inocular 250 mL de LB/Tet (15 µg/mL) y cultivado en *Erlenmeyer* a 18 °C en agitación hasta alcanzar una densidad óptica (OD) aproximadamente de 0,6. Cuando se alcanzó este valor, las bacterias se incubaron 10 min en hielo. Posteriormente, se centrifugaron a 2095 x g por 10 min a 4 °C y se resuspendió el precipitado en 80 mL de buffer TB frío (Pipes 10 mM, MnCl₂ 55 mM, CaCl₂·2H₂O 15 mM, KCl 150 mM, pH 7). Las bacterias se incubaron nuevamente 10 min en hielo y se centrifugaron a 2095 x g por 10 min a 4 °C. El precipitado se resuspendió en 20 mL de buffer TB frío y se agregaron 1,5 mL de dimetilsulfóxido (DMSO) de forma cuidadosa para evitar toxicidad en las células (concentración final 7% v/v). Luego, las bacterias se fraccionaron en alícuotas de 200 µL en tubos estériles, congelándose en N₂ líquido y manteniéndose a -70 °C.

V. 6.6 Transformación de *E. coli*

Las bacterias Top10 competentes se transformaron con el vector conteniendo el gen de interés, mediante shock térmico: 15 min a 4 °C, 30 seg a 42 °C y 2 min a 4 °C. Luego, se adicionó 1 mL de LB+ (medio LB suplementado con glucosa 0,4% p/v y MgCl₂ 0,2% p/v) y se dejó en agitación durante 1 h a 37 °C. Después de centrifugar a 2851 x g durante 5 min, se retiró el sobrenadante y el precipitado se resuspendió en 200 µL de LB. Finalmente, las bacterias transformadas se plaquearon en LB-ampicilina (25 mg/mL)-agar 1,2% p/v y se incubaron toda la noche en estufa a 37 °C.

V. 6.7 Chequeo de colonias por PCR

Las colonias obtenidas luego de la transformación se chequearon mediante PCR utilizando la enzima *Taqpol* (Invitrogen), empleando *primers* específicos para cada gen de interés o del vector utilizado, y en las mismas condiciones de reacción detalladas anteriormente para la PCR del inserto. De igual manera, el análisis de los productos de PCR se llevó a cabo mediante corridas electroforéticas en geles de agarosa al 1%. Las

colonias positivas se crecieron en LB líquido con Ampicilina (25 mg/mL) y se cultivaron ON en agitación a 37 °C.

V. 6.8 Purificación del plásmido

Los cultivos de bacterias incubados ON fueron centrifugados a 3500 x g por 10 min a 20°C y se purificaron utilizando un ensayo comercial *Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System* (Promega, Madison, WI, US). Las secuencias de todos los constructos se enviaron para su secuenciación a la compañía MacroGen (<http://www.macrogen.com>) y corroborar de esta forma el correcto ORF.

V. 6.9 Transfección de trofozoítos de *G. lamblia* cepa WB/1267

Para cada una de las transfecciones se partió de trofozoítos crecidos en monocapa. Las células fueron enfriadas y centrifugadas a 1455 x g por 15 min a 4°C, el sobrenadante se descartó y el precipitado se resuspendió en 350 µL de medio completo adicionando 40 µL de plásmido de concentración 1 µg/µL. La transfección se realizó mediante electroporación (Electro Square Porator™ ECM 830) aplicando 1 pulso de 14 ms a 350 V, 725 Ω y 1000 µF en una cubeta de 4 mm. Seguidamente, la muestra fue incubada en hielo durante 10 min y luego trasvasadas a un tubo de vidrio de 8 mL conteniendo medio completo y los antibióticos Piperacilina (500 µg/mL, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, US) y Moxalactam (333 µg/mL, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, US). Luego de cultivar los trofozoítos ON a 37°C, se agregó Puromicina (10 µg/mL) (Invitrogen, San Diego, CA, US) para seleccionar aquellas células que estuvieran transfectadas. La expresión de las proteínas de interés se visualizó por IFA y ensayos de western blot. (Elmendorf et al., 2001; Singer et al., 1998).

V. 7 Regulación Negativa de Proteínas (generación del anti-sentido)

Nucleótidos comprendidos entre las regiones 247-1246 y 402-1402 pertenecientes al ORF de *hmt2* y *set2*, respectivamente, fueron amplificados utilizando los cebadores *hmt2-as_Fw*, *hmt2-as_Rv*; *set2-as_Fw*, *set2-as_Rv* (**Tabla 5.3**). La banda obtenida fue digerida por acción de las enzimas *NotI* y *BamHI* e introducida en el vector pTub-HA en dirección opuesta resultando un vector anti-sentido que fue utilizado para la inhibición de GIHMT2 y GISET2.

La secuencia completa del ORF de *hmt1* fue amplificada utilizando los cebadores *hmt1-as_Fw* y *hmt1-as_Rv* (**Tabla 5.3**). La banda obtenida fue digerida por acción de las enzimas *NcoI* y *EcoRV* e introducida en el vector pTubApa-H7-HApac (**Figura 5.1**) en dirección opuesta resultando un vector anti-sentido que fue utilizado para la inhibición de la expresión de GIHMT1.

Los vectores pHMT1-AS, pHMT2-AS y pSET2-AS fueron empleados para la transfección estable de trofozoítos de *G. lamblia* clon WB1267 produciendo células deficientes de GIHMT1, GIHMT2 y GISET2, las cuales se nombraron *glhmt1-as*, *glhmt2-as* y *glset2-as*, respectivamente. La producción de antisentido así como la depleción de *hmt1*, *hmt2* y *set2* fueron confirmadas por PCR en tiempo real previo al resto de los análisis.

Tabla 5.3: Secuencia de cebadores diseñados para generar el silenciamiento de proteínas

Cebadores	Secuencia (5'-3')
hmt 1-as_Fw	CATT CCATGG TATAATCGAAGCTAAGCTCTTCA
hmt 1-as_Rv	CATT GATATC ATGGGCAAAGTAATGGCAATGAAG
hmt 2-as_Fw	CATT GCGGCCGC CAGGACCGTCATGAGTAGGGACGAT
hmt 2-as_Rv	CATT GGATCC CCTACCAAATTAAGAATCCATGGAC
set 2-as_Fw	CATT GCGGCCGC CCCAGATTGGCCTTTCGGAAGCGGC
set 2-as_Rv	CATT GGATCC TATGAATCGCTTGGACAAGAGCAT

Fw: sentido; **Rv:** anti-sentido; **CCATGG** secuencia reconocida por *NcoI*; **GATATC** secuencia reconocida por *EcoRV*; **GCGGCCGC** secuencia reconocida por *NotI*; **GGATCC** secuencia reconocida por *BamHI*.

V. 8 Ensayos de Inmunofluorescencia (IFA)

Los trofozoítos se lavaron con *PBSm* (*PBS* 1X+medio de crecimiento al 1%, pH 7,4) y posteriormente se permitió la adherencia a portaobjetos (previamente tratados con poli-L-lisina) a 37°C en cámara húmeda. Después de la fijación con formaldehído al 4%, las células se lavaron y se bloquearon con *PBS* 1X conteniendo 10% de suero normal de cabra (Gibco®, Life Technologies, Carlsbad, CA, US) y Triton X-100 al 0.1%. A continuación, las células fueron incubadas con Ac específico (anti-HA) diluido en solución de Ac (*PBS* 1X conteniendo 3% de suero normal de cabra y Tritón X-100 al 0.1%), seguido de incubación con Ac secundario (anticuerpo de cabra anti-ratón)

conjugado a Alexa-488, Alexa-546, FITC o Texas red. Para los casos en que fue necesario se utilizó el Acm anti-CWP1. Para visualizar los núcleos de las células se utilizó el colorante de ADN, *DAPI* (del inglés *4',6-diamidino-2-phenylindole*) (Invitrogen Corporation, Carlsbad CA, US) diluido en PBS a una concentración de 1 µg/mL, incubado durante 1 min. La lista de anticuerpos utilizados se detalla en la **Tabla 5.4**. Por último, las preparaciones se lavaron y se montaron en medio de montaje Vectashield (Vector Laboratories, Burlingame, CA, US).

La marcación fluorescente se visualizó a través de un microscopio confocal *Olympus FV1000* motorizado (Olympus UK Ltd, Reino Unido), utilizando objetivos de inmersión en aceite (NA 1,32) 63X o 100X. Los fluorocromos se excitaron usando un láser de argón a 488 nm y un láser de criptón a 568 nm. *DAPI* se visualizó mediante excitación con luz ultravioleta utilizando un láser de argón 364 nm. Las hendiduras de detección fueron configuradas para reducir al mínimo cualquier cruce de señal entre los canales. Las imágenes de contraste diferencial de interferencia o DIC (del inglés, *Differential Interference Contrast*) se recogieron simultáneamente con las imágenes de fluorescencia. Finalmente las imágenes fueron procesadas utilizando los programas *ImageJ* y *Adobe Photoshop 6.0* (Adobe Systems).

Para los análisis cuantitativos, las imágenes fueron expuestas y procesadas idénticamente. Los datos fueron estadísticamente evaluados utilizando test de Student y análisis de la varianza (ANOVA). Los gráficos correspondientes al análisis de estos datos fueron realizados con el programa *GraphPad Prism* (GraphPad Software, Inc.).

Tabla 5.4: Anticuerpos utilizados en los ensayos de IFA

Anticuerpo	Procedencia	Dilución	Casa Comercial
Anti-HA	Monoclonal de ratón	1:1250	Sigma (St Louis, MO, US)
AlexaFluor-488	Monoclonal de cabra	1:500	Molecular Probes, Eugene, Oregon, US
Alexa Fluor-546	Monoclonal de cabra	1:500	Molecular Probes, Eugene, Oregon, US
Texas Red-586	Policlonal de ratón	1:500	Cappel Laboratories
Anti-CWP1 FITC	Monoclonal de ratón	1:500	Waterborne, New Orleans, LA

V. 9 Análisis de Colocalización Cuantitativa (QCA del inglés, *Quantitative Colocalization Analysis*)

El análisis cuantitativo de colocalización se realizó sobre imágenes obtenidas por inmunofluorescencia y microscopía confocal, utilizando el paquete de procesamiento de imágenes *Fiji* (<http://fiji.sc/wiki/index.php/Fiji>). La señal de fondo se corrigió usando un valor de umbral para todos los canales de manera de corregir la señal completamente. Posteriormente, se examinó el coeficiente de correlación según *Manders* (M). Los valores de M están en el rango de 0 a 1,0. Si el análisis de la imagen arroja como resultado un coeficiente de correlación de 0,5, implica que en el 50% de los píxeles, hay solapamiento. Un valor de cero, significa que no hay píxeles superpuestos. Este coeficiente no es sensible a las limitaciones típicas de las imágenes de fluorescencia (García Penarrubia et al., 2005; Zinchuk et al., 2007). Se considera que hay colocalización en el rango de 0.7 a 1.0.

V. 10 Preparación de extractos proteicos

Para detectar la expresión proteica de los vectores de expresión transfectados, trofozoítos de las cepas *glhmt1-ha*, *glehmt1-ha*, *glhmt2-ha* y *glset2-ha* fueron cosechados en PBS con inhibidor de proteasas al 2% p/v (Hoffmann-La Roche, Basilea, Suiza) y lisados por ultrasonido con 15 pulsos de 10 s y 30% amplitud con intermitencia de 2 s (Vibra-Cell, Sonics and Materials Inc, CT, US).

V. 11 Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida

Se utilizaron 10 µg de proteínas totales de lisados de parásitos en solución amortiguadora de muestra o SAM (Tris-HCl 0,5 M pH= 6,8, SDS 10% p/v, azul de Bromofenol 0,5% p/v y glicerol 20% v/v) en presencia o ausencia de β-mercaptoetanol 5 mM, y se hirvieron por 10 min (Laemmli, 1970).

La separación de las proteínas se realizó en geles de Bis-Tris al 12%-15%. La electroforesis fue realizada utilizando el sistema BioRad Mini-Protean II, a potencial constante de 200 V.

V. 12 Ensayos de Western Blot

La transferencia de proteínas desde los geles a membranas de nitrocelulosa (Amersham Hybond™ ECL™, Little Chalfont, UK) se realizó a corriente constante de 250 mA, por 2 h a 4 °C (Trans-Blot® SD, Bio-Rad) en tampón Tris 20 mM, glicina 150 mM y metanol al 20% v/v (Towbin et al., 1979). Finalizada la transferencia, las membranas fueron bloqueadas con 5 % de leche en polvo con bajo contenido graso (Molico, Nestle®) y Tween 20 al 0,1% v/v (Sigma- Aldrich, St. Louis, MO, US), en tampón TBS (del inglés, *Tris Buffered Saline*) (25 mM Tris, 150 mM NaCl) por 1h en agitación, a temperatura ambiente.

Posteriormente, las membranas fueron incubadas con Ac de ratón IgG específicos anti-HA (**Tabla 5.5**) diluidos en solución de Ac (leche 1% p/v y Tween 20 al 0,1% v/v en TBS), durante 1 h a temperatura ambiente. Luego de tres lavados con TBS-Tween 20 0,05% v/v, las membranas fueron incubadas con anticuerpo secundario (anticuerpo de cabra anti ratón) diluido en solución de Ac, por 1 h a temperatura ambiente. Luego de ese tiempo, las membranas fueron lavadas en TBS-Tween 20 al 0,05% v/v para la posterior detección.

Las proteínas se visualizaron utilizando el sistema de imagen infrarroja, *Odyssey*®. Los controles incluyeron la omisión del Ac primario y ensayos con células no transfectadas.

Tabla 5.5: Anticuerpos utilizados en ensayos de Western Blot

Anticuerpo	Procedencia	Dilución	Casa Comercial
Anti-HA	Monoclonal de ratón	1:1000	Sigma (St Louis, MO, US)
IRDye 800	Policlonal de cabra	1:10000	LICOR

V. 13 Extracción, Purificación de Histonas e Identificación por Espectrometría de Masas

A partir de 2×10^6 cél/mL, lavadas con PBS 1X frío, se purificaron las histonas de los trofozoítos en crecimiento utilizando *Histone Ultra-Pure Extraction Kit* (ABCAM®), según instrucciones de fabricación. El pellet inicial fue resuspendido en “Solución de

Pre-extracción”, incubado 10 min y centrifugado a 1000 x g por 2 min a 4°C, descartando el sobrenadante. A continuación, el mismo procedimiento se realizó utilizando “*Solución de Pre-extracción suplementaria*”, seguido de una centrifugación a 10000 x g por 2 min a 4°C, el sobrenadante fue removido. Finalmente, el pellet fue resuspendido en “*Solución de Extracción*”, incubado por 30 min y centrifugado a 10000 x g por 2 min a 4°C.

El sobrenadante fue transferido a un nuevo tubo y neutralizado con “*Solución de Neutralización*”. La fracción aislada de histonas fue almacenada a -80°C hasta su posterior análisis. Todas las incubaciones fueron realizadas en hielo. “*Solución de Pre-extracción*” y “*Solución de Extracción*” fueron suplementados con inhibidores de proteasas y DTT (Ditiotreitol).

Las muestras se analizaron en geles de poliacrilamida al 15% (*SDS-PAGE*) las cuales fueron resuspendidas en SAM como se describe en la **sección V.11**. Luego del fraccionamiento, el gel se colocó en una solución fijadora (40% metanol, 7% ácido acético) por 1 h con agitación a temperatura ambiente. Subsecuentemente el gel fue teñido con solución de azul de Coomassie R-250 (20% metanol, 0.5% ácido acético, 0.2% Azul de Coomassie R-250 BIO-RAD®) durante 2 horas. Para eliminar el exceso de colorante, se utilizó una solución de desteñido (10% ácido acético) a temperatura ambiente con agitación fuerte hasta la óptima visualización de las bandas. Como marcador de peso molecular se utilizó *Polypeptide SDS-PAGE Molecular Weight Standards* (BIO-RAD®), para bandas inferiores a 26,6 kDa.

Las muestras obtenidas fueron liofilizadas y enviadas al Dr. Pawel Ciborowski (Departamento de Farmacología y Neurociencia Experimental, Universidad de Nebraska, Omaha, EE.UU) para el análisis por la técnica de alta resolución ESI-LC-MS/MS (del inglés, *Electrospray Ionization Liquid Chromatography-Mass Spectrometry*) en una configuración de nano-spray (LTQ Orbitrap XL, Thermo Scientific, West Palm Beach, FL, EE. UU.).

V. 13. 1 Propionilación

La derivación química de la muestra de histonas por propionilación se realizó siguiendo un protocolo descrito previamente (Garcia et al., 2007b). A partir de 5 µg del

purificado de histonas se llevaron a cabo cuatro rondas de propionilación, dos previas y dos posteriores a la digestión con tripsina. Las muestras se secaron en un concentrador SpeedVac y se disolvieron en 5 μ l de bicarbonato de amonio 100 mM (Sigma-Aldrich). Luego se llevaron a cabo los siguientes pasos: 1) Se agregaron 2 μ l de hidróxido de amonio (Sigma-Aldrich) a las muestras; 2) 20 μ l de reactivo de propionilación nuevo (75% de anhídrido propiónico (Alfa Aesar) y 25% de D₀-metanol (Fisher Scientific) se agregaron a las muestras, se mezclaron por vórtex y se centrifugaron brevemente en una microcentrífuga; 3) el pH se ajustó a 8 con hidróxido de amonio; 4) las muestras se incubaron a 51°C durante 20 min; 5) las muestras se redujeron hasta 5 μ l en un concentrador SpeedVac. Las muestras se diluyeron en 5 μ l de bicarbonato de amonio 100 mM. Los pasos 1-5 se repitieron una vez. A continuación, 50 μ l de bicarbonato de amonio 100 mM se agregaron a la muestras y se incubaron durante la noche a 37°C con una relación 1:20 (tripsina:proteína) de tripsina modificada de grado de secuenciación (Promega, Madison, WI, US). Se ajustó el pH a \leq 3 con ácido acético y las muestras se colocaron brevemente a -80°C para inactivar la tripsina. Las muestras se redujeron a 5 μ l y los pasos 1-5 se repitieron una vez. Las muestras fueron diluidas en 5 μ l de bicarbonato de amonio 100 mM. Las etapas 1-4 se completaron por última vez, y los péptidos resultantes se secaron completamente en un concentrador SpeedVac.

La primera ronda de limpieza de las muestras se realizó con cartuchos de intercambio catiónico mixtos Oasis (Waters; Milford, MA). Los péptidos previamente secados se reconstituyeron en 1 ml de ácido fórmico al 0,2%. El cartucho se equilibró pasando 1 ml de metanol:agua (1:1) a través del mismo. La muestra se aplicó a la columna y se lavó el cartucho con solución de lavado (metanol 5 % y ácido fórmico 0.1 % en agua). Se realizó un segundo lavado con 1 ml de metanol al 100% (Fisher Scientific). El péptido unido se eluyó con 1 ml de tampón de elución (NH₄OH 28% y metanol). Los péptidos eluidos se secaron completamente en un concentrador SpeedVac. La segunda ronda de limpieza de muestras se realizó con puntas de pipeta. Los péptidos fueron cuantificados en NanoDrop2000 (Thermo Scientific) a 280 nm y se usó 1 μ g de cada muestra para el análisis por espectrometría de masa.

ANEXOS

Anexo I. Porcentajes de Identidad y Similitud de GIHMT1 con su homólogo más cercano.

GIHMT1		
Sec ID	Identidad	Similitud
hsaO96028	40,59	62,43
mmuQ8BVE8	40,59	62,43
hsaQ9BYW2	40,59	60,22
mmuE9Q5F9	40,59	60,22
aorQ2UTN6	40,59	60,22
cimQ1DU03	42,06	60,77
gzeQ4IB50	41,32	60,22
chaQ2H988	40,59	59,66
szpO1402	41,32	61,87
yliQ6C5G5	39,11	58,01
dhaQ6BM04	39,85	59,11
clbQ59XV0	39,11	58,56
umaQ4PBL3	37,63	59,11
dmeQ8MT36	40,59	60,77
hsaQ9NR48	37,77	59,11
mmuQ99MY8	37,77	59,11
pfa0004218	34,9	58,56
cpv0000427	35,94	45,3
tgo0002297	41,15	59,11
caeQ9NH52	34,04	55,8
Promedio:	39,3	59,0

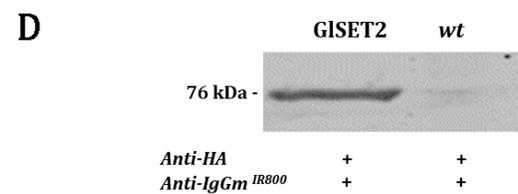
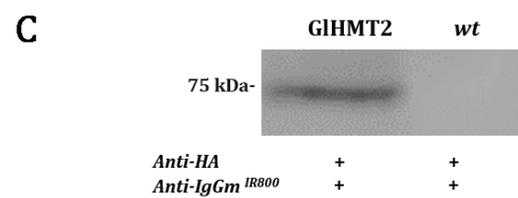
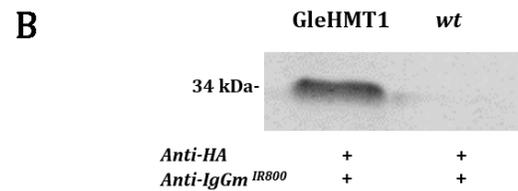
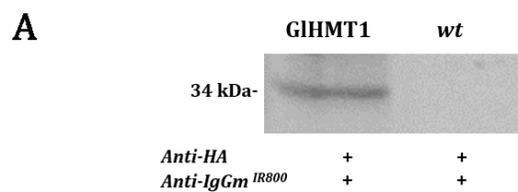
Anexo II. Porcentajes de Identidad y Similitud de GHMT2 con su homólogo más cercano.

Sec ID	GHMT2	
	Identidad	Similitud
btaQ2NL30	28,83	77,95
hsaO43463	28,83	77,95
pabQ5RB81	28,83	77,95
mmuO54864	28,83	77,79
xlaQ6NRE8	28,83	78,44
dreQ6DGD3	27,6	77,63
mfaQ4R3E0	25,76	77,14
ggaQ5F3W5	26,99	77,47
xtrQ28CQ7	26,38	77,14
dmeP45975	24,92	76,49
szpO60016	23,24	76,98
hsaQ96KQ7	27,5	77,95
mmuQ9Z148	27,5	77,95
athO82175	25,62	77,47
athQ8VZ17	27,08	79,25
tva0035126	27,1	77,47
athO64827	25,67	77,79
rnoQ5I0M0	26,91	77,63
caeP34544	19,15	66,93
mmuO88974	14,43	31,11
hsaQ15047	15,01	31,2
xlaQ6INA9	16,5	38,8
dreQ08BR4	17,3	48,4
dreQ1L8U8	18,57	64,6
xlaQ6YI93	13,76	52,0
tgo0002404	18,78	74,8
pfa0002122	16,36	74,8
Promedio:	23,5	69,7

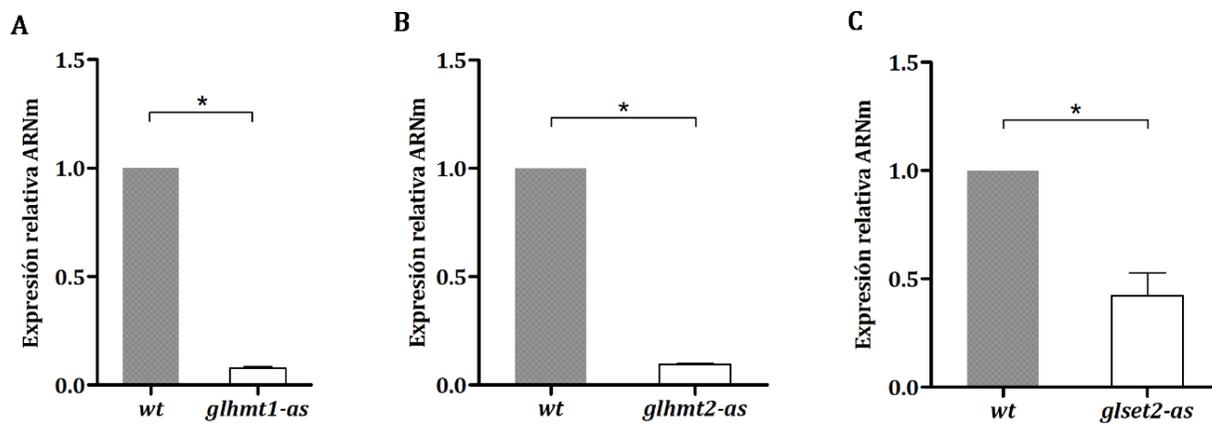
Anexo III. Porcentajes de Identidad y Similitud de G1SET2 con su homólogo más cercano.

G1SET2		
Sec ID	Identidad	Similitud
tgo0007968	32,75	56,47
clbQ5ABG1	36,74	61,13
dhaQ6BKL7	36,74	61,13
cspQ6CIT4	37,45	61,65
agoQ75D88	36,04	61,65
cglQ6FKB1	36,04	61,13
sceP38827	34,62	60,62
yliQ6CEK8	33,21	61,13
ncrQ8X0S9	34,62	62,17
gzeQ4I5R3	34,62	61,13
aorQ2UMH3	37,45	62,17
aniQ5B0Y5	36,74	61,13
ggaQ5F3P8	37,45	62,17
ddiQ54HS3	37,45	62,17
athF4K1J4	32,50	58,54
dmeQ8IRW8	33,33	60,10
dmeP20659	40,42	61,65
dviQ24742	41,13	61,65
mmu008550	40,42	61,65
hsaQ9UMN6	40,42	61,65
tva0031089	28,87	57,51
tva0011583	29,16	56,47
tva0008074	32,08	52,84
tva0026628	36,04	63,21
cpv0001450	41,25	61,65
tgo0003547	36,23	57,51
tva0003102	26,57	54,4
tgo0001216	27,87	41,45
Promedio:	35,3	59,5

Anexo IV. Ensayos de Western Blot utilizando un Acm anti-HA y IRDye 800 para corroborar la fusión entre glHMT1 (**A**), gleHMT1 (**B**), glHMT2(**C**) y glSET2 (**D**) y HA. *wt*: *wild type*.



Anexo V. Ensayos de PCR en tiempo real para analizar la disminución en la expresión de los genes *hmt1*, *hmt2* y *set2* en trofozoitos transgénicos *glhmt1-as* (A), *glhmt2-as* (B) y *glset2-as* (C) respectivamente.



Histona H2B

```

*      20      *      40      *      60
H2B_g15080 : MS-----K VET----KRLMKKTEAGDKGD-AKRKHKRHET
H2B_Hsapie : MP----EPAK-----SAPAPKK--GSKKAVTK-AQKKDG-KKRKRSRKES
H2B_MusM   : MP----EPVK-----SVPAPKK--GSKKAVTK-AQKKDG-KKRKRSRKES
H2B_Xenopu : MP----EPAK-----SAPAPKK--GSKKAVTK-TQKKDG-KKRKRSRKES
H2B_Ggallu : MP----EPAK-----SAPAPKK--GSKKAVTK-TQKKDG-KKRKRSRKES
H2B_Danior : MP----EPAK-----A--APKK--GSKKAVTK-TAGKGG-KKRKRTRKES
H2B_Dmelan : MP-----PK-----TSGKA--AKKAGKAQKNITKTD-KKKRKRKES
H2B_Celega : MA-----PPK-----PSAKG--AKKAAKTV-TKPKDG-KKRKHARKES
H2B_Saccha : MSSAAEKKPAS-----KAPAEK----KPAAKKT-STSVDG-KKRSKVRKET
H2B_Athali : MAPKAEKKPSE-----KAPKAD----KKITK---EGGSR-KKKTKKSTET
H2B_Oryza  : MAPKAEKKPAEKKPAEEKAGEKAPAAGKKPKAEKRLPASKGEKGG-EGKKERGRKKAKKSRET
H2B_Tgondi : MS-----G-----KGAQK----SQAAKKT-AGKSLGPRYRRKRRTES
H2B_Plasmo : MS-----G-----KGAQK----SQAAKKT-AGKTLGPRHKKRKRRTES
M      p      p k      k4      r E3

*      80      *      100      *      120      *      140      *      160
H2B_g15080 : YATYYVKVLRSENIRSEADTDLGTSNKGMEVMNSLVNDIFERIAEASNLAKISKRNITIGKKDIESAAKLVIPGEIGRLIRDEADKALSK----- : 120
H2B_Hsapie : YSVYYVKVLK-----QVHPDTGISSEKAMGIMNSFVNDIFERIAEASRLAHYNKRSTITSREIQTAVRLLLPGELAKHAVSEGTKAVTKYTSSK-- : 126
H2B_MusM   : YSVYYVKVLK-----QVHPDTGISSEKAMGIMNSFVNDIFERIAEASRLAHYNKRSTITSREIQTAVRLLLPGELAKHAVSEGTKAVTKYTSSK-- : 126
H2B_Xenopu : YATYYVKVLK-----QVHPDTGISSEKAMGIMNSFVNDIFERIAEASRLAHYNKRSTITSREIQTAVRLLLPGELAKHAVSEGTKAVTKYTSSK-- : 126
H2B_Ggallu : YATYYVKVLK-----QVHPDTGISSEKAMGIMNSFVNDIFERIAEASRLAHYNKRSTITSREIQTAVRLLLPGELAKHAVSEGTKAVTKYTSSK-- : 126
H2B_Danior : YATYYVKVLK-----QVHPDTGISSEKAMGIMNSFVNDIFERIAEASRLAHYNKRSTITSREIQTAVRLLLPGELAKHAVSEGTKAVTKYTSSK-- : 124
H2B_Dmelan : YATYYVKVLK-----QVHPDTGISSEKAMGIMNSFVNDIFERIAEASRLAHYNKRSTITSREIQTAVRLLLPGELAKHAVSEGTKAVTKYTSSK-- : 123
H2B_Celega : YSVYYVKVLK-----QVHPDTGVSSKAMGIMNSFVNDIFERIAEASRLAHYNKRSTISSREIQTAVRLLLPGELAKHAVSEGTKAVTKYTSSK-- : 123
H2B_Saccha : YSSYYVKVLK-----QTHPDTGISSEKMSILNSFVNDIFERIAEASRLAHYNKRSTISSREIQTAVRLLLPGELAKHAVSEGTRAVTKYSSSTQA : 131
H2B_Athali : YKTYLFFKVLK-----QVHPDTGISSEKAMGIMNSFINDIFEKIALESRLARYNKKPTITSREIQTAVRLLLPGELAKHAVSEGTKAVTKFTSS--- : 126
H2B_Oryza  : YKTYLFFKVLK-----QVHPDTGISSEKAMGIMNSFINDIFEKIALESRLARYNKKPTITSREIQTAVRLLLPGELAKHAVSEGTKAVTKFTSS--- : 150
H2B_Tgondi : FALYYVKVLK-----QVHPDTGVSSKMSIMNSFINDIFDRLADEAVRLIRYNNKRTLSSREIQTAVRLLLPGELSKHAVSEGTKAVTKYTSSG-A : 123
H2B_Plasmo : FSLYYVKVLK-----QVHPDTGVSSKMSIMNSFINDIFDRLVTEATRLIRYNNKRTLSSREIQTAVRLLLPGELSKHAVSEGTKAVTKYTSSA-A : 123
5 Y654VL4      2vhpdtG63 K M 66NSf6ND Fe46a Ea La ynK4 T6 s4eI23av4L66PGE6a4havsEgt4A63K s

```

Histona H3

```

*           20           *           40           *
H3_g150803 : MARTKH TARKTT SAT KAPRKT TARKAARKTASSTSGIKKTGRKKQGMVAVKE
H3.2_Hsapi : MARTKQTARKSTGG-KAPRKOLATKAARKSAPATGGVKKPHRYRFGTVALRE
H3.2_MusM   : MARTKQTARKSTGG-KAPRKOLATKAARKSAPATGGVKKPHRYRFGTVALRE
H3.2_Ggall  : MARTKQTARKSTGG-KAPRKOLATKAARKSAPATGGVKKPHRYRFGTVALRE
H3.2_Xenop  : MARTKQTARKSTGG-KAPRKOLATKAARKSAPATGGVKKPHRYRFGTVALRE
H3.2_Athal  : MARTKQTARKSTGG-KAPRKOLATKAARKSAPATGGVKKPHRYRFGTVALRE
H3.3_Danio  : MARTKQTARKSTGG-KAPRKOLATKAARKSAPSTGGVKKPHRYRFGTVALRE
H3.3B_Dmel  : MARTKQTARKSTGG-KAPRKOLATKAARKSAPSTGGVKKPHRYRFGTVALRE
H3_Celegan  : MARTKQTARKSTGG-KAPRKOLATKAARKSAPASGGVKKPHRYRFGTVALRE
H3.3_Oryza  : MARTKQTARKSTGG-KAPRKOLATKAARKSAPTTGGVKKPHRYRFGTVALRE
H3_Tgondii  : MARTKQTARKSTGG-KAPRKOLASKAARKSAPMSGGIKKPHRYRFGTVALRE
H3_Plasmod  : MARTKQTARKSTAG-KAPRKOLASKAARKSAPISAGIKKPHRYRFGTVALRE
H3_Sacchar  : MARTKQTARKSTGG-KAPRKOLASKAARKSAPSTGGVKKPHRYRFGTVALRE
MARTKqTARK3Tgg KAPRKq6A KAARK3Ap 3gG6KkphR 4pGtVA64E

           60           *           80           *           100           *           120           *           140
H3_g150803 : IKKYQKSTDLLIRKLPFSKLVRDIVTSGLSKSDIRFQGAAVEALQESAENYIISLFVDTQLCAEHAKRVTIMKPDME LATRI-GKRIEPEYRKGE : 146
H3.2_Hsapi : IRRYQKSTELLIRKLPFORLVREIAQD--FKTDLRFQSSAVMALQEAASEAYLVGLFEDTNLCAIHAKRVTIMPKDIQLARRIRGER-----A : 136
H3.2_MusM   : IRRYQKSTELLIRKLPFORLVREIAQD--FKTDLRFQSSAVMALQEAASEAYLVGLFEDTNLCAIHAKRVTIMPKDIQLARRIRGER-----A : 136
H3.2_Ggall  : IRRYQKSTELLIRKLPFORLVREIAQD--FKTDLRFQSSAVMALQEAASEAYLVGLFEDTNLCAIHAKRVTIMPKDIQLARRIRGER-----A : 136
H3.2_Xenop  : IRRYQKSTELLIRKLPFORLVREIAQD--FKTDLRFQSSAVMALQEAASEAYLVGLFEDTNLCAIHAKRVTIMPKDIQLARRIRGER-----A : 136
H3.2_Athal  : IRKYQKSTELLIRKLPFORLVREIAQD--FKTDLRFQSSAVMALQEAASEAYLVGLFEDTNLCAIHAKRVTIMPKDIQLARRIRGER-----A : 136
H3.3_Danio  : IRRYQKSTELLIRKLPFORLVREIAQD--FKTDLRFQSSAVMALQEAASEAYLVGLFEDTNLCAIHAKRVTIMPKDIQLARRIRGER-----A : 136
H3.3B_Dmel  : IRRYQKSTELLIRKLPFORLVREIAQD--FKTDLRFQSSAVMALQEAASEAYLVGLFEDTNLCAIHAKRVTIMPKDIQLARRIRGER-----A : 136
H3_Celegan  : IRRYQKSTELLIRKLPFORLVREIAQD--FKTDLRFQSSAVMALQEAASEAYLVGLFEDTNLCAIHAKRVTIMPKDIQLARRIRGER-----A : 136
H3.3_Oryza  : IRKYQKSTELLIRKLPFORLVREIAQD--FKTDLRFQSSAVMALQEAASEAYLVGLFEDTNLCAIHAKRVTIMPKDIQLARRIRGER-----A : 136
H3_Tgondii  : IRKFQKSTDLLIRKLPFORLVREIAQD--FKTDLRFQSSAVMALQEAASEAYLVGLFEDTNLCAIHAKRVTIMPKDIQLARRIRGER-----S : 136
H3_Plasmod  : IRRYQKSTDLLIRKLPFORLVREIAQD--YKTDLRFQSSAVMALQEAASEAYLVGLFEDTNLCAIHAKRVTIMPKDIQLARRIRGER-----S : 136
H3_Sacchar  : IRRFQKSTELLIRKLPFORLVREIAQD--FKTDLRFQSSAVMALQEAASEAYLVGLFEDTNLCAIHAKRVTIMPKDIQLARRIRGER-----S : 136
I445QKSTeLLIR41PFq4LVReIaqd   K3D6RFQs A6 ALQEA EaY66gLFedTnLcAiHAKRVTImpkD6 LArR6rGeR

```

Histona H4

```

                *           20           *
H4_g150803 : MSGKGGK-GKGYGK--SKRHSKE-KDTLGGITKPAIR
H4_Hsapien : MSGRGKGGKGLGKGGAKRHRKVLDRDNIQGITKPAIR
H4_MusM    : MSGRGKGGKGLGKGGAKRHRKVLDRDNIQGITKPAIR
H4_Ggallus : MSGRGKGGKGLGKGGAKRHRKVLDRDNIQGITKPAIR
H4_Xenopus : MSGRGKGGKGLGKGGAKRHRKVLDRDNIQGITKPAIR
H4_Dmelano : MTGRGKGGKGLGKGGAKRHRKVLDRDNIQGITKPAIR
H4_Athalia : MSGRGKGGKGLGKGGAKRHRKVLDRDNIQGITKPAIR
H4_Oryza   : MSGRGKGGKGLGKGGAKRHRKVLDRDNIQGITKPAIR
H4_Danior  : MSGRGKGSKGLGKGGAKRHRKVLDRDNIQGITKPAIR
H4_Celegan : MSGRGKGGKGLGKGGAKRHRKVLDRDNIQGITKPAIR
H4_Tgondii : MSGRGKGGKGLGKGGAKRHRKVLDRDNIQGITKPAIR
H4_Plasmod : MSGRGKGGKGLGKGGAKRHRKILDRDNIQGITKPAIR
H4_Sacchar : MSGRGKGGKGLGKGGAKRHRKILDRDNIQGITKPAIR
                M3G4GKggKGLGKggaKRHRK 14Dn6qGITKPAIR

```

```

                40           *           60           *           80           *           100
H4_g150803 : RLARRGGVKRISSTIYQQTREVLKAFLEVVLRDSSLTYTEHGQRKKTVTSDVVYALKRQGRTLYGFGI : 99
H4_Hsapien : RLARRGGVKRISGLIYEETRGLVKVFLENVIRDAVTYTEHAKRKTVTAMDVVYALKRQGRTLYGFGG : 103
H4_MusM    : RLARRGGVKRISGLIYEETRGLVKVFLENVIRDAVTYTEHAKRKTVTAMDVVYALKRQGRTLYGFGG : 103
H4_Ggallus : RLARRGGVKRISGLIYEETRGLVKVFLENVIRDAVTYTEHAKRKTVTAMDVVYALKRQGRTLYGFGG : 103
H4_Xenopus : RLARRGGVKRISGLIYEETRGLVKVFLENVIRDAVTYTEHAKRKTVTAMDVVYALKRQGRTLYGFGG : 103
H4_Dmelano : RLARRGGVKRISGLIYEETRGLVKVFLENVIRDAVTYTEHAKRKTVTAMDVVYALKRQGRTLYGFGG : 103
H4_Athalia : RLARRGGVKRISGLIYEETRGLVKIFLENVIRDAVTYTEHARRKTVTAMDVVYALKRQGRTLYGFGG : 103
H4_Oryza   : RLARRGGVKRISGLIYEETRGLVKIFLENVIRDAVTYTEHARRKTVTAMDVVYALKRQGRTLYGFGG : 103
H4_Danior  : RLARRGGVKRISGLIYEETRGLVKVFLENVIRDAVTYTEHAKRKTVTAMDVVYALKRQGRTLYGFGG : 103
H4_Celegan : RLARRGGVKRISGLIYEETRGLVKVFLENVIRDAVTYTEHAKRKTVTAMDVVYALKRQGRTLYGFGG : 103
H4_Tgondii : RLARRGGVKRISGLIYEETRGLVKVFLENIKDSVTYTEHARRKTVTAMDIVYSLKRQGRTLYGFGG : 103
H4_Plasmod : RLARRGGVKRISGLIYEETRGLVKVFLENVIKDSIMYTEHAKRKTVTAMDIVYSLKRQGRTLYGFGG : 103
H4_Sacchar : RLARRGGVKRISGLIYEETRGLVAVLKSFLSVIRDSVTYTEHAKRKTVTSLDVVYALKRQGRTLYGFGG : 103
                RLARRGGVKRISgLIY22tRgVLK FLEn664D 6tYtEHa RKTVTa D6VYaLKRQGRTLYGFGg

```

Anexo VII. Porcentajes de Identidad y Similitud de H2A, H2B, H3 y H4 de *G. lamblia* con respecto al resto de los organismos.

H2A <i>G. lamblia</i>			H2B <i>G. lamblia</i>		
	Identidad	Similitud		Identidad	Similitud
H2A_Hsapiens	44.71	80.49	H2B_Hsapiens	40.83	82.05
H2A_MusM	41.46	78.23	H2B_MusM	39.17	82.09
H2A_Ggallus	43.09	81.45	H2B_Ggallus	40.83	83.33
H2A_Xenopusl	42.28	79.03	H2B_Xenopusl	38.33	84.21
H2A_Danior	41.46	79.84	H2B_Danior	39.17	84.21
H2A_Dmelano	43.90	88.52	H2B_Dmelano	42.5	80.53
H2A_Celegans	43.90	83.61	H2B_Celegans	43.33	81.58
H2A_Saccharo	43.09	83.74	H2B_Saccharo	40.83	78.63
H2A_Athaliana	42.28	82.93	H2B_Athaliana	35.83	77.97
H2A_Oryza	43.09	84.55	H2B_Oryza	38.33	77.78
H2A_Tgondii	42.09	85.48	H2B_Tgondii	35.83	79.82
H2A_Plasmod	41.46	84.68	H2B_Plasmod	31.67	76.99
Promedio:	42.73%	82.71%	Promedio:	38.88%	80.76%

H3 <i>G. lamblia</i>			H4 <i>G. lamblia</i>		
	Identidad	Similitud		Identidad	Similitud
H3_Hsapiens	56.85	70.37	H4_Hsapiens	75.76	89.90
H3_MusM	58.90	70.37	H4_MusM	75.76	89.90
H3_Ggallus	58.22	70.37	H4_Ggallus	75.76	89.90
H3_Xenopusl	58.90	70.37	H4_Xenopusl	75.76	89.90
H3_Danior	60.27	71.85	H4_Danior	74.75	89.90
H3_Dmelano	59.59	71.85	H4_Dmelano	74.75	86.87
H3_Celegans	56.85	70.37	H4_Celegans	74.75	88.89
H3_Saccharo	59.59	71.11	H4_Saccharo	76.77	89.90
H3_Athaliana	60.27	71.85	H4_Athaliana	75.76	89.90
H3_Oryza	60.27	72.59	H4_Oryza	75.76	89.90
H3_Tgondii	59.59	73.33	H4_Tgondii	71.72	89.90
H3_Plasmod	60.27	71.11	H4_Plasmod	71.72	88.89
Promedio:	59.13%	71.29%	Promedio:	74.91%	89.47%

BIBLIOGRAFÍA

Adam, R.D. (2001). Biology of *Giardia lamblia*. *Clinical microbiology reviews* 14, 447-475.

Agalioti, T., Chen, G., and Thanos, D. (2002). Deciphering the transcriptional histone acetylation code for a human gene. *Cell* 111, 381-392.

Alberts, B.J., Alexander; Lewis, Julian; Raff, Martin; Roberts, Keith; Walter, Peter; Wilson, John; Hunt, Tim (2015). *Molecular Biology of the Cell*, 6th edn (New York).

Aldritt, S.M., Tien, P., and Wang, C.C. (1985). Pyrimidine salvage in *Giardia lamblia*. *The Journal of experimental medicine* 161, 437-445.

Allfrey, V.G., Faulkner, R., and Mirsky, A.E. (1964). Acetylation and Methylation of Histones and Their Possible Role in the Regulation of Rna Synthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 51, 786-794.

Allis, C.D., Berger, S.L., Cote, J., Dent, S., Jenuwien, T., Kouzarides, T., Pillus, L., Reinberg, D., Shi, Y., Shiekhattar, R., *et al.* (2007). New nomenclature for chromatin-modifying enzymes. *Cell* 131, 633-636.

Allis, D. (2007). *Epigenetics* (Cold Spring Harbor Laboratory, New York).

Amar, C.F., Dear, P.H., Pedraza-Diaz, S., Looker, N., Linnane, E., and McLauchlin, J. (2002). Sensitive PCR-restriction fragment length polymorphism assay for detection and genotyping of *Giardia duodenalis* in human feces. *Journal of clinical microbiology* 40, 446-452.

An, S., Yeo, K.J., Jeon, Y.H., and Song, J.J. (2011). Crystal structure of the human histone methyltransferase ASH1L catalytic domain and its implications for the regulatory mechanism. *The Journal of biological chemistry* 286, 8369-8374.

Ancelin, K., Lange, U.C., Hajkova, P., Schneider, R., Bannister, A.J., Kouzarides, T., and Surani, M.A. (2006). Blimp1 associates with Prmt5 and directs histone arginine methylation in mouse germ cells. *Nature cell biology* 8, 623-630.

Ankarklev, J., Jerlstrom-Hultqvist, J., Ringqvist, E., Troell, K., and Svard, S.G. (2010). Behind the smile: cell biology and disease mechanisms of *Giardia* species. *Nature reviews Microbiology* 8, 413-422.

Arguello-Garcia, R., Arguello-Lopez, C., Gonzalez-Robles, A., Castillo-Figueroa, A.M., and Ortega-Pierres, M.G. (2002). Sequential exposure and assembly of cyst wall filaments on the surface of encysting *Giardia duodenalis*. *Parasitology* 125, 209-219.

Arisue, N., Sanchez, L.B., Weiss, L.M., Muller, M., and Hashimoto, T. (2002). Mitochondrial-type hsp70 genes of the amitochondriate protists, *Giardia intestinalis*, *Entamoeba histolytica* and two microsporidians. *Parasitology international* 51, 9-16.

Aurrecoechea, C., Barreto, A., Basenko, E.Y., Brestelli, J., Brunk, B.P., Cade, S., Crouch, K., Doherty, R., Falke, D., Fischer, S., *et al.* (2017). EuPathDB: the eukaryotic pathogen genomics database resource. *Nucleic acids research* 45, D581-D591.

Bannister, A.J., and Kouzarides, T. (2011). Regulation of chromatin by histone modifications. *Cell research* 21, 381-395.

Barnes, C.E., English, D.M., and Cowley, S.M. (2019). Acetylation & Co: an expanding repertoire of histone acylations regulates chromatin and transcription. *Essays in biochemistry* 63, 97-107.

Barski, A., Cuddapah, S., Cui, K., Roh, T.Y., Schones, D.E., Wang, Z., Wei, G., Chepelev, I., and Zhao, K. (2007). High-resolution profiling of histone methylations in the human genome. *Cell* 129, 823-837.

Bartfai, R., Hoeijmakers, W.A., Salcedo-Amaya, A.M., Smits, A.H., Janssen-Megens, E., Kaan, A., Treeck, M., Gilberger, T.W., Francoijs, K.J., and Stunnenberg, H.G. (2010). H2A.Z demarcates intergenic regions of the *Plasmodium falciparum* epigenome that are dynamically marked by H3K9ac and H3K4me3. *PLoS pathogens* 6, e1001223.

Bartke, T., Vermeulen, M., Xhemalce, B., Robson, S.C., Mann, M., and Kouzarides, T. (2010). Nucleosome-interacting proteins regulated by DNA and histone methylation. *Cell* 143, 470-484.

Basualdo, J.A., Cordoba, M.A., de Luca, M.M., Ciarmela, M.L., Pezzani, B.C., Grenovero, M.S., and Minvielle, M.C. (2007). Intestinal parasitoses and environmental factors in a rural population of Argentina, 2002-2003. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo* 49, 251-255.

Beck, D.B., Oda, H., Shen, S.S., and Reinberg, D. (2012). PR-Set7 and H4K20me1: at the crossroads of genome integrity, cell cycle, chromosome condensation, and transcription. *Genes & development* 26, 325-337.

Beck, H.C., Nielsen, E.C., Matthiesen, R., Jensen, L.H., Sehested, M., Finn, P., Grauslund, M., Hansen, A.M., and Jensen, O.N. (2006). Quantitative proteomic analysis of post-translational modifications of human histones. *Molecular & cellular proteomics* : MCP 5, 1314-1325.

Benchimol, M. (2004a). Giardia lamblia: behavior of the nuclear envelope. *Parasitology research* 94, 254-264.

Benchimol, M. (2004b). Participation of the adhesive disc during karyokinesis in Giardia lamblia. *Biology of the cell* 96, 291-301.

Benchimol, M. (2005). The nuclei of Giardia lamblia--new ultrastructural observations. *Archives of microbiology* 183, 160-168.

Benchimol, M., Piva, B., Campanati, L., and de Souza, W. (2004). Visualization of the funis of Giardia lamblia by high-resolution field emission scanning electron microscopy--new insights. *Journal of structural biology* 147, 102-115.

Berdasco, M., and Esteller, M. (2010). Aberrant epigenetic landscape in cancer: how cellular identity goes awry. *Developmental cell* 19, 698-711.

Berger, F. (2019). Emil Heitz, a true epigenetics pioneer. *Nature reviews Molecular cell biology* 20, 572.

Bernander, R., Palm, J.E., and Svard, S.G. (2001). Genome ploidy in different stages of the Giardia lamblia life cycle. *Cellular microbiology* 3, 55-62.

Bernstein, B.E., Mikkelsen, T.S., Xie, X., Kamal, M., Huebert, D.J., Cuff, J., Fry, B., Meissner, A., Wernig, M., Plath, K., *et al.* (2006). A bivalent chromatin structure marks key developmental genes in embryonic stem cells. *Cell* 125, 315-326.

Bernstein, E., and Allis, C.D. (2005). RNA meets chromatin. *Genes & development* 19, 1635-1655.

Bingham, A.K., Jarroll, E.L., Jr., Meyer, E.A., and Radulescu, S. (1979). Giardia sp.: physical factors of excystation in vitro, and excystation vs eosin exclusion as determinants of viability. *Experimental parasitology* 47, 284-291.

Blanc, R.S., and Richard, S. (2017). Arginine Methylation: The Coming of Age. *Molecular cell* 65, 8-24.

Blosser, T.R., Yang, J.G., Stone, M.D., Narlikar, G.J., and Zhuang, X. (2009). Dynamics of nucleosome remodelling by individual ACF complexes. *Nature* 462, 1022-1027.

Botuyan, M.V., Lee, J., Ward, I.M., Kim, J.E., Thompson, J.R., Chen, J., and Mer, G. (2006). Structural basis for the methylation state-specific recognition of histone H4-K20 by 53BP1 and Crb2 in DNA repair. *Cell* 127, 1361-1373.

Boucher, S.E., and Gillin, F.D. (1990). Excystation of in vitro-derived *Giardia lamblia* cysts. *Infection and immunity* 58, 3516-3522.

Boyer, L.A., Plath, K., Zeitlinger, J., Brambrink, T., Medeiros, L.A., Lee, T.I., Levine, S.S., Wernig, M., Tajonar, A., Ray, M.K., *et al.* (2006). Polycomb complexes repress developmental regulators in murine embryonic stem cells. *Nature* 441, 349-353.

Bracken, A.P., Dietrich, N., Pasini, D., Hansen, K.H., and Helin, K. (2006). Genome-wide mapping of Polycomb target genes unravels their roles in cell fate transitions. *Genes & development* 20, 1123-1136.

Brameier, M., Krings, A., and MacCallum, R.M. (2007). NucPred--predicting nuclear localization of proteins. *Bioinformatics* 23, 1159-1160.

Brown, D.M., Upcroft, J.A., Edwards, M.R., and Upcroft, P. (1998). Anaerobic bacterial metabolism in the ancient eukaryote *Giardia duodenalis*. *International journal for parasitology* 28, 149-164.

Caccio, S.M., Beck, R., Lalle, M., Marinculic, A., and Pozio, E. (2008). Multilocus genotyping of *Giardia duodenalis* reveals striking differences between assemblages A and B. *International journal for parasitology* 38, 1523-1531.

Caccio, S.M., De Giacomo, M., and Pozio, E. (2002). Sequence analysis of the beta-giardin gene and development of a polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism assay to genotype *Giardia duodenalis* cysts from human faecal samples. *International journal for parasitology* 32, 1023-1030.

Carranza, P.G., Gargantini, P.R., Prucca, C.G., Torri, A., Saura, A., Svard, S., and Lujan, H.D. (2016). Specific histone modifications play critical roles in the control of encystation and antigenic variation in the early-branching eukaryote *Giardia lamblia*. *The international journal of biochemistry & cell biology* 81, 32-43.

Carrozza, M.J., Li, B., Florens, L., Suganuma, T., Swanson, S.K., Lee, K.K., Shia, W.J., Anderson, S., Yates, J., Washburn, M.P., *et al.* (2005). Histone H3 methylation by Set2 directs deacetylation of coding regions by Rpd3S to suppress spurious intragenic transcription. *Cell* 123, 581-592.

Carvalho, K.P., and Monteiro-Leal, L.H. (2004). The caudal complex of *Giardia lamblia* and its relation to motility. *Experimental parasitology* 108, 154-162.

Cavalier-Smith, T. (1981). Eukaryote kingdoms: seven or nine? *Bio Systems* 14, 461-481.

Cavalier-Smith, T., and Chao, E.E. (1996). Molecular phylogeny of the free-living archezoan *Trepomonas agilis* and the nature of the first eukaryote. *Journal of molecular evolution* 43, 551-562.

Clifford, D. (1920). The Discovery of the Intestinal Protozoa of Man. *Proceedings of the Royal Society of Medicine* 13, 1-15.

Cohen, I., Poreba, E., Kamieniarz, K., and Schneider, R. (2011). Histone modifiers in cancer: friends or foes? *Genes & cancer* 2, 631-647.

Cosgrove, M.S., Boeke, J.D., and Wolberger, C. (2004). Regulated nucleosome mobility and the histone code. *Nature structural & molecular biology* 11, 1037-1043.

Croken, M.M., Nardelli, S.C., and Kim, K. (2012). Chromatin modifications, epigenetics, and how protozoan parasites regulate their lives. *Trends in parasitology* 28, 202-213.

Cui, L., and Miao, J. (2010). Chromatin-mediated epigenetic regulation in the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Eukaryotic cell* 9, 1138-1149.

Cui, L., Miao, J., Furuya, T., Li, X., Su, X.Z., and Cui, L. (2007). PfGCN5-mediated histone H3 acetylation plays a key role in gene expression in *Plasmodium falciparum*. *Eukaryotic cell* 6, 1219-1227.

Cuthbert, G.L., Daujat, S., Snowden, A.W., Erdjument-Bromage, H., Hagiwara, T., Yamada, M., Schneider, R., Gregory, P.D., Tempst, P., Bannister, A.J., *et al.* (2004). Histone deimination antagonizes arginine methylation. *Cell* 118, 545-553.

Cheung, W.L., Ajiro, K., Samejima, K., Kloc, M., Cheung, P., Mizzen, C.A., Beeser, A., Etkin, L.D., Chernoff, J., Earnshaw, W.C., *et al.* (2003). Apoptotic phosphorylation of histone H2B is mediated by mammalian sterile twenty kinase. *Cell* 113, 507-517.

Chiu, P.W., Huang, Y.C., Pan, Y.J., Wang, C.H., and Sun, C.H. (2010). A novel family of cyst proteins with epidermal growth factor repeats in *Giardia lamblia*. *PLoS neglected tropical diseases* 4, e677.

Cho, H., Orphanides, G., Sun, X., Yang, X.J., Ogryzko, V., Lees, E., Nakatani, Y., and Reinberg, D. (1998). A human RNA polymerase II complex containing factors that modify chromatin structure. *Molecular and cellular biology* 18, 5355-5363.

Chu, F., Nusinow, D.A., Chalkley, R.J., Plath, K., Panning, B., and Burlingame, A.L. (2006). Mapping post-translational modifications of the histone variant MacroH2A1 using tandem mass spectrometry. *Molecular & cellular proteomics : MCP* 5, 194-203.

D'Urso, A., and Brickner, J.H. (2014). Mechanisms of epigenetic memory. *Trends in genetics : TIG* 30, 230-236.

Dagley, M.J., Dolezal, P., Likic, V.A., Smid, O., Purcell, A.W., Buchanan, S.K., Tachezy, J., and Lithgow, T. (2009). The protein import channel in the outer mitochondrial membrane of *Giardia intestinalis*. *Molecular biology and evolution* 26, 1941-1947.

Davids, B.J., Reiner, D.S., Birkeland, S.R., Preheim, S.P., Cipriano, M.J., McArthur, A.G., and Gillin, F.D. (2006). A new family of giardial cysteine-rich non-VSP protein genes and a novel cyst protein. *PloS one* 1, e44.

Davis-Hayman, S.R., and Nash, T.E. (2002). Genetic manipulation of *Giardia lamblia*. *Molecular and biochemical parasitology* 122, 1-7.

Dawson, S.C., Sagolla, M.S., and Cande, W.Z. (2007). The cenH3 histone variant defines centromeres in *Giardia intestinalis*. *Chromosoma* 116, 175-184.

de Jesus, T.C., Nunes, V.S., Lopes Mde, C., Martil, D.E., Iwai, L.K., Moretti, N.S., Machado, F.C., de Lima-Stein, M.L., Thiemann, O.H., Elias, M.C., *et al.* (2016). Chromatin Proteomics Reveals Variable Histone Modifications during the Life Cycle of *Trypanosoma cruzi*. *Journal of proteome research* 15, 2039-2051.

de Souza, W., Lanfredi-Rangel, A., and Campanati, L. (2004). Contribution of microscopy to a better knowledge of the biology of *Giardia lamblia*. *Microscopy and microanalysis : the official journal of Microscopy Society of America, Microbeam Analysis Society, Microscopical Society of Canada* 10, 513-527.

Di Lorenzo, A., and Bedford, M.T. (2011). Histone arginine methylation. *FEBS letters* 585, 2024-2031.

Diamond, L.S., Harlow, D.R., and Cunnick, C.C. (1978). A new medium for the axenic cultivation of *Entamoeba histolytica* and other *Entamoeba*. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 72, 431-432.

Duffy, M.F., Selvarajah, S.A., Josling, G.A., and Petter, M. (2014). Epigenetic regulation of the *Plasmodium falciparum* genome. *Briefings in functional genomics* 13, 203-216.

Eargle, J., Wright, D., and Luthey-Schulten, Z. (2006). Multiple Alignment of protein structures and sequences for VMD. *Bioinformatics* 22, 504-506.

Eddy, S.R. (1998). Profile hidden Markov models. *Bioinformatics* 14, 755-763.

Efstratiou, A., Ongerth, J.E., and Karanis, P. (2017). Waterborne transmission of protozoan parasites: Review of worldwide outbreaks - An update 2011-2016. *Water research* 114, 14-22.

Einarsson, E., Troell, K., Hoepfner, M.P., Grabherr, M., Ribacke, U., and Svard, S.G. (2016). Coordinated Changes in Gene Expression Throughout Encystation of *Giardia intestinalis*. *PLoS neglected tropical diseases* 10, e0004571.

Elmendorf, H.G., Dawson, S.C., and McCaffery, J.M. (2003). The cytoskeleton of *Giardia lamblia*. *International journal for parasitology* 33, 3-28.

Elmendorf, H.G., Singer, S.M., Pierce, J., Cowan, J., and Nash, T.E. (2001). Initiator and upstream elements in the alpha2-tubulin promoter of *Giardia lamblia*. *Molecular and biochemical parasitology* 113, 157-169.

Erlandsen, S.L., Bemrick, W.J., and Pawley, J. (1989). High-resolution electron microscopic evidence for the filamentous structure of the cyst wall in *Giardia muris* and *Giardia duodenalis*. *The Journal of parasitology* 75, 787-797.

Escamilla-Del-Arenal, M., da Rocha, S.T., Spruijt, C.G., Masui, O., Renaud, O., Smits, A.H., Margueron, R., Vermeulen, M., and Heard, E. (2013). Cdy1, a new partner of the inactive X chromosome and potential reader of H3K27me3 and H3K9me2. *Molecular and cellular biology* 33, 5005-5020.

Farthing, M.J., Mata, L., Urrutia, J.J., and Kronmal, R.A. (1986). Natural history of *Giardia* infection of infants and children in rural Guatemala and its impact on physical growth. *The American journal of clinical nutrition* 43, 395-405.

Faubert, G., Reiner, D.S., and Gillin, F.D. (1991). *Giardia lamblia*: regulation of secretory vesicle formation and loss of ability to reattach during encystation in vitro. *Experimental parasitology* 72, 345-354.

Feely, D.E., Schollmeyer, J.V., and Erlandsen, S.L. (1982). *Giardia* spp.: distribution of contractile proteins in the attachment organelle. *Experimental parasitology* 53, 145-154.

Felsenfeld, G. (2014). A brief history of epigenetics. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 6.

Ferrari, K.J., Scelfo, A., Jammula, S., Cuomo, A., Barozzi, I., Stutzer, A., Fischle, W., Bonaldi, T., and Pasini, D. (2014). Polycomb-dependent H3K27me1 and H3K27me2 regulate active transcription and enhancer fidelity. *Molecular cell* 53, 49-62.

Figueiredo, L.M., Cross, G.A., and Janzen, C.J. (2009). Epigenetic regulation in African trypanosomes: a new kid on the block. *Nature reviews Microbiology* 7, 504-513.

Finn, R.D., Bateman, A., Clements, J., Coghill, P., Eberhardt, R.Y., Eddy, S.R., Heger, A., Hetherington, K., Holm, L., Mistry, J., *et al.* (2014). Pfam: the protein families database. *Nucleic acids research* 42, D222-230.

Finn, R.D., Clements, J., and Eddy, S.R. (2011). HMMER web server: interactive sequence similarity searching. *Nucleic acids research* 39, W29-37.

Flanagan, J.F., Mi, L.Z., Chruszcz, M., Cymborowski, M., Clines, K.L., Kim, Y., Minor, W., Rastinejad, F., and Khorasanizadeh, S. (2005). Double chromodomains cooperate to recognize the methylated histone H3 tail. *Nature* 438, 1181-1185.

Fnu, S., Williamson, E.A., De Haro, L.P., Brenneman, M., Wray, J., Shaheen, M., Radhakrishnan, K., Lee, S.H., Nickoloff, J.A., and Hromas, R. (2011). Methylation of histone H3 lysine 36 enhances DNA repair by nonhomologous end-joining. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108, 540-545.

Ford, B. (2007). Antony van Leeuwenhoek's Microscope and the Discovery of *Giardia*. *Microscopy and Analysis* 21, 5-7.

Fraga, M.F., Ballestar, E., Villar-Garea, A., Boix-Chornet, M., Espada, J., Schotta, G., Bonaldi, T., Haydon, C., Ropero, S., Petrie, K., *et al.* (2005). Loss of acetylation at Lys16 and trimethylation at Lys20 of histone H4 is a common hallmark of human cancer. *Nature genetics* 37, 391-400.

Franzen, O., Jerlstrom-Hultqvist, J., Castro, E., Sherwood, E., Ankarklev, J., Reiner, D.S., Palm, D., Andersson, J.O., Andersson, B., and Svard, S.G. (2009). Draft genome sequencing of *giardia intestinalis* assemblage B isolate GS: is human giardiasis caused by two different species? *PLoS pathogens* 5, e1000560.

Fraser, D., Bilenko, N., Deckelbaum, R.J., Dagan, R., El-On, J., and Naggan, L. (2000). Giardia lamblia carriage in Israeli Bedouin infants: risk factors and consequences. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 30, 419-424.

Fraser, D., Dagan, R., Naggan, L., Greene, V., El-On, J., Abu-Rbiah, Y., and Deckelbaum, R.J. (1997). Natural history of Giardia lamblia and Cryptosporidium infections in a cohort of Israeli Bedouin infants: a study of a population in transition. *The American journal of tropical medicine and hygiene* 57, 544-549.

Fulco, M., Schiltz, R.L., Iezzi, S., King, M.T., Zhao, P., Kashiwaya, Y., Hoffman, E., Veech, R.L., and Sartorelli, V. (2003). Sir2 regulates skeletal muscle differentiation as a potential sensor of the redox state. *Molecular cell* 12, 51-62.

Fullgrabe, J., Kavanagh, E., and Joseph, B. (2011). Histone onco-modifications. *Oncogene* 30, 3391-3403.

Garcia, B.A., Mollah, S., Ueberheide, B.M., Busby, S.A., Muratore, T.L., Shabanowitz, J., and Hunt, D.F. (2007a). Chemical derivatization of histones for facilitated analysis by mass spectrometry. *Nature protocols* 2, 933-938.

Garcia, B.A., Pesavento, J.J., Mizzen, C.A., and Kelleher, N.L. (2007b). Pervasive combinatorial modification of histone H3 in human cells. *Nature methods* 4, 487-489.

Garcia, B.A., Shabanowitz, J., and Hunt, D.F. (2007c). Characterization of histones and their post-translational modifications by mass spectrometry. *Current opinion in chemical biology* 11, 66-73.

Garcia Penarrubia, P., Ferez Ruiz, X., and Galvez, J. (2005). Quantitative analysis of the factors that affect the determination of colocalization coefficients in dual-color confocal images. *IEEE transactions on image processing : a publication of the IEEE Signal Processing Society* 14, 1151-1158.

Gardner, T.B., and Hill, D.R. (2001). Treatment of giardiasis. *Clinical microbiology reviews* 14, 114-128.

Ghosh, S., Frisardi, M., Rogers, R., and Samuelson, J. (2001). How Giardia swim and divide. *Infection and immunity* 69, 7866-7872.

Gillin, F.D., Boucher, S.E., Rossi, S.S., and Reiner, D.S. (1989). Giardia lamblia: the roles of bile, lactic acid, and pH in the completion of the life cycle in vitro. *Experimental parasitology* 69, 164-174.

Gillin, F.D., Hagblom, P., Harwood, J., Aley, S.B., Reiner, D.S., McCaffery, M., So, M., and Guiney, D.G. (1990). Isolation and expression of the gene for a major surface protein of *Giardia lamblia*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *87*, 4463-4467.

Gillin, F.D., Reiner, D.S., Gault, M.J., Douglas, H., Das, S., Wunderlich, A., and Sauch, J.F. (1987). Encystation and expression of cyst antigens by *Giardia lamblia* in vitro. *Science* *235*, 1040-1043.

Gillin, F.D., Reiner, D.S., and McCaffery, J.M. (1996). Cell biology of the primitive eukaryote *Giardia lamblia*. *Annual review of microbiology* *50*, 679-705.

Gissot, M., Kelly, K.A., Ajioka, J.W., Greally, J.M., and Kim, K. (2007). Epigenomic modifications predict active promoters and gene structure in *Toxoplasma gondii*. *PLoS pathogens* *3*, e77.

Goldberg, A.D., Allis, C.D., and Bernstein, E. (2007). Epigenetics: a landscape takes shape. *Cell* *128*, 635-638.

Goll, M.G., and Bestor, T.H. (2005). Eukaryotic cytosine methyltransferases. *Annual review of biochemistry* *74*, 481-514.

Gottig, N., Elias, E.V., Quiroga, R., Nores, M.J., Solari, A.J., Touz, M.C., and Lujan, H.D. (2006). Active and passive mechanisms drive secretory granule biogenesis during differentiation of the intestinal parasite *Giardia lamblia*. *The Journal of biological chemistry* *281*, 18156-18166.

Grewal, S.I., and Jia, S. (2007). Heterochromatin revisited. *Nature reviews Genetics* *8*, 35-46.

Groth, A., Rocha, W., Verreault, A., and Almouzni, G. (2007). Chromatin challenges during DNA replication and repair. *Cell* *128*, 721-733.

Guindon, S., Dufayard, J.F., Lefort, V., Anisimova, M., Hordijk, W., and Gascuel, O. (2010). New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: assessing the performance of PhyML 3.0. *Systematic biology* *59*, 307-321.

Harrison, M.J., Tang, Y.H., and Dowhan, D.H. (2010). Protein arginine methyltransferase 6 regulates multiple aspects of gene expression. *Nucleic acids research* *38*, 2201-2216.

Hatakeyama, A., Hartmann, B., Travers, A., Nogues, C., and Buckle, M. (2016). High-resolution biophysical analysis of the dynamics of nucleosome formation. *Scientific reports* 6, 27337.

He, H., and Lehming, N. (2003). Global effects of histone modifications. *Briefings in functional genomics & proteomics* 2, 234-243.

Heyworth, M.F. (2016). *Giardia duodenalis* genetic assemblages and hosts. *Parasite* 23, 13.

Hidaka, Y., Hagiwara, T., and Yamada, M. (2005). Methylation of the guanidino group of arginine residues prevents citrullination by peptidylarginine deiminase IV. *FEBS letters* 579, 4088-4092.

Homan, W.L., Gilsing, M., Bentala, H., Limper, L., and van Knapen, F. (1998). Characterization of *Giardia duodenalis* by polymerase-chain-reaction fingerprinting. *Parasitology research* 84, 707-714.

Hopkins, R.M., Constantine, C.C., Groth, D.A., Wetherall, J.D., Reynoldson, J.A., and Thompson, R.C. (1999). PCR-based DNA fingerprinting of *Giardia duodenalis* isolates using the intergenic rDNA spacer. *Parasitology* 118 (Pt 6), 531-539.

Huang, D.B., and White, A.C. (2006). An updated review on *Cryptosporidium* and *Giardia*. *Gastroenterology clinics of North America* 35, 291-314, viii.

Huang, Y.C., Su, L.H., Lee, G.A., Chiu, P.W., Cho, C.C., Wu, J.Y., and Sun, C.H. (2008). Regulation of cyst wall protein promoters by Myb2 in *Giardia lamblia*. *The Journal of biological chemistry* 283, 31021-31029.

Humphrey, W., Dalke, A., and Schulten, K. (1996). VMD: visual molecular dynamics. *Journal of molecular graphics* 14, 33-38, 27-38.

Hyllus, D., Stein, C., Schnabel, K., Schiltz, E., Imhof, A., Dou, Y., Hsieh, J., and Bauer, U.M. (2007). PRMT6-mediated methylation of R2 in histone H3 antagonizes H3 K4 trimethylation. *Genes & development* 21, 3369-3380.

Iberg, A.N., Espejo, A., Cheng, D., Kim, D., Michaud-Levesque, J., Richard, S., and Bedford, M.T. (2008). Arginine methylation of the histone H3 tail impedes effector binding. *The Journal of biological chemistry* 283, 3006-3010.

Ikura, T., Tashiro, S., Kakino, A., Shima, H., Jacob, N., Amunugama, R., Yoder, K., Izumi, S., Kuraoka, I., Tanaka, K., *et al.* (2007). DNA damage-dependent acetylation and

ubiquitination of H2AX enhances chromatin dynamics. *Molecular and cellular biology* 27, 7028-7040.

Jarroll, E.L., Manning, P., Lindmark, D.G., Coggins, J.R., and Erlandsen, S.L. (1989). Giardia cyst wall-specific carbohydrate: evidence for the presence of galactosamine. *Molecular and biochemical parasitology* 32, 121-131.

Jarroll, E.L., Muller, P.J., Meyer, E.A., and Morse, S.A. (1981). Lipid and carbohydrate metabolism of Giardia lamblia. *Molecular and biochemical parasitology* 2, 187-196.

Jedelsky, P.L., Dolezal, P., Rada, P., Pyrih, J., Smid, O., Hrdy, I., Sedinova, M., Marcincikova, M., Voleman, L., Perry, A.J., *et al.* (2011). The minimal proteome in the reduced mitochondrion of the parasitic protist Giardia intestinalis. *PloS one* 6, e17285.

Jenuwein, T., and Allis, C.D. (2001). Translating the histone code. *Science* 293, 1074-1080.

Jimenez-Garcia, L.F., Zavala, G., Chavez-Munguia, B., Ramos-Godinez Mdel, P., Lopez-Velazquez, G., Segura-Valdez Mde, L., Montanez, C., Hehl, A.B., Arguello-Garcia, R., and Ortega-Pierres, G. (2008). Identification of nucleoli in the early branching protist Giardia duodenalis. *International journal for parasitology* 38, 1297-1304.

Johnsen, S.A. (2012). The enigmatic role of H2Bub1 in cancer. *FEBS letters* 586, 1592-1601.

Johnson, L., Mollah, S., Garcia, B.A., Muratore, T.L., Shabanowitz, J., Hunt, D.F., and Jacobsen, S.E. (2004). Mass spectrometry analysis of Arabidopsis histone H3 reveals distinct combinations of post-translational modifications. *Nucleic acids research* 32, 6511-6518.

Joshi, A.A., and Struhl, K. (2005). Eaf3 chromodomain interaction with methylated H3-K36 links histone deacetylation to Pol II elongation. *Molecular cell* 20, 971-978.

Juárez, M.R., Verónica (2013). Parasitosis intestinales en Argentina: principales agentes causales encontrados en la población y en el ambiente *Revista Argentina de Microbiología* 45, 191-204.

Kabnick, K.S., and Peattie, D.A. (1990). In situ analyses reveal that the two nuclei of Giardia lamblia are equivalent. *Journal of cell science* 95 (Pt 3), 353-360.

Kallberg, M., Wang, H., Wang, S., Peng, J., Wang, Z., Lu, H., and Xu, J. (2012). Template-based protein structure modeling using the RaptorX web server. *Nature protocols* 7, 1511-1522.

Karmodiya, K., Krebs, A.R., Oulad-Abdelghani, M., Kimura, H., and Tora, L. (2012). H3K9 and H3K14 acetylation co-occur at many gene regulatory elements, while H3K14ac marks a subset of inactive inducible promoters in mouse embryonic stem cells. *BMC genomics* 13, 424.

Katoh, K., Misawa, K., Kuma, K., and Miyata, T. (2002). MAFFT: a novel method for rapid multiple sequence alignment based on fast Fourier transform. *Nucleic acids research* 30, 3059-3066.

Katoh, K., and Standley, D.M. (2013). MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. *Molecular biology and evolution* 30, 772-780.

Kelley, L.A., Mezulis, S., Yates, C.M., Wass, M.N., and Sternberg, M.J. (2015). The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis. *Nature protocols* 10, 845-858.

Kim, J., Bae, S.S., Sung, M.H., Lee, K.H., and Park, S.J. (2009). Comparative proteomic analysis of trophozoites versus cysts of *Giardia lamblia*. *Parasitology research* 104, 475-479.

Kimura, A., and Horikoshi, M. (1998). Tip60 acetylates six lysines of a specific class in core histones in vitro. *Genes to cells : devoted to molecular & cellular mechanisms* 3, 789-800.

Kimura, H., and Cook, P.R. (2001). Kinetics of core histones in living human cells: little exchange of H3 and H4 and some rapid exchange of H2B. *The Journal of cell biology* 153, 1341-1353.

Korman, S.H., Le Blancq, S.M., Deckelbaum, R.J., and Van der Ploeg, L.H. (1992). Investigation of human giardiasis by karyotype analysis. *The Journal of clinical investigation* 89, 1725-1733.

Kosugi, S., Hasebe, M., Tomita, M., and Yanagawa, H. (2009). Systematic identification of cell cycle-dependent yeast nucleocytoplasmic shuttling proteins by prediction of composite motifs. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106, 10171-10176.

Kouzarides, T. (2007). Chromatin modifications and their function. *Cell* *128*, 693-705.

Kulakova, L., Singer, S.M., Conrad, J., and Nash, T.E. (2006). Epigenetic mechanisms are involved in the control of *Giardia lamblia* antigenic variation. *Molecular microbiology* *61*, 1533-1542.

Kuo, A.J., Song, J., Cheung, P., Ishibe-Murakami, S., Yamazoe, S., Chen, J.K., Patel, D.J., and Gozani, O. (2012). The BAH domain of ORC1 links H4K20me2 to DNA replication licensing and Meier-Gorlin syndrome. *Nature* *484*, 115-119.

Kuzmichev, A., Nishioka, K., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., and Reinberg, D. (2002). Histone methyltransferase activity associated with a human multiprotein complex containing the Enhancer of Zeste protein. *Genes & development* *16*, 2893-2905.

Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* *227*, 680-685.

Lalle, M., Jimenez-Cardosa, E., Caccio, S.M., and Pozio, E. (2005). Genotyping of *Giardia duodenalis* from humans and dogs from Mexico using a beta-giardin nested polymerase chain reaction assay. *The Journal of parasitology* *91*, 203-205.

Lanfredi-Rangel, A., Attias, M., de Carvalho, T.M., Kattenbach, W.M., and De Souza, W. (1998). The peripheral vesicles of trophozoites of the primitive protozoan *Giardia lamblia* may correspond to early and late endosomes and to lysosomes. *Journal of structural biology* *123*, 225-235.

Lanouette, S., Mongeon, V., Figeys, D., and Couture, J.F. (2014). The functional diversity of protein lysine methylation. *Molecular systems biology* *10*, 724.

Larschan, E., and Winston, F. (2001). The *S. cerevisiae* SAGA complex functions in vivo as a coactivator for transcriptional activation by Gal4. *Genes & development* *15*, 1946-1956.

Lauberth, S.M., Nakayama, T., Wu, X., Ferris, A.L., Tang, Z., Hughes, S.H., and Roeder, R.G. (2013). H3K4me3 interactions with TAF3 regulate preinitiation complex assembly and selective gene activation. *Cell* *152*, 1021-1036.

Lauwaet, T., Davids, B.J., Reiner, D.S., and Gillin, F.D. (2007). Encystation of *Giardia lamblia*: a model for other parasites. *Current opinion in microbiology* *10*, 554-559.

Lehnertz, B., Ueda, Y., Derijck, A.A., Braunschweig, U., Perez-Burgos, L., Kubicek, S., Chen, T., Li, E., Jenuwein, T., and Peters, A.H. (2003). Suv39h-mediated histone H3 lysine 9 methylation directs DNA methylation to major satellite repeats at pericentric heterochromatin. *Current biology* : CB 13, 1192-1200.

Letunic, I., and Bork, P. (2011). Interactive Tree Of Life v2: online annotation and display of phylogenetic trees made easy. *Nucleic acids research* 39, W475-478.

Li, H., Ilin, S., Wang, W., Duncan, E.M., Wysocka, J., Allis, C.D., and Patel, D.J. (2006). Molecular basis for site-specific read-out of histone H3K4me3 by the BPTF PHD finger of NURF. *Nature* 442, 91-95.

Liu, C.L., Kaplan, T., Kim, M., Buratowski, S., Schreiber, S.L., Friedman, N., and Rando, O.J. (2005). Single-nucleosome mapping of histone modifications in *S. cerevisiae*. *PLoS biology* 3, e328.

Livak, K.J., and Schmittgen, T.D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻($\Delta\Delta C(T)$) Method. *Methods* 25, 402-408.

Loftness, T.J., Erlandsen, S.L., Wilson, I.D., and Meyer, E.A. (1984). Occurrence of specific secretory immunoglobulin A in bile after inoculation of *Giardia lamblia* trophozoites into rat duodenum. *Gastroenterology* 87, 1022-1029.

Luco, R.F., Pan, Q., Tominaga, K., Blencowe, B.J., Pereira-Smith, O.M., and Misteli, T. (2010). Regulation of alternative splicing by histone modifications. *Science* 327, 996-1000.

Luger, K., Mader, A.W., Richmond, R.K., Sargent, D.F., and Richmond, T.J. (1997). Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature* 389, 251-260.

Lujan, H.D. (2011). Mechanisms of adaptation in the intestinal parasite *Giardia lamblia*. *Essays in biochemistry* 51, 177-191.

Lujan, H.D., Mowatt, M.R., Byrd, L.G., and Nash, T.E. (1996a). Cholesterol starvation induces differentiation of the intestinal parasite *Giardia lamblia*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93, 7628-7633.

Lujan, H.D., Mowatt, M.R., Conrad, J.T., Bowers, B., and Nash, T.E. (1995a). Identification of a novel *Giardia lamblia* cyst wall protein with leucine-rich repeats.

Implications for secretory granule formation and protein assembly into the cyst wall. *The Journal of biological chemistry* 270, 29307-29313.

Lujan, H.D., Mowatt, M.R., Conrad, J.T., and Nash, T.E. (1996b). Increased expression of the molecular chaperone BiP/GRP78 during the differentiation of a primitive eukaryote. *Biology of the cell* 86, 11-18.

Lujan, H.D., Mowatt, M.R., and Nash, T.E. (1997). Mechanisms of *Giardia lamblia* differentiation into cysts. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR* 61, 294-304.

Lujan, H.J., Dries, D.J., and Gamelli, R.L. (1995b). Comparative analysis of bedside and operating room tracheostomies in critically ill patients with burns. *The Journal of burn care & rehabilitation* 16, 258-261.

Mahbubani, M.H., Bej, A.K., Perlin, M.H., Schaefer, F.W., 3rd, Jakubowski, W., and Atlas, R.M. (1992). Differentiation of *Giardia duodenalis* from other *Giardia* spp. by using polymerase chain reaction and gene probes. *Journal of clinical microbiology* 30, 74-78.

Manning, P., Erlandsen, S.L., and Jarroll, E.L. (1992). Carbohydrate and amino acid analyses of *Giardia muris* cysts. *The Journal of protozoology* 39, 290-296.

Margueron, R., Trojer, P., and Reinberg, D. (2005). The key to development: interpreting the histone code? *Current opinion in genetics & development* 15, 163-176.

Martin, C., and Zhang, Y. (2007). Mechanisms of epigenetic inheritance. *Current opinion in cell biology* 19, 266-272.

Mazin, P.V., Gelfand, M.S., Mironov, A.A., Rakhmaninova, A.B., Rubinov, A.R., Russell, R.B., and Kalinina, O.V. (2010). An automated stochastic approach to the identification of the protein specificity determinants and functional subfamilies. *Algorithms for molecular biology : AMB* 5, 29.

McNally, S.G., and Dawson, S.C. (2016). Eight unique basal bodies in the multi-flagellated diplomonad *Giardia lamblia*. *Cilia* 5, 21.

McIntyre, L., Hoang, L., Ong, C.S., Lee, P., and Isaac-Renton, J.L. (2000). Evaluation of molecular techniques to biotype *Giardia duodenalis* collected during an outbreak. *The Journal of parasitology* 86, 172-177.

McRoberts, K.M., Meloni, B.P., Morgan, U.M., Marano, R., Binz, N., Eriandson, S.L., Halse, S.A., and Thompson, R.C. (1996). Morphological and molecular characterization

of *Giardia* isolated from the straw-necked ibis (*Threskiornis spinicollis*) in Western Australia. *The Journal of parasitology* 82, 711-718.

Mersfelder, E.L., and Parthun, M.R. (2006). The tale beyond the tail: histone core domain modifications and the regulation of chromatin structure. *Nucleic acids research* 34, 2653-2662.

Michaud-Levesque, J., and Richard, S. (2009). Thrombospondin-1 is a transcriptional repression target of PRMT6. *The Journal of biological chemistry* 284, 21338-21346.

Migliori, V., Phalke, S., Bezzi, M., and Guccione, E. (2010). Arginine/lysine-methyl/methyl switches: biochemical role of histone arginine methylation in transcriptional regulation. *Epigenomics* 2, 119-137.

Minsky, N., Shema, E., Field, Y., Schuster, M., Segal, E., and Oren, M. (2008). Monoubiquitinated H2B is associated with the transcribed region of highly expressed genes in human cells. *Nature cell biology* 10, 483-488.

Monis, P.T., Andrews, R.H., Mayrhofer, G., and Ey, P.L. (1999). Molecular systematics of the parasitic protozoan *Giardia intestinalis*. *Molecular biology and evolution* 16, 1135-1144.

Monis, P.T., Andrews, R.H., Mayrhofer, G., and Ey, P.L. (2003). Genetic diversity within the morphological species *Giardia intestinalis* and its relationship to host origin. *Infection, genetics and evolution : journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases* 3, 29-38.

Monis, P.T., Caccio, S.M., and Thompson, R.C. (2009). Variation in *Giardia*: towards a taxonomic revision of the genus. *Trends in parasitology* 25, 93-100.

Morf, L., Spycher, C., Rehrauer, H., Fournier, C.A., Morrison, H.G., and Hehl, A.B. (2010). The transcriptional response to encystation stimuli in *Giardia lamblia* is restricted to a small set of genes. *Eukaryotic cell* 9, 1566-1576.

Morris, S.A., Rao, B., Garcia, B.A., Hake, S.B., Diaz, R.L., Shabanowitz, J., Hunt, D.F., Allis, C.D., Lieb, J.D., and Strahl, B.D. (2007). Identification of histone H3 lysine 36 acetylation as a highly conserved histone modification. *The Journal of biological chemistry* 282, 7632-7640.

Morrison, H.G., McArthur, A.G., Gillin, F.D., Aley, S.B., Adam, R.D., Olsen, G.J., Best, A.A., Cande, W.Z., Chen, F., Cipriano, M.J., *et al.* (2007). Genomic minimalism in the early diverging intestinal parasite *Giardia lamblia*. *Science* 317, 1921-1926.

Mowatt, M.R., Lujan, H.D., Cotten, D.B., Bowers, B., Yee, J., Nash, T.E., and Stibbs, H.H. (1995). Developmentally regulated expression of a *Giardia lamblia* cyst wall protein gene. *Molecular microbiology* 15, 955-963.

Nardelli, S.C., Che, F.Y., Silmon de Monerri, N.C., Xiao, H., Nieves, E., Madrid-Aliste, C., Angel, S.O., Sullivan, W.J., Jr., Angeletti, R.H., Kim, K., *et al.* (2013). The histone code of *Toxoplasma gondii* comprises conserved and unique posttranslational modifications. *mBio* 4, e00922-00913.

Nash, T.E., Aggarwal, A., Adam, R.D., Conrad, J.T., and Merritt, J.W., Jr. (1988). Antigenic variation in *Giardia lamblia*. *Journal of immunology* 141, 636-641.

Nash, T.E., and Mowatt, M.R. (1992). Characterization of a *Giardia lamblia* variant-specific surface protein (VSP) gene from isolate GS/M and estimation of the VSP gene repertoire size. *Molecular and biochemical parasitology* 51, 219-227.

Nash, T.E., and Mowatt, M.R. (1993). Variant-specific surface proteins of *Giardia lamblia* are zinc-binding proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90, 5489-5493.

Nino, C.A., Chaparro, J., Soffientini, P., Polo, S., and Wasserman, M. (2013). Ubiquitination dynamics in the early-branching eukaryote *Giardia intestinalis*. *MicrobiologyOpen* 2, 525-539.

Nino, C.A., Prucca, C.G., Chaparro, J., Lujan, H.D., and Wasserman, M. (2012). The ubiquitin-activating enzyme (E1) of the early-branching eukaryote *Giardia intestinalis* shows unusual proteolytic modifications and play important roles during encystation. *Acta tropica* 123, 39-46.

Nishioka, K., Chuikov, S., Sarma, K., Erdjument-Bromage, H., Allis, C.D., Tempst, P., and Reinberg, D. (2002). Set9, a novel histone H3 methyltransferase that facilitates transcription by precluding histone tail modifications required for heterochromatin formation. *Genes & development* 16, 479-489.

Nohynkova, E., Draber, P., Reischig, J., and Kulda, J. (2000). Localization of gamma-tubulin in interphase and mitotic cells of a unicellular eukaryote, *Giardia intestinalis*. *European journal of cell biology* 79, 438-445.

Novak, L., Zubacova, Z., Karnkowska, A., Kolisko, M., Hroudova, M., Stairs, C.W., Simpson, A.G., Keeling, P.J., Roger, A.J., Cepicka, I., *et al.* (2016). Arginine deiminase pathway enzymes: evolutionary history in metamonads and other eukaryotes. *BMC evolutionary biology* 16, 197.

Olins, D.E., and Olins, A.L. (2003). Chromatin history: our view from the bridge. *Nature reviews Molecular cell biology* 4, 809-814.

Osley, M.A. (2006). Regulation of histone H2A and H2B ubiquitylation. *Briefings in functional genomics & proteomics* 5, 179-189.

Pan, Y.J., Cho, C.C., Kao, Y.Y., and Sun, C.H. (2009). A novel WRKY-like protein involved in transcriptional activation of cyst wall protein genes in *Giardia lamblia*. *The Journal of biological chemistry* 284, 17975-17988.

Paradowska, A.S., Miller, D., Spiess, A.N., Vieweg, M., Cerna, M., Dvorakova-Hortova, K., Bartkuhn, M., Schuppe, H.C., Weidner, W., and Steger, K. (2012). Genome wide identification of promoter binding sites for H4K12ac in human sperm and its relevance for early embryonic development. *Epigenetics* 7, 1057-1070.

Park, C.S., Rehrauer, H., and Mansuy, I.M. (2013). Genome-wide analysis of H4K5 acetylation associated with fear memory in mice. *BMC genomics* 14, 539.

Peleg, S., Sananbenesi, F., Zovoilis, A., Burkhardt, S., Bahari-Javan, S., Agis-Balboa, R.C., Cota, P., Wittnam, J.L., Gogol-Doering, A., Opitz, L., *et al.* (2010). Altered histone acetylation is associated with age-dependent memory impairment in mice. *Science* 328, 753-756.

Piva, B., and Benchimol, M. (2004). The median body of *Giardia lamblia*: an ultrastructural study. *Biology of the cell* 96, 735-746.

Prucca, C.G., Slavin, I., Quiroga, R., Elias, E.V., Rivero, F.D., Saura, A., Carranza, P.G., and Lujan, H.D. (2008). Antigenic variation in *Giardia lamblia* is regulated by RNA interference. *Nature* 456, 750-754.

Rando, O.J. (2012). Combinatorial complexity in chromatin structure and function: revisiting the histone code. *Current opinion in genetics & development* 22, 148-155.

Richmond, T.J., Finch, J.T., Rushton, B., Rhodes, D., and Klug, A. (1984). Structure of the nucleosome core particle at 7 Å resolution. *Nature* 311, 532-537.

Rivero, M.R., Jausoro, I., Bisbal, M., Feliziani, C., Lanfredi-Rangel, A., and Touz, M.C. (2013). Receptor-mediated endocytosis and trafficking between endosomal-lysosomal vacuoles in *Giardia lamblia*. *Parasitology research* 112, 1813-1818.

Roger, A.J., Svard, S.G., Tovar, J., Clark, C.G., Smith, M.W., Gillin, F.D., and Sogin, M.L. (1998). A mitochondrial-like chaperonin 60 gene in *Giardia lamblia*: evidence that diplomonads once harbored an endosymbiont related to the progenitor of mitochondria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95, 229-234.

Ropolo, A.S., and Touz, M.C. (2010). A lesson in survival, by *Giardia lamblia*. *TheScientificWorldJournal* 10, 2019-2031.

Rougeulle, C., Chaumeil, J., Sarma, K., Allis, C.D., Reinberg, D., Avner, P., and Heard, E. (2004). Differential histone H3 Lys-9 and Lys-27 methylation profiles on the X chromosome. *Molecular and cellular biology* 24, 5475-5484.

Ruthenburg, A.J., Li, H., Patel, D.J., and Allis, C.D. (2007). Multivalent engagement of chromatin modifications by linked binding modules. *Nature reviews Molecular cell biology* 8, 983-994.

Sagolla, M.S., Dawson, S.C., Mancuso, J.J., and Cande, W.Z. (2006). Three-dimensional analysis of mitosis and cytokinesis in the binucleate parasite *Giardia intestinalis*. *Journal of cell science* 119, 4889-4900.

Sakabe, K., Wang, Z., and Hart, G.W. (2010). Beta-N-acetylglucosamine (O-GlcNAc) is part of the histone code. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107, 19915-19920.

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

Sambrook, J., and Gething, M.J. (1989). Protein structure. Chaperones, paperones. *Nature* 342, 224-225.

Savioli, L., Smith, H., and Thompson, A. (2006). *Giardia* and *Cryptosporidium* join the 'Neglected Diseases Initiative'. *Trends in parasitology* 22, 203-208.

Schiltz, R.L., Mizzen, C.A., Vassilev, A., Cook, R.G., Allis, C.D., and Nakatani, Y. (1999). Overlapping but distinct patterns of histone acetylation by the human

coactivators p300 and PCAF within nucleosomal substrates. *The Journal of biological chemistry* 274, 1189-1192.

Schneider, R., Bannister, A.J., Weise, C., and Kouzarides, T. (2004). Direct binding of INHAT to H3 tails disrupted by modifications. *The Journal of biological chemistry* 279, 23859-23862.

Schofield, P.J., Costello, M., Edwards, M.R., and O'Sullivan, W.J. (1990). The arginine dihydrolase pathway is present in *Giardia intestinalis*. *International journal for parasitology* 20, 697-699.

Schotta, G., Lachner, M., Sarma, K., Ebert, A., Sengupta, R., Reuter, G., Reinberg, D., and Jenuwein, T. (2004). A silencing pathway to induce H3-K9 and H4-K20 trimethylation at constitutive heterochromatin. *Genes & development* 18, 1251-1262.

Schubert, H.L., Blumenthal, R.M., and Cheng, X. (2003). Many paths to methyltransfer: a chronicle of convergence. *Trends in biochemical sciences* 28, 329-335.

Schwartz, S., Meshorer, E., and Ast, G. (2009). Chromatin organization marks exon-intron structure. *Nature structural & molecular biology* 16, 990-995.

Selvi, B.R., Swaminathan, A., Maheshwari, U., Nagabhushana, A., Mishra, R.K., and Kundu, T.K. (2015). CARM1 regulates astroglial lineage through transcriptional regulation of Nanog and posttranscriptional regulation by miR92a. *Molecular biology of the cell* 26, 316-326.

Shahbazian, M.D., Zhang, K., and Grunstein, M. (2005). Histone H2B ubiquitylation controls processive methylation but not monomethylation by Dot1 and Set1. *Molecular cell* 19, 271-277.

Shema, E., Tirosh, I., Aylon, Y., Huang, J., Ye, C., Moskovits, N., Raver-Shapira, N., Minsky, N., Pirngruber, J., Tarcic, G., *et al.* (2008). The histone H2B-specific ubiquitin ligase RNF20/hBRE1 acts as a putative tumor suppressor through selective regulation of gene expression. *Genes & development* 22, 2664-2676.

Shogren-Knaak, M., Ishii, H., Sun, J.M., Pazin, M.J., Davie, J.R., and Peterson, C.L. (2006). Histone H4-K16 acetylation controls chromatin structure and protein interactions. *Science* 311, 844-847.

Simonetti, F.L., Teppa, E., Chernomoretz, A., Nielsen, M., and Marino Buslje, C. (2013). MISTIC: Mutual information server to infer coevolution. *Nucleic acids research* 41, W8-14.

Singer, S.M., Yee, J., and Nash, T.E. (1998). Episomal and integrated maintenance of foreign DNA in *Giardia lamblia*. *Molecular and biochemical parasitology* 92, 59-69.

Smith, P.D., Keister, D.B., and Elson, C.O. (1983). Human host response to *Giardia lamblia*. II. Antibody-dependent killing in vitro. *Cellular immunology* 82, 308-315.

Solari, A.J., Rahn, M.I., Saura, A., and Lujan, H.D. (2003). A unique mechanism of nuclear division in *Giardia lamblia* involves components of the ventral disk and the nuclear envelope. *Biocell : official journal of the Sociedades Latinoamericanas de Microscopia Electronica et al* 27, 329-346.

Soltys, B.J., Falah, M., and Gupta, R.S. (1996). Identification of endoplasmic reticulum in the primitive eukaryote *Giardia lamblia* using cryoelectron microscopy and antibody to Bip. *Journal of cell science* 109 (Pt 7), 1909-1917.

Sonda, S., Morf, L., Bottova, I., Baetschmann, H., Rehrauer, H., Caflisch, A., Hakimi, M.A., and Hehl, A.B. (2010). Epigenetic mechanisms regulate stage differentiation in the minimized protozoan *Giardia lamblia*. *Molecular microbiology* 76, 48-67.

Sousa, M.C., Goncalves, C.A., Bairos, V.A., and Poiares-Da-Silva, J. (2001). Adherence of *Giardia lamblia* trophozoites to Int-407 human intestinal cells. *Clinical and diagnostic laboratory immunology* 8, 258-265.

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

Sulaiman, I.M., Xiao, L., and Lal, A.A. (1999). Evaluation of *Cryptosporidium parvum* genotyping techniques. *Applied and environmental microbiology* 65, 4431-4435.

Sun, C.H., McCaffery, J.M., Reiner, D.S., and Gillin, F.D. (2003). Mining the *Giardia lamblia* genome for new cyst wall proteins. *The Journal of biological chemistry* 278, 21701-21708.

Sun, C.H., Palm, D., McArthur, A.G., Svard, S.G., and Gillin, F.D. (2002). A novel Myb-related protein involved in transcriptional activation of encystation genes in *Giardia lamblia*. *Molecular microbiology* 46, 971-984.

Sun, C.H., Su, L.H., and Gillin, F.D. (2006). Novel plant-GARP-like transcription factors in *Giardia lamblia*. *Molecular and biochemical parasitology* 146, 45-57.

Suryadinata, R., Roesley, S.N., Yang, G., and Sarcevic, B. (2014). Mechanisms of generating polyubiquitin chains of different topology. *Cells* 3, 674-689.

Tachezy, J., Sanchez, L.B., and Muller, M. (2001). Mitochondrial type iron-sulfur cluster assembly in the amitochondriate eukaryotes *Trichomonas vaginalis* and *Giardia intestinalis*, as indicated by the phylogeny of IscS. *Molecular biology and evolution* 18, 1919-1928.

Talbert, P.B., and Henikoff, S. (2010). Histone variants--ancient wrap artists of the epigenome. *Nature reviews Molecular cell biology* 11, 264-275.

Thatcher, T.H., and Gorovsky, M.A. (1994). Phylogenetic analysis of the core histones H2A, H2B, H3, and H4. *Nucleic acids research* 22, 174-179.

Thinnes, C.C., England, K.S., Kawamura, A., Chowdhury, R., Schofield, C.J., and Hopkinson, R.J. (2014). Targeting histone lysine demethylases - progress, challenges, and the future. *Biochimica et biophysica acta* 1839, 1416-1432.

Thirion, J., Wattiaux, R., and Jadot, M. (2003). The acid phosphatase positive organelles of the *Giardia lamblia* trophozoite contain a membrane bound cathepsin C activity. *Biology of the cell* 95, 99-105.

Thompson, R.C., Hopkins, R.M., and Homan, W.L. (2000). Nomenclature and genetic groupings of *Giardia* infecting mammals. *Parasitology today* 16, 210-213.

Tian, X.F., Yang, Z.H., Shen, H., Adam, R.D., and Lu, S.Q. (2010). Identification of the nucleoli of *Giardia lamblia* with TEM and CFM. *Parasitology research* 106, 789-793.

Tie, F., Banerjee, R., Stratton, C.A., Prasad-Sinha, J., Stepanik, V., Zlobin, A., Diaz, M.O., Scacheri, P.C., and Harte, P.J. (2009). CBP-mediated acetylation of histone H3 lysine 27 antagonizes *Drosophila* Polycomb silencing. *Development* 136, 3131-3141.

Torres-Padilla, M.E., Parfitt, D.E., Kouzarides, T., and Zernicka-Goetz, M. (2007). Histone arginine methylation regulates pluripotency in the early mouse embryo. *Nature* 445, 214-218.

Touz, M.C., Gottig, N., Nash, T.E., and Lujan, H.D. (2002). Identification and characterization of a novel secretory granule calcium-binding protein from the early branching eukaryote *Giardia lamblia*. *The Journal of biological chemistry* 277, 50557-50563.

Touz, M.C., Kulakova, L., and Nash, T.E. (2004). Adaptor protein complex 1 mediates the transport of lysosomal proteins from a Golgi-like organelle to peripheral vacuoles in the primitive eukaryote *Giardia lamblia*. *Molecular biology of the cell* 15, 3053-3060.

Touz, M.C., Lujan, H.D., Hayes, S.F., and Nash, T.E. (2003). Sorting of encystation-specific cysteine protease to lysosome-like peripheral vacuoles in *Giardia lamblia* requires a conserved tyrosine-based motif. *The Journal of biological chemistry* 278, 6420-6426.

Touz, M.C., Ropolo, A.S., Rivero, M.R., Vranich, C.V., Conrad, J.T., Svard, S.G., and Nash, T.E. (2008). Arginine deiminase has multiple regulatory roles in the biology of *Giardia lamblia*. *Journal of cell science* 121, 2930-2938.

Touz, M.C., and Zamponi, N. (2017). Sorting without a Golgi complex. *Traffic* 18, 637-645.

Tovar, J., Leon-Avila, G., Sanchez, L.B., Sutak, R., Tachezy, J., van der Giezen, M., Hernandez, M., Muller, M., and Lucocq, J.M. (2003). Mitochondrial remnant organelles of *Giardia* function in iron-sulphur protein maturation. *Nature* 426, 172-176.

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

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

Triana, O., Galanti, N., Olea, N., Hellman, U., Wernstedt, C., Lujan, H., Medina, C., and Toro, G.C. (2001). Chromatin and histones from *Giardia lamblia*: a new puzzle in primitive eukaryotes. *Journal of cellular biochemistry* 82, 573-582.

Tschiersch, B., Hofmann, A., Krauss, V., Dorn, R., Korge, G., and Reuter, G. (1994). The protein encoded by the *Drosophila* position-effect variegation suppressor gene *Su(var)3-9* combines domains of antagonistic regulators of homeotic gene complexes. *The EMBO journal* 13, 3822-3831.

Turner, B.M. (1993). Decoding the nucleosome. *Cell* 75, 5-8.

Turner, B.M. (2000). Histone acetylation and an epigenetic code. *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology* 22, 836-845.

Upcroft, J.A., Krauer, K.G., and Upcroft, P. (2010). Chromosome sequence maps of the *Giardia lamblia* assemblage A isolate WB. *Trends in parasitology* 26, 484-491.

Van Aller, G.S., Reynoird, N., Barbash, O., Huddleston, M., Liu, S., Zmoos, A.F., McDevitt, P., Sinnamon, R., Le, B., Mas, G., *et al.* (2012). Smyd3 regulates cancer cell phenotypes and catalyzes histone H4 lysine 5 methylation. *Epigenetics* 7, 340-343.

van der Heijden, G.W., Derijck, A.A., Ramos, L., Giele, M., van der Vlag, J., and de Boer, P. (2006). Transmission of modified nucleosomes from the mouse male germline to the zygote and subsequent remodeling of paternal chromatin. *Developmental biology* 298, 458-469.

Vaquero, A. (2009). The conserved role of sirtuins in chromatin regulation. *The International journal of developmental biology* 53, 303-322.

Vaquero, A., Scher, M., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Serrano, L., and Reinberg, D. (2007). SIRT1 regulates the histone methyl-transferase SUV39H1 during heterochromatin formation. *Nature* 450, 440-444.

Voigt, P., Tee, W.W., and Reinberg, D. (2013). A double take on bivalent promoters. *Genes & development* 27, 1318-1338.

Vranych, C.V., Rivero, M.R., Merino, M.C., Mayol, G.F., Zamponi, N., Maletto, B.A., Pistoiresi-Palencia, M.C., Touz, M.C., and Ropolo, A.S. (2014). SUMOylation and deimination of proteins: two epigenetic modifications involved in *Giardia* encystation. *Biochimica et biophysica acta* 1843, 1805-1817.

Wang, C.C., and Aldritt, S. (1983). Purine salvage networks in *Giardia lamblia*. *The Journal of experimental medicine* 158, 1703-1712.

Wang, C.H., Su, L.H., and Sun, C.H. (2007). A novel ARID/Bright-like protein involved in transcriptional activation of cyst wall protein 1 gene in *Giardia lamblia*. *The Journal of biological chemistry* 282, 8905-8914.

Wang, S., Peng, J., and Xu, J. (2011). Alignment of distantly related protein structures: algorithm, bound and implications to homology modeling. *Bioinformatics* 27, 2537-2545.

Wang, Y., Wysocka, J., Sayegh, J., Lee, Y.H., Perlin, J.R., Leonelli, L., Sonbuchner, L.S., McDonald, C.H., Cook, R.G., Dou, Y., *et al.* (2004). Human PAD4 regulates histone arginine methylation levels via demethylination. *Science* 306, 279-283.

Wang, Y.H., Zheng, G.X., and Li, Y.J. (2016). *Giardia duodenalis* GIsir2.2, homolog of SIRT1, is a nuclear-located and NAD(+)-dependent deacetylase. *Experimental parasitology* 169, 28-33.

Wang, Z., Zang, C., Rosenfeld, J.A., Schones, D.E., Barski, A., Cuddapah, S., Cui, K., Roh, T.Y., Peng, W., Zhang, M.Q., *et al.* (2008). Combinatorial patterns of histone acetylations and methylations in the human genome. *Nature genetics* 40, 897-903.

Weake, V.M., and Workman, J.L. (2008). Histone ubiquitination: triggering gene activity. *Molecular cell* 29, 653-663.

Wielinga, C.M., and Thompson, R.C. (2007). Comparative evaluation of *Giardia duodenalis* sequence data. *Parasitology* 134, 1795-1821.

Wiesehahn, G.P., Jarroll, E.L., Lindmark, D.G., Meyer, E.A., and Hallick, L.M. (1984). *Giardia lamblia*: autoradiographic analysis of nuclear replication. *Experimental parasitology* 58, 94-100.

Wisniewski, J.R., Zougman, A., Kruger, S., and Mann, M. (2007). Mass spectrometric mapping of linker histone H1 variants reveals multiple acetylations, methylations, and phosphorylation as well as differences between cell culture and tissue. *Molecular & cellular proteomics : MCP* 6, 72-87.

Wu, Q., Bruce, A.W., Jedrusik, A., Ellis, P.D., Andrews, R.M., Langford, C.F., Glover, D.M., and Zernicka-Goetz, M. (2009). CARM1 is required in embryonic stem cells to maintain pluripotency and resist differentiation. *Stem cells* 27, 2637-2645.

Wysocka, J., Swigut, T., Milne, T.A., Dou, Y., Zhang, X., Burlingame, A.L., Roeder, R.G., Brivanlou, A.H., and Allis, C.D. (2005). WDR5 associates with histone H3 methylated at K4 and is essential for H3 K4 methylation and vertebrate development. *Cell* 121, 859-872.

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

Yang, J., Yan, R., Roy, A., Xu, D., Poisson, J., and Zhang, Y. (2015). The I-TASSER Suite: protein structure and function prediction. *Nature methods* 12, 7-8.

Yang, J., and Zhang, Y. (2015). I-TASSER server: new development for protein structure and function predictions. *Nucleic acids research* *43*, W174-181.

Yee, J., Tang, A., Lau, W.L., Ritter, H., Delpont, D., Page, M., Adam, R.D., Muller, M., and Wu, G. (2007). Core histone genes of *Giardia intestinalis*: genomic organization, promoter structure, and expression. *BMC molecular biology* *8*, 26.

Yeom, S., Oh, J., Lee, E.J., and Lee, J.S. (2018). Positive Charge of Arginine Residues on Histone H4 Tail Is Required for Maintenance of Mating Type in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of microbiology and biotechnology* *28*, 1573-1579.

Zaratiegui, M., Irvine, D.V., and Martienssen, R.A. (2007). Noncoding RNAs and gene silencing. *Cell* *128*, 763-776.

Zee, B.M., Levin, R.S., Xu, B., LeRoy, G., Wingreen, N.S., and Garcia, B.A. (2010). In vivo residue-specific histone methylation dynamics. *The Journal of biological chemistry* *285*, 3341-3350.

Zeng, L., and Zhou, M.M. (2002). Bromodomain: an acetyl-lysine binding domain. *FEBS letters* *513*, 124-128.

Zhang, Y., Griffin, K., Mondal, N., and Parvin, J.D. (2004). Phosphorylation of histone H2A inhibits transcription on chromatin templates. *The Journal of biological chemistry* *279*, 21866-21872.

Zhao, R., Nakamura, T., Fu, Y., Lazar, Z., and Spector, D.L. (2011). Gene bookmarking accelerates the kinetics of post-mitotic transcriptional re-activation. *Nature cell biology* *13*, 1295-1304.

Zhou, Y., and Grummt, I. (2005). The PHD finger/bromodomain of NoRC interacts with acetylated histone H4K16 and is sufficient for rDNA silencing. *Current biology : CB* *15*, 1434-1438.

Zhu, B., Zheng, Y., Pham, A.D., Mandal, S.S., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., and Reinberg, D. (2005). Monoubiquitination of human histone H2B: the factors involved and their roles in HOX gene regulation. *Molecular cell* *20*, 601-611.

Zinchuk, V., Zinchuk, O., and Okada, T. (2007). Quantitative colocalization analysis of multicolor confocal immunofluorescence microscopy images: pushing pixels to explore biological phenomena. *Acta histochemica et cytochemica* *40*, 101-111.