

Tesis Doctoral

# El complejo de ubiquitinación SCF en Trypanosoma brucei y su función en la regulación del ciclo celular

Rojas, Federico

2010

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en [digital.bl.fcen.uba.ar](http://digital.bl.fcen.uba.ar). Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in [digital.bl.fcen.uba.ar](http://digital.bl.fcen.uba.ar). It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Rojas, Federico. (2010). El complejo de ubiquitinación SCF en Trypanosoma brucei y su función en la regulación del ciclo celular. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

Rojas, Federico. "El complejo de ubiquitinación SCF en Trypanosoma brucei y su función en la regulación del ciclo celular". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2010.

**EXACTAS** UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



**UBA**

Universidad de Buenos Aires



UNIVERSIDAD NACIONAL DE BUENOS AIRES  
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

**El complejo de ubiquitinación SCF en  
*Trypanosoma brucei* y su función en la regulación  
del ciclo celular**

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de  
Buenos Aires en el área Ciencias Biológicas

Lic. Federico Rojas

Director: Dra. María Teresa Téllez-Iñón.

Consejero de Estudios: Dr. Jorge Prometeo Muschietti

Lugar de Trabajo

Instituto de Investigaciones en Genética y Biología Molecular  
CONICET

Buenos Aires, 2010

## Resumen

El sistema ubiquitina-proteasoma es una vía reguladora fundamental para controlar la estabilidad de las proteínas dentro de varios procesos celulares, como la señalización y el ciclo celular. En respuesta a señales particulares, proteínas reguladoras específicas son marcadas con una cadena de moléculas de ubiquitina a través de la acción de una cascada enzimática compuesta por una enzima activadora de la ubiquitina (E1), una enzima conjugadora de la ubiquitina (E2), y una ubiquitina ligasa (E3). Las E3 son responsables de unir los sustratos y acercarlos a la E2 cargada con ubiquitina, la cual luego transfiere la ubiquitina al sustrato y a la siguiente ubiquitina de la cadena en una reacción secuencial. Una de las ubiquitina ligasa E3 responsables en el control directo de proteínas involucradas en el ciclo celular es el complejo SCF (SKP1-CUL1-F-box). En esta tesis se estudió cuál es la función de las proteínas que forman parte del complejo SCF en la regulación del ciclo celular de *Trypanosoma brucei*. El análisis de los genomas de Tripanosomátidos mostró que las cuatro proteínas que forman parte del complejo se encuentran conservadas, a excepción de las proteínas F-box. Utilizando la técnica de ARN de interferencia en los dos estadios del ciclo de vida de *Trypanosoma brucei*, se determinó en que fase del ciclo celular estas proteínas tienen una función preponderante. Los resultados obtenidos muestran que las subunidades del complejo actúan en diferentes momentos del ciclo celular. No solo se demostró que la actividad del complejo SCF es importante para el crecimiento de los parásitos *in vitro*, sino que la enzima conjugadora de ubiquitina es necesaria para que los parásitos establezcan una infección en un hospedador mamífero. A su vez, se utilizó la técnica de Electroforesis bidimensional diferencial en gel (2D-DIGE) con el objetivo de identificar posibles sustratos del complejo de ubiquitinación. Este trabajo describe por primera vez la actividad de las subunidades homólogas del complejo SCF en el parásito *Trypanosoma brucei*.

## Abstract

The ubiquitin–proteasome system (UPS) is a fundamental regulatory pathway for controlling protein stability that underlies many cellular processes, such as signaling and cell cycle progression. In response to particular signals, specific regulatory proteins are tagged with a chain of ubiquitin molecules through the action of an enzymatic cascade composed of an E1 ubiquitin activating enzyme, an E2 ubiquitin conjugating enzyme (Ubc), and an E3 ubiquitin ligase. E3s are responsible for binding substrates and for bringing substrates into the proximity of a ubiquitin-charged E2, which then transfers ubiquitin to the substrate and to the ensuing ubiquitin chain in a processive reaction. One of the E3 responsible for the ubiquitination of cell cycle regulators is the SCF complex (SKP1-CUL1-F-box). In this thesis, we have studied the function of the proteins that form the core of the SCF complex in the *Trypanosoma brucei* cell cycle. The analysis of the Trypanosome genomes showed us that the four core subunit homologs are conserved, with the exception of the F-box proteins. Using RNA interference in both life cycle stages of *Trypanosoma brucei*, we were able to determine the cell cycle stages in which these proteins have important roles. The obtained results show that the subunits of the complex act at different points in the cell cycle. Not only we demonstrated that the activity of the complex is important for the parasites growth *in vitro*, but we showed that the ubiquitin conjugating enzyme is indispensable for establishing an infection in a mammalian host. At the same time, we utilized the Two-dimensional gel electrophoresis (2D-PAGE) technique for the purpose of identifying possible substrates of the ubiquitination complex. This work analyzes for the first time the activity of the subunits of the SCF complex in a lower eukaryote organism.

# ***INDICE***

1. INTRODUCCION	11
• <i>Introducción</i>	12
• Introducción general a los Tripanosomátidos	13
• Trypanosoma cruzi y Trypanosoma brucei	16
• <i>El ciclo de vida</i>	16
• Las Enfermedades: Enfermedad de Chagas y Enfermedad del Sueño.	18
• <i>Las enfermedades, su patogénesis y diagnóstico</i>	19
• Ciclo Celular	22
• <i>Control del ciclo celular</i>	22
• <i>Ciclo celular en Tripanosomátidos</i>	25
• Modificación de proteínas por Ubiquitina y proteínas similares a ubiquitina	27
• <i>Enzima Activadora de la ubiquitina (E1)</i>	29
• <i>Las Ubiquitin Ligasas (E3)</i>	34
• <i>La función de la proteólisis dependiente de ubiquitina en el ciclo celular</i>	36
• <i>Ubiquitinación en Tripanosomátidos</i>	38
2. OBJETIVOS	40
• Objetivo general	41
• Objetivos particulares	41
3. RESULTADOS	42
• Análisis in silico del complejo SCF en Tripanosomátidos	44
• ARN de interferencia	49
• <i>ARNi de TbRbx1</i>	51
• <i>RNAi de TbCDC34</i>	53
• <i>RNAi de TbSKP1</i>	56
• <i>RNAi de TbCullin1</i>	58
• <i>Sobreexpresión de TbSkp1</i>	60
• <i>Sobreexpresión de TbCdc34</i>	61
• <i>Ensayo de formación de intermediario tioéster</i>	64

• <i>Localización de TbCdc34</i>	65
• <i>Etiquetado (Epitope Tagging) de TbCdc34</i>	67
• <i>TbCDC34 es esencial para la infección en ratones</i>	71
• <i>Busqueda de sustratos del complejo SCF</i>	73
• <i>Electroforesis bidimensional diferencial en gel (2D-DIGE)</i>	73
• <i>2D-DIGE del ARNi de TbSkp1</i>	75
• <i>2D-DIGE del ARNi de TbCdc34</i>	77
4. DISCUSIÓN	81
5. CONCLUSIONES	94
6. MATERIALES Y MÉTODOS	95
• <i>Análisis Bioinformático</i>	97
• <i>Métodos de ADN y ARN</i>	98
• <i>Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)</i>	98
• <i>Clonado en TOPO TA</i>	99
• <i>Digestiones con endonucleasas de restricción</i>	99
• <i>Purificación de fragmentos de ADN de geles de agarosa</i>	100
• <i>Purificación de fragmentos de ADN de geles</i>	100
• <i>Cuantificación de ADN y ARN</i>	100
• <i>Mutagénesis dirigida</i>	100
• <i>Real-time RT-PCR cuantitativa</i>	101
• <i>Lista de Primers utilizados</i>	102
• <i>Técnicas de hibridación de ácidos nucleicos</i>	103
• <i>Purificación de ARN total</i>	103
• <i>Northern blot</i>	103
• <i>Técnicas con bacterias</i>	104
• <i>Preparación de bacterias competentes</i>	104
• <i>Transformación de bacterias competentes</i>	105
• <i>Técnicas utilizadas en ensayos con parásitos</i>	106
• <i>Determinación de densidad celular</i>	106

• <i>Cultivos de T. brucei</i>	106
• <i>Transfección de parásitos</i>	106
• <i>ARN de interferencia y Sobreexpresiones</i>	107
• <i>FACS (fluorescence activated cell sorting) para análisis de ciclo celular</i>	108
• <i>Sincronización de parásitos</i>	108
• <i>Obtención de extractos proteicos.</i>	108
• <i>Inmunofluorescencia indirecta (IIF)</i>	109
• <i>Infecciones en ratones</i>	110
• <b>Técnicas con proteínas</b>	110
• <i>Expresión de proteínas recombinantes</i>	110
• <i>SDS-PAGE</i>	112
• <i>Electrotransferencia de proteínas y Western blot.</i>	113
• <i>Ensayo de intermediario tioéster de la enzima E2</i>	113
• <i>Matriz de retención de proteínas ubiquitinadas</i>	114
• <i>Sistema Ettan DIGE (Amersham Biosciences)</i>	114
<b>7. ANEXO</b>	<b>119</b>
<b>8. BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>121</b>

## **AGRADECIMIENTOS**

El primer agradecimiento es para la Dra. Tere, que durante estos más de 7 años en su laboratorio me ha brindado confianza, libertad y preocupación de una madre. Gracias a su estímulo y aliento, ha sido posible esta tesis. El arduo camino en el aprendizaje y realización de esta tesis ha sido allanado gracias a los sabios consejos de personas que están y quedarán en mi memoria, y que son nombradas sin un orden establecido:

Jorge Muschietti, quien figura como consejero de estudios, pero que cumplió a su vez el rol de consejero emocional frente a resultados adversos y positivos.

Al enano Llorente, que contribuyó en las *Real time*, los comentarios sobre el trabajo, las peleas, los tragos, la destrucción del autoclave, y tantas cosas que uno valora de un amigo.

A Lucas Bukata, amigo y compañero desde el comienzo de este viaje por la ciencia.

Diego Wengier, el hombre que todo lo sabe, que me ha enseñado desde como usar un FPLC hasta algunas palabras en japonés.

Martín Vázquez, uno de los culpables en la elección de utilizar a *T. brucei* como modelo. Otro acusado de este cargo es Guille Lobo, al cual se lo puede exonerar por ser mi amigo y darme una mano en momentos difíciles.

A Pato, amigo y tenor, que tantas alegrías nos ha dado.

A amigos que ayudaron a pasar un buen momento durante las largas horas de trabajo: Euge, Vani, Paula, Naty Módena, Mauro, Tamara, Leandro, Leti y Santiago.

A los ex-teresos Vero, Sandra, Caro, por los mates y el equipo de electroforesis.

A los que están y ya se fueron del 211, por las risas y los llantos: Marina, Naty, Daniela, Mariana, Esteban, Noelia, Ezequiel, Isa, Manu, Sebas, Pablo, Vero. Esteban agradecimiento doble por las correcciones y comentarios de esta tesis.

A la gente del 209, por los mates y los congresos.

A Mary, Gladys, Pancho, Rubén, el equipo que permite que podamos trabajar y tengamos los materiales necesarios.

A Jeremy Mottram, otra persona que me dio rienda suelta y permitió la realización de muchos de los experimentos.

A Jaqueline Búa por su colaboración en los experimentos en ratones.

Al CONICET y la UBA que permitió la realización de esta tesis.

Al INGEBI, que me albergó durante tantos años y se convirtió en una segunda casa.

A Mirtha y el Doc.

A Boehringer-Ingelheim que permitió la visita a Escocia y todas las cervezas incluidas.

A las personas más importantes en mi vida, Julio, Rosa, Luki y Lu.

Dedicado a mis padres

# ***INTRODUCCION***

## ***Introducción***

En la primera parte de este trabajo, se analizó la presencia de los componentes del complejo SCF de eucariotas superiores en los genomas de *T. brucei*, *T. cruzi* y *L. major*. Una vez identificados, se decidió realizar una caracterización funcional de los mismos en el parásito *T. brucei*, dado que este parásito posee una batería de herramientas genéticas no disponibles en *T. cruzi* o *Leishmania*, como el ARN de interferencia, la sobreexpresión inducible o el etiquetado endógeno. Sin embargo, no se quiso excluir la descripción del ciclo de vida de *T. cruzi* y la enfermedad que produce, dado que esta enfermedad constituye la principal enfermedad tropical endémica de la República Argentina, donde afecta a más de dos millones de personas y su prevalencia está directamente relacionada con las condiciones socioeconómicas de la población. A partir de este cuadro de situación, se trabajó enfocados en obtener la caracterización funcional de las proteínas del complejo SCF de *T. brucei*, con la idea a futuro, de extrapolar y confirmar los resultados en los otros Tripanosomátidos.

## **INTRODUCCIÓN GENERAL A LOS TRIPANOSOMÁTIDOS**

El género *Trypanosoma* fue observado por primera vez en 1841 por Gabriel Valentin; mientras examinaba sangre de una trucha marrón, detectó el organismo unicelular móvil. Un siglo y medio de investigación de estos organismos ha definido a *Trypanosoma* como miembros de un largo y diverso reino protozoario. Los Tripanosomátidos están dentro de los organismos más antiguos que se conocen, divergiendo de *Homo sapiens* hace aproximadamente 1.98 billones de años. Taxonomicamente están ordenados como Kinetoplastida, dado que su ADN mitocondrial (ADNk) se encuentra organizado en una estructura en forma de disco, llamado kinetoplasto [1]. El orden Kinetoplastida incluye al género *Trypanosoma*, que agrupa algunas de las especies causantes de las enfermedades más desatendidas. Varias especies de *Trypanosomas* infectan a la mayor parte de los vertebrados, mientras que otras especies causan importantes enfermedades veterinarias. En el África Sub-Sahariana, *Trypanosoma brucei* (*T. brucei*) causa la enfermedad del sueño o Tripanosomiasis Humana Africana (HAT, por sus siglas en inglés), y en América, *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*) produce la “Enfermedad de Chagas”. Las especies de *Leishmania* son endémicas de Sudamérica y países asiáticos (WHO, 2009).

Gran parte de la biología celular de los diferentes kinetoplastidos es muy similar. Típicamente crecen asexualmente, aunque se ha observado recombinación sexual en *T. brucei*, inferido para *T. cruzi*, y podría ocurrir en algunas especies de *Leishmania*, y se dividen por fisión binaria, durante la cual, su núcleo no sufre disolución de la membrana o condensación cromosómica [2]. El *Trypanosoma* es una célula alargada contenida en una red de microtúbulos muy polarizada. Los microtúbulos muestran una polaridad uniforme, sus extremos *menos* se anclan en la región anterior mientras que en la región posterior sus extremos son *más* [3]. La única copia de las organelas (cuerpo basal, flagelo, kinetoplasto, Golgi y núcleo) se colocan dentro del corsé que forma el citoesqueleto y se concentran entre el extremo posterior y el centro de la célula (Fig. i1). En el extremo posterior se ubica la boca del bolsillo flagelar, desde donde emerge el flagelo, el cual está unido a lo largo de la pared exterior del parásito. El bolsillo flagelar es el único sitio por donde se efectúan los procesos de endo- y exocitosis [4]. Estos procesos son importantes en el estadio sanguíneo, durante el cual la membrana está recubierta de una capa densa de moléculas de glico-

proteínas variables de superficie (VSG) que protegen a la célula de la activación del complemento y del reconocimiento por parte del sistema inmune.

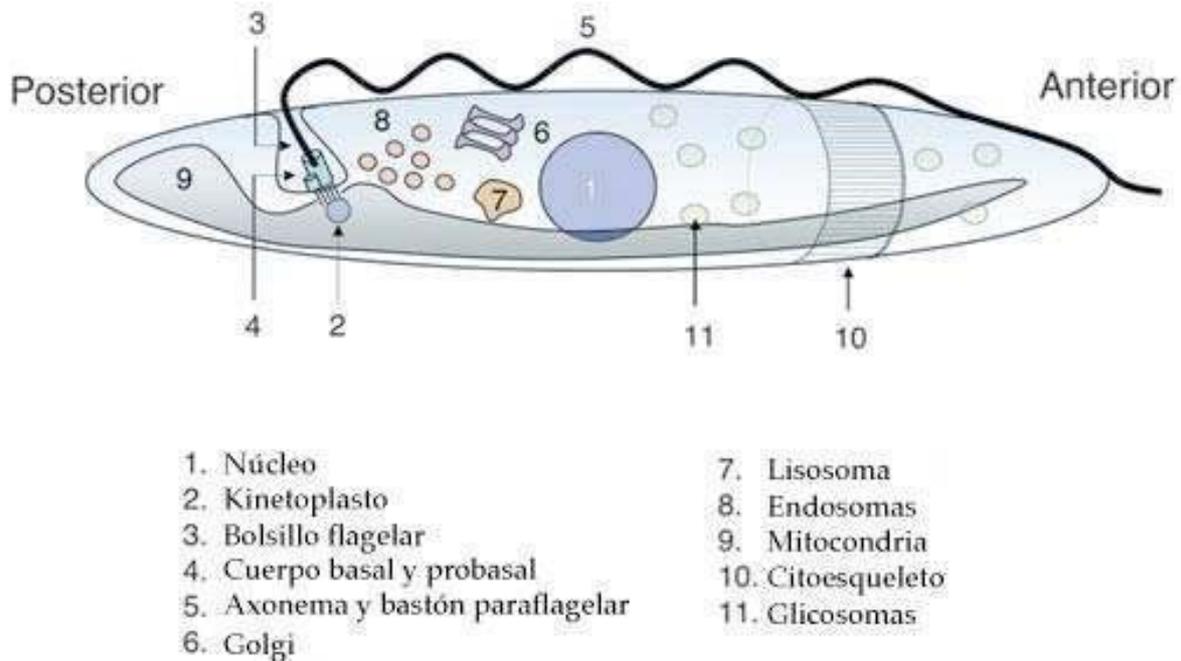


Figura 11 | **Arquitectura del Tripanosoma.** Representación simplificada de la localización de las principales estructuras de la célula. Adaptado de [3].

La motilidad del Tripanosoma depende de su único flagelo, constituido por un axonema de estructura convencional (9+2) asociado a una estructura denominada *paraflagellar rod* (bastón paraflagelar). Esta es una estructura semi-rígida presente en los kinetoplástidos y euglenoides que contribuye a la motilidad del parásito [5]. El flagelo se origina en el cuerpo basal y se enlaza a través de la membrana mitocondrial al genoma mitocondrial (ADNk). La mitocondria es una estructura alargada única que se extiende desde la parte posterior a la anterior de la célula. En las formas sanguíneas, la mitocondria es una estructura tubular simple. Esto refleja la ausencia de respiración mitocondrial durante esta etapa, donde la generación de energía depende de las reacciones glicolíticas en orgánulos especializados denominados glicosomas. En la forma procíclica de *T. brucei*, al carecer de la glucosa proveniente de la sangre, la mitocondria es muy activa [6].

A diferencia del ADN mitocondrial de organismos sin kinetoplasto, el ADNk está organizado formando una malla que contiene cientos de círculos de ADN concatenados entre sí. Estos círculos son de dos tipos: unas ~10.000 copias de mini-círculos y

unas ~50 copias de maxi-círculos por kinetoplasto. La función de los maxi-círculos, como el ADN mitocondrial en los eucariotas convencionales, es codificar para unos pocos genes como los ARNr y las subunidades de los complejos respiratorios. Sin embargo, el mecanismo de expresión génica es poco convencional, ya que los transcriptos de los maxi-círculos deben ser editados para formar un ARN mensajero (ARNm) funcional. La edición (*Editing*) es una asombrosa forma de procesamiento del ARN, donde residuos de uridina son insertados o delecionados de sitios precisos dentro del transcripto del maxi-círculo, generando los marcos abiertos de lectura. Los mini-círculos codifican los ARNs guía, que son templados para la edición de los transcriptos de los maxi-círculos. La edición de ARN es una característica única de parásitos kinetoplásticos que requieren de un complejo de edición multi-proteico llamado editosoma [7].

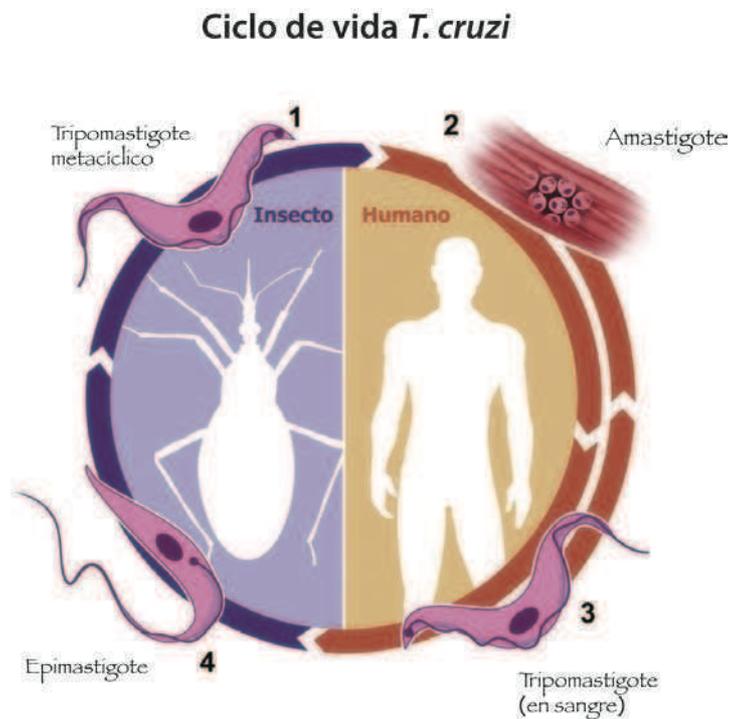
Una de las grandes diferencias que existen entre una célula eucariota superior y un tripanosomátido es a nivel de la expresión génica, donde se da el mayor número de disimilitudes. Entre ellas se incluyen la organización genómica, el control de la transcripción, la transcripción policistrónica, la aparente falta de división de trabajo entre las ARN polimerasas, la carencia de promotores para ARN polimerasa II, el procesamiento de los ARNm por trans-splicing, la edición de mensajeros y la estabilidad de las proteínas. La mayoría de los genes que codifican para proteínas son transcriptos en forma poli-cistrónica y luego procesados individualmente. Los ARNm procesados poseen una cola de poli-A en el extremo 3' y una secuencia de 39 nucleótidos llamada *splice leader* (SL) en el extremo 5'. No se conoce una secuencia consenso de poli-adenilación en estos organismos y se cree que este proceso está acoplado al mecanismo mediante el cual todos los ARNm adquieren la misma secuencia 5' terminal, denominado *trans-splicing*. El primer reporte de *cis-splicing* en Tripanosomátidos corresponde al gen de la poli-A polimerasa, siendo el primer ORF interrumpido por un intrón caracterizado en Tripanosomátidos [8]. Esto implica que el control de la expresión génica es totalmente post-transcripcional, y que los niveles de proteínas son regulados a través de la estabilidad/degradación del ARNm acoplado a una eficiencia de traducción y recambio determinada.

***TRYPANOSOMA CRUZI Y TRYPANOSOMA BRUCEI******El ciclo de vida***

Hay muchas similitudes en el ciclo de vida de estos dos tripanosomas y las enfermedades que causan (Tabla i1). Ambos son flagelados unicelulares transmitidos por insectos hematófagos. Comparten también fases de replicación en la zona de infección del hospedador mamífero, seguida por la diseminación y localización en los órganos blanco. Sin embargo, existen diferencias claves entre estos organismos. Una de ellas es la existencia de una fase intracelular para *T. cruzi*, mientras que todo el ciclo de *T. brucei* es exclusivamente extracelular. El ciclo de vida *T. cruzi* involucra su desarrollo dentro de un hospedador mamífero y un insecto vector intermediario. El insecto vector, en este caso, es un triatomino hematófago, conocido vulgarmente en Argentina con el nombre "Vinchuca" (del quechua "Binchucca"), y cuyo nombre científico es *Triatoma infestans*. En el insecto vector se encuentran la forma **epimastigote**, replicativa y no infectiva, y el **tripomastigote metacíclico** que es la forma infectiva pero no replicativa. El **amastigote**, que tiene capacidad replicativa, y el **tripomastigote** sanguíneo, que no la tiene, son formas presentes en el hospedador mamífero, siendo el amastigote la forma intracelular. Los epimastigotes proliferan en el insecto vector y se diferencian en el intestino posterior del insecto, a la forma tripomastigote metacíclico.

Cuando una vinchuca infectada pica a un mamífero, ingiere la sangre y defeca simultáneamente debido a que necesita todo el espacio posible para la sangre incorporada. Las heces que contienen los parásitos que se han diferenciado a la forma infectiva (tripomastigotes metacíclicos) son depositadas cerca del sitio de la picadura. Luego, el mamífero se rasca permitiendo la penetración de los tripomastigotes metacíclicos al torrente sanguíneo del nuevo hospedador. Los tripomastigotes metacíclicos invaden células de varios tejidos y se diferencian rápidamente a la forma amastigote. Los macrófagos juegan una función importante en la reacción temprana a la infección y en la diseminación de los amastigotes a otros sitios del cuerpo. Luego de varios ciclos de división, los amastigotes se diferencian a tripomastigotes sanguíneos que son liberados al torrente sanguíneo por ruptura de la célula huésped. Estos pueden infectar nuevas células o ser ingeridos por el insecto vector cuando éste se alimenta de la sangre del mamífero infectado. Dentro del insecto, los tripomastigotes

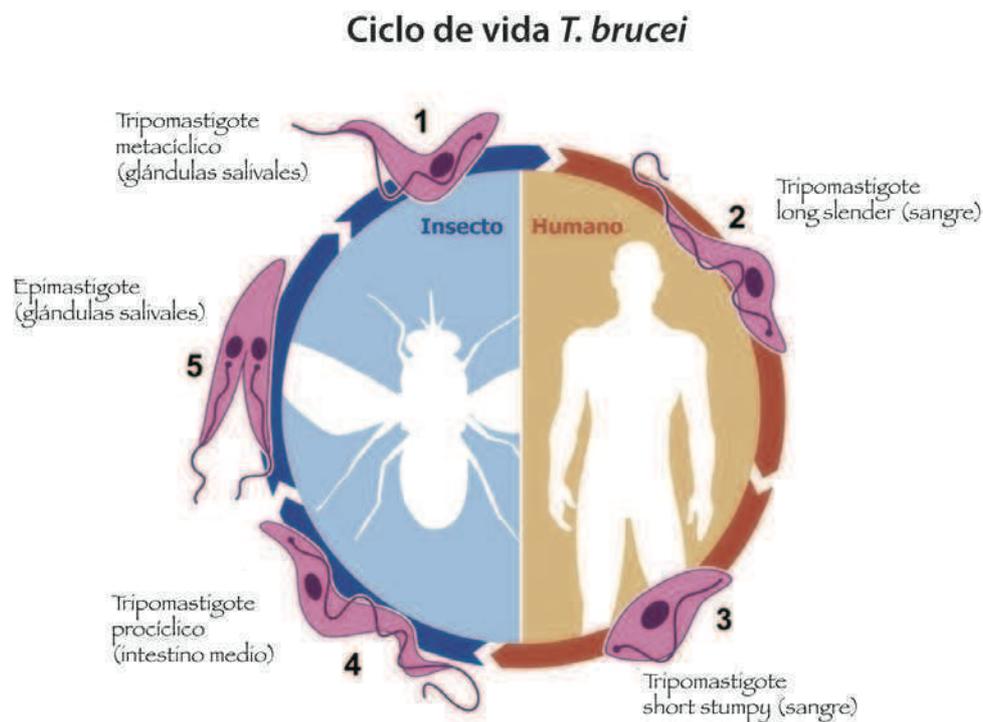
mastigotes sanguíneos provenientes del mamífero se diferencian a epimastigotes al llegar al intestino medio del insecto vector, completándose así el ciclo (figura i2).



**Figura i2** | Tripomastigotes metacíclicos infectivos de *T. cruzi* son transmitidos por las heces de un insecto redúvido durante la ingesta de sangre (1). Los parásitos infectan varios tipos celulares incluyendo células del músculo cardíaco, donde se diferencian a la forma amastigote y se multiplican por fisión binaria (2). Los amastigotes intracelulares se diferencian a tripomastigotes que son liberados a la sangre e invaden otras células o son ingeridos por el vector (3). Los tripomastigotes se transforman a epimastigotes que se multiplican en el intestino medio (4) y finalmente migran al intestino grueso del insecto en la forma de tripomastigotes metacíclicos, continuando el ciclo.

En el caso de *Trypanosoma brucei*, la mosca tse-tsé inocular en el hospedador mamífero tripomastigotes metacíclicos cuando pica y se alimenta de éste (figura i3). Éstos se diferencian rápidamente a tripomastigotes de la forma sanguínea alargada (*long slender*), los cuales comienzan a replicarse en los tejidos subcutáneos. Entre 6 y 10 días posteriores a la infección, los parásitos comienzan a diseminarse y replicarse por todo el cuerpo a través del sistema circulatorio, alcanzando también la linfa y pudiendo alcanzar el sistema nervioso central al traspasar la barrera hematoencefálica. En el pico de parasitemia, algunos tripomastigotes alargados se diferencian a tripomastigotes de la forma sanguínea redondeada (*stumpy*), la cual no es replicativa, pero que está adaptada para sobrevivir en la mosca tse-tsé. Poco después del ingreso de los tripomastigotes redondeados, éstos se diferencian a tripomastigotes

tes procíclicos, la forma replicativa no infectiva. Luego se replican y alcanzan el tracto inicial del intestino medio y se diferencian a la forma metacíclica (mas alargada). Los parásitos migran ahora hacia las glándulas salivales de la mosca donde rápidamente se transforman en epimastigotes, adheridos por el flagelo a la pared de las glándulas. Los epimastigotes continúan replicándose y eventualmente se transforman en tripomastigotes metacíclicos, que serán transmitidos por la mosca al hospedador mamífero, completándose así el ciclo.



**Figura i3** | Los tripomastigotes metacíclicos infectivos de *T. brucei* son transmitidos al hospedador mamífero por la picadura de una mosca tse-tse infectada durante la ingesta de sangre. (1). Los tripomastigotes metacíclicos se transforman al estadio tripomastigote largo y delgado (*long slender*), que se divide en la sangre y fluido de tejidos (2) y finalmente se diferencian, dependiendo de la densidad de parásitos a la forma no proliferativa redondeada (*short stumpy*) (3). Los tripomastigotes *short stumpy* son ingeridos por una mosca tse-tse durante la ingesta de sangre y se transforman a tripomastigotes procíclicos en el intestino medio (4). Tripomastigotes procíclicos se dividen por fisión binaria, colonizan en el insecto, y se transforman al estadio epimastigote en las glándulas salivales.(5), y luego se diferencian a tripomastigotes metacíclicos, continuando el ciclo. Esquema modificado de [120].

### **LAS ENFERMEDADES: ENFERMEDAD DE CHAGAS Y ENFERMEDAD DEL SUEÑO.**

La enfermedad del sueño y el mal de Chagas son enfermedades crónicas que presentan distintas etapas a lo largo de su curso natural. Ambas son potencialmente letales, no se adquiere inmunidad posterior a la infección y no hay vacunas desarro-

lladas. La forma de evasión del sistema inmune también presenta características similares en ambos parásitos, los cuales poseen una densa cubierta de glicoproteínas que les proveen una vía de escape de la respuesta inmune por la gran variabilidad antigénica que presentan.

### ***Las enfermedades, su patogénesis y diagnóstico***

***Enfermedad de Chagas.*** Es prevalente a lo largo de América. Afecta principalmente a la población cuyos hogares proveen de un hábitat para los insectos *Triatominae*. Existen muchos reservorios mamíferos domésticos y salvajes para *T. cruzi*. La enfermedad de Chagas es el resultado de la infección persistente con *T. cruzi* y de complejas interacciones entre el patógeno y la respuesta inmune del huésped, en donde si el sistema inmune está intacto resulta en un bajo número de parásitos, pero raramente se elimina la infección. Se estima que el 30% de los individuos infectados con *T. cruzi* desarrollan la enfermedad clínica, que se manifiesta como una enfermedad cardíaca o ampliación patológica del intestino, décadas después de la infección inicial. A pesar de los avances en la comprensión de la biología *T. cruzi*, sólo el derivado de nitrofurano Nifurtimox y el nitroimidazol Benznidazole están disponibles actualmente para el tratamiento de la enfermedad de Chagas. Ambos se administran por vía oral, pero poseen tratamientos a largo plazo ( $\geq 60$  días) con efectos secundarios, y hay variación en la sensibilidad del parásito a los fármacos [9].

***Human African Trypanosomiasis (HAT).*** Aproximadamente 50 millones de personas viven en zonas de transmisión. Su incidencia resurgió en los 90's debido a disturbios civiles y la falta de la conciencia de la enfermedad, con grandes brotes en Angola, república democrática del Congo, Uganda y Sudan. La HAT es fatal si no es tratada. El primer estadio de la enfermedad (estadio hemolinfático) es acompañado de fiebre, dolor de cabeza, adenopatía, dolor de articulaciones y prurito. El rápido crecimiento del parásito es contrarrestado por las respuestas inmunes del huésped, pero la variación antigénica del parásito permite la evasión inmune, resultando en olas de parasitemia. El segundo estadio de la enfermedad (estadio del Sistema nervioso central) es acompañado por síntomas neurológicos severos que incluyen anomalías mentales, sensoriales y del sueño. El HAT se encuentra en focos a lo

largo de África sub-sahariana, en áreas pobladas por moscas tse-tsé. *Trypanosoma brucei gambiense* causa una enfermedad más aguda en las regiones centrales y del oeste del África sub-sahariana, mientras que *Trypanosoma brucei rhodesiense* lo hace en las regiones este y sur. Estos patógenos son morfológicamente idénticos entre sí con el patógeno no infeccioso de humanos *Trypanosoma brucei brucei*, pero pueden ser distinguidos por los genes que codifican para la proteína asociada a resistencia del suero (*serum resistance-associated (SRA) protein*), y la glicoproteína específica de *T.b. gambiense*, que pueden ser encontradas solamente en los genomas de *T.b. rhodesiense* and *T.b. gambiense*, respectivamente; *T.b. brucei* no posee ninguno de estos genes. Más de 20 especies de moscas tse-tsé (*Glossina* spp.) transmiten los parásitos, pero aproximadamente 1 de cada 1000 moscas exhiben las formas maduras en glándulas salivares, necesarias para transmitir el patógeno a humanos [2]. *T. b. brucei* no es infeccioso en los humanos, en parte porque puede ser lisado por la apolipoproteína L1, un factor tripanolítico presente en el suero humano, mientras que *T. b. gambiense* and *T. b. rhodesiense* han desarrollado resistencia a la tripanolisis humana [10]. La eficacia del tratamiento es limitada, hay pocos medicamentos de seguridad disponibles. Hay cuatro fármacos principales disponibles para el manejo de la infección. Sodio suramina y pentamidin isotionato son usados para los estadios tempranos antes de que se involucre el sistema nervioso central, y tratan las infecciones de *T.b. rhodesiense* and *T. b. gambiense*, respectivamente. En los estadios avanzados, la droga arsénica melarsoprol, es usada para las infecciones de ambas subespecies, mientras que eflornitina (difluorometilornitina; DFMO) es usada para la enfermedad causada por *T. b. gambiense* cuando los pacientes no responden a melarsoprol. Estas drogas son administradas de forma intravenosa o intramuscular, y algunas causan efectos adversos como lesiones de la piel, insuficiencia renal, anomalías cardíacas y encefalopatía fatal [11,12].

**Tabla i1**  
Las enfermedades de *T. brucei* y *T. cruzi*

	HAT	Enfermedad de Chagas
Principales formas o estadios de a enfermedad	Estadio temprano (hemolinfático), estadio tardío (Sistema nervioso central)	Fase Aguda, Indeterminada, crónica (forma cardíaca y digestiva)
Organismos Causantes	<i>T.b. gambiense</i> , <i>T.b. rhodesiense</i>	<i>T. cruzi</i>
Célula/tejido huésped	<i>Extracelular, en sangre, linfa, fluido cerebro espinal, espacios intercelulares</i>	<i>Intracelular, músculo liso, intestino, sistema nervioso central y tejido adiposo</i>
Vectores de importancia médica	<i>Moscas tse-tsé (~20 Glossina spp.)</i>	<i>Triatominae spp.</i>
Transmisión	Picadura de mosca, congénita (raro), transfusión de sangre (raro)	Contaminación de heces de insectos infectados (p.e. en sitio de picadura, en membranas mucosas, en comida o bebida, transfusión de sangre, congénito, trasplante de órganos (raro)
Distribución geográfica	Africa Sub-Sahara (20 países)	América del Sur/central (19 países)
Población en riesgo	50 millones	100 millones
Infectados	70,000–80,000	8–11 millones
Muertes (por año)	~30,000	14,000
Medidas de prevención y control	Vigilancia activa de población en riesgo, tratamiento con drogas de pacientes infectados, trampas para moscas tse-tsé, destrucción del hábitat de la mosca para evitar reinvasión	Tratamiento de casas con insecticidas, tratamiento con drogas en casos agudos, indeterminados tempranos o congénitos, mejoramiento de hogares

Datos obtenidos de [http://www.who.int/neglected\\_diseases/diseases](http://www.who.int/neglected_diseases/diseases)

## **CICLO CELULAR**

El ciclo celular es el proceso ordenado y repetitivo en el tiempo mediante el cual las células crecen y se dividen dando lugar, en la mayoría de los casos, a dos células hijas. El estudio de los mecanismos que controlan el ciclo celular ha permitido identificar distintas etapas, gran cantidad de proteínas involucradas y, en menor grado, la función y su interrelación en el tiempo y el espacio. Notablemente, los componentes básicos identificados (proteínas clave, así como etapas del ciclo) son universales a todas las células eucariotas, lo que ha permitido la utilización de distintos organismos como modelo de estudio y establecer una teoría general en cuanto a su regulación.

El ciclo celular se divide en cuatro fases principales. Durante dos de ellas, las células ejecutan dos eventos básicos en la división celular: la generación de una única y fidedigna copia de su material genético (la fase S o de síntesis) y la partición de todos los componentes celulares entre dos células hijas (fase M o mitosis). La fase G1, consecutiva a la mitosis y previa a S, es un período de intensa actividad metabólica, donde la célula duplica su masa y todos los elementos que contiene. En la fase G2, ubicada luego de S y previa a la mitosis (M), se ensamblan las estructuras específicas necesarias para la separación de los cromosomas y los componentes celulares de forma equitativa. El conjunto de las fases G1, S y G2 recibe el nombre de interfase y normalmente abarca el 90% del tiempo total de un ciclo celular. Las células quiescentes se encuentran detenidas en fase G0

### ***Control del ciclo celular***

Para lograr coordinar y regular al ciclo celular, tanto espacial como temporalmente, existen puntos de control (*Checkpoints*) que previenen la entrada a una nueva fase mientras no se encuentre concluida la anterior. Estos puntos de control se basan en un intrincado sistema de fosforilación/desfosforilación de proteínas que determinan y regulan la actividad, asociación, localización celular y degradación de otras proteínas. Los principales responsables de la coordinación de esta serie de eventos son un grupo de quinasas que conforman una familia denominada quinasas dependien-

tes de ciclinas o CDKs. Estas CDKs fosforilan proteínas en residuos Serina o Treonina que preceden a un residuo Prolina (motivos Ser/Thr-Pro). La actividad de las enzimas CDK, y por lo tanto los puntos de control que regulan, es controlada por múltiples mecanismos. Las CDKs en forma monomérica son inactivas y la unión a una subunidad activadora, una ciclina, es pre-requisito para su actividad quinasa. Por lo tanto, la expresión cíclica y la degradación de las ciclinas determina y restringe la actividad de cada CDK a una ventana reducida de tiempo durante el ciclo celular. Otro nivel de control es ejercido por la fosforilación, que puede activar o inhibir la actividad de las CDK. Como su nombre lo describe, la quinasa activadora de CDK (CAK) activa las CDKs por fosforilación de un residuo conservado en el *loop* de activación. A la inversa, la quinasa Wee1 inhibe las CDKs por fosforilación de residuos dentro del sitio activo, previniendo la unión del ATP. Esta fosforilación puede ser removida por la fosfatasa cdc25, activando las CDK. Finalmente otro nivel de regulación es ejercido por las subunidades inhibitorias de CDK (CKI), como p27 y p21, que se unen a las CDKs.

En levaduras, una sola CDK interactúa con diferentes ciclinas en diferentes momentos a lo largo del ciclo celular [13], mientras que en células de mamíferos, múltiples CDKs interactúan con algunas ciclinas en un patrón secuencial complejo [14]. Las CDKs de G1/S, S y M son inactivas en G1, asegurando que los eventos del ciclo celular no sean disparados inapropiadamente antes de que la célula se comprometa a un nuevo ciclo celular. Tres mecanismos inhibitorios suprimen la actividad de estas CDKs en G1. Dos de estos afectan a las ciclinas: la expresión de los genes de ciclinas es suprimido por proteínas inhibitorias, y la tasa de degradación de ciclinas está aumentada por la activación de un complejo de ubiquitinación, el complejo promotor de la anafase/ciclosoma (APC/C), que degrada ciclinas de fase M y G1. La tercera es la presencia de altas concentraciones de CKI. La entrada a un nuevo ciclo celular comienza cuando señales del exterior de la célula disparan la expresión génica de ciclinas de G1/S y S y la activación de las CDKs. La función principal de los complejos CDKs de G1/S (ciclina A/CDK2) es activar las CDKs de la fase S, mediante la inducción de la destrucción de los CKI, gracias a la actividad de otro complejo de ubiquitinación, el SKP1-Cul1-F-box (SCF), y la inhibición del APC. Las CDKs de S fosforilan proteínas que inician la duplicación de los cromosomas, de este modo iniciando la fase S. Llegando al final de la fase S, se enciende la expresión de ciclinas

de fase M y su concentración aumenta, llevando a la acumulación de complejos CDK/ciclinas M durante G2 (ciclina B/CDK1). En la mayoría de las células, estos complejos son mantenidos inicialmente en forma inactiva por fosforilaciones inhibitorias de la subunidad CDK. Al comienzo de la mitosis, la abrupta remoción de esta fosforilación lleva a la activación de los complejos CDK. Así, se dispara el avance a través del punto de control G2/M. Además de llevar a las células a la fase M, CDK/ciclina M estimulan la activación del APC, el cual dispara la transición de metafase a anafase en mitosis. La función central del APC es estimular la destrucción de proteínas que mantienen unidas a las cromátidas hermanas. También produce la destrucción de las ciclinas de S y M, resultando en la inactivación de las actividades CDKs en mitosis tardía. La inactivación de las CDK permite la desfosforilación de sus blancos mitóticos requerido para el desensamblaje del huso y la terminación de la fase M (Figura i4).

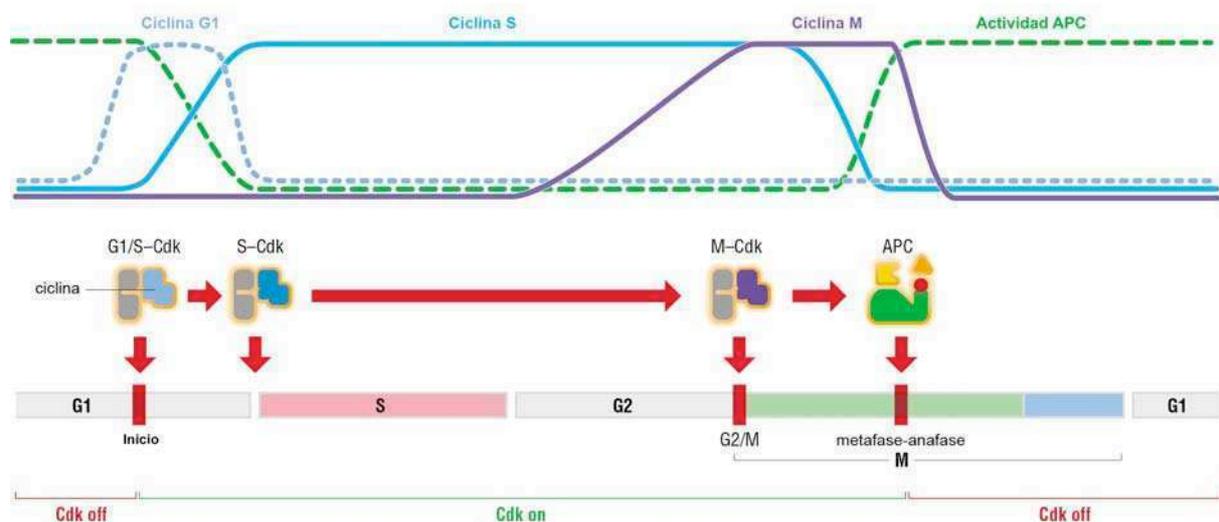


Figura i4 | **Esquema simplificado del control del ciclo celular eucariota.** Los niveles de las tres ciclinas principales oscilan durante el ciclo celular (arriba), siendo la base de las oscilaciones de los complejos CDKs (abajo). En general, los niveles de las CDKs son constantes y en exceso con relación a los niveles de ciclinas. Las actividades enzimáticas de los complejos ciclina/CDK tienden a aumentar y disminuir en paralelo con los niveles de ciclinas, aunque en algunos casos las proteínas inhibitorias de CDK (CKI) o la fosforilación introducen un retraso entre la formación y activación de los complejos ciclina/CDK (modificado de *The cell cycle-Principles of control*, David O. Morgan. New Science Press, 2007).

## ***Ciclo celular en Tripanosomátidos***

El control del ciclo celular en Tripanosomátidos desempeña un papel importante no sólo en la proliferación celular, sino también en la diferenciación que controla la transferencia del parásito entre distintos huéspedes. El ciclo de vida de estos protozoos incluye estadios con división celular y otros sin división celular. La división celular del Tripanosoma es similar al de otras células eucariotas, excepto que existen dos fases S que deben ser coordinadas: una para la masa de ADN mitocondrial contenido dentro del kinetoplasto y una para el ADN nuclear. A su vez, posee características y complejidades únicas. La mayoría de las organelas únicas (núcleo, mitocondria, Golgi y complejo cuerpo basal/flagelo) se duplican por un mecanismo de templado, donde una nueva organela se construye próxima a la vieja. Este proceso comienza con la fase S del ADN mitocondrial seguido por la maduración y duplicación del cuerpo basal [15]. Las organelas duplicadas se concentran en el extremo posterior de la célula, imponiendo limitaciones a la citoquinesis, que ocurre luego de la segregación cromosómica por una penetración de un surco de corte a lo largo del eje helicoidal de la célula, desde el extremo anterior hacia el posterior. En tripanosomas, el número de núcleos y kinetoplastos son marcadores del ciclo celular, es decir, correlacionan con la etapa en la que se encuentran. En efecto, la configuración un núcleo-un kinetoplasto (1N1K), representa células en G1/S, las células en estadios tempranos de G2 se identifican con una configuración 1N2K y las células G2/M o mitóticas presentan una configuración 2N2K (Figura i5).

Existe evidencia clara de que el ciclo celular de Tripanosomátidos está regulado por CDKs [1,16], aunque la modulación de la actividad de las CDK podría tener características específicas. *T. brucei* posee once quinasas relacionadas con cdc2 (CRK1-4 y CRK 6-12) [17] y 10 ciclinas (CYC2-11); con la excepción de CYC6/CycB2, no se ha demostrado equivalencia funcional a las ciclinas del tipo B o E de mamíferos. Poco se sabe sobre las asociaciones entre estas ciclinas y las CRKs, y hasta el momento, sólo se ha demostrado que la CRK3 de *T. brucei* es dependiente de las ciclinas CYC2 y CYC6 [18]. También se han encontrado homólogos de la quinasa Wee1 en el genoma de tripanosomátidos, y que las CRKs son capaces de asociarse con la proteína accesoria de CDK, CKS1 [16,19], pero no se han encontrado homólogos de

Cdc25 y los CKIs. La ausencia de estos reguladores podría estar explicado por la divergencia observada en la secuencia aminoacídica primaria de las CRKs [20].

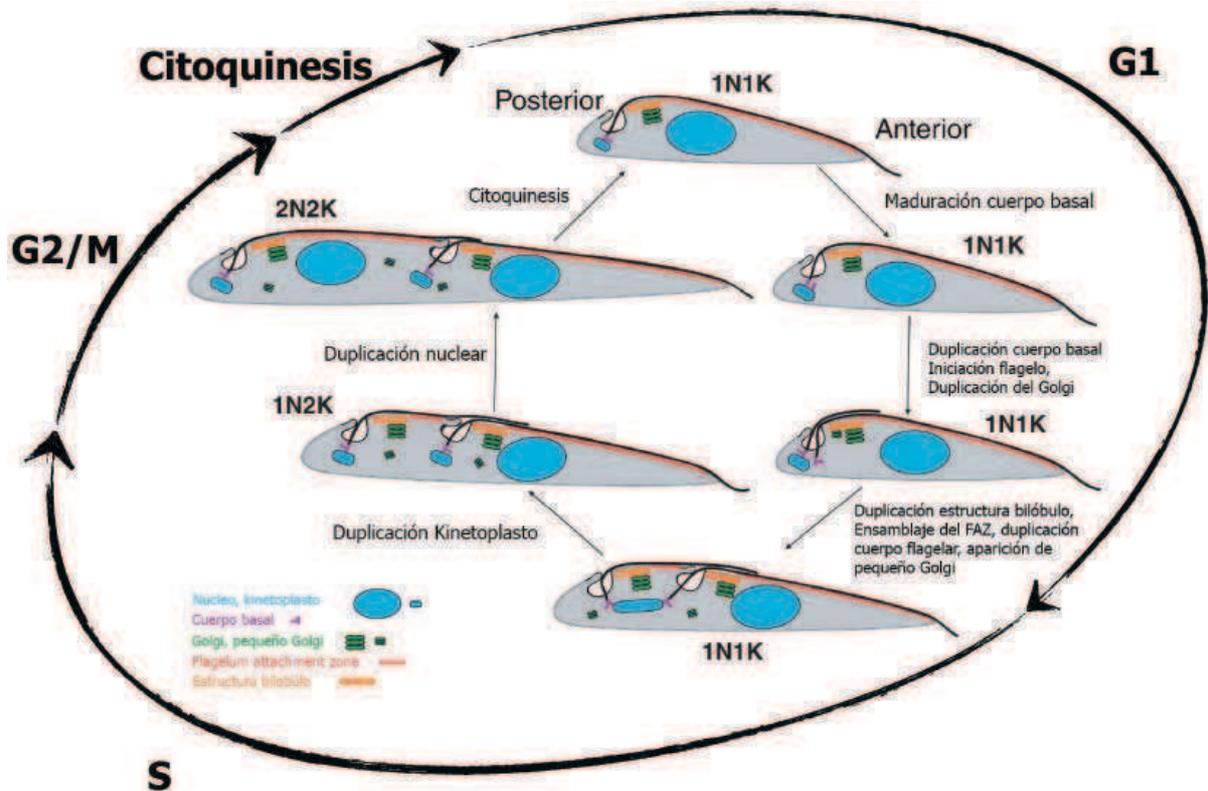


Figura i5 | Esquema del ciclo celular en *T. brucei*. Se ilustra la duplicación de las organelas y estructuras durante el ciclo celular para el estadio procíclico. Se muestran las fases del ciclo celular y los eventos que ocurren dentro de ellas (duración del ciclo: 8 horas). A su vez se indican las configuraciones de núcleo (N) y kinetoplasto (K) correspondientes a cada fase del ciclo celular. Adaptado de [87].

Mediante la técnica de ARN de interferencia en *T. brucei* se ha podido determinar las funciones de algunas de las CRKs y ciclinas identificadas. Se conoce que CYC2 y CYC4 son requeridas para el avance a través de la fase G1 [21], mientras que la ciclina CYC6 es requerida en mitosis [18]. CRK1 y CRK2 están involucradas en la transición de G1 a S, mientras que la CRK3 regularía la transición G2/M [22]. Confirmando estos resultados, en nuestro laboratorio se logró determinar que la actividad de la CRK3 de *T. cruzi* tiene un pico en la transición de G2/M en cultivos sincronizados [23].

**MODIFICACIÓN DE PROTEÍNAS POR UBIQUITINA Y PROTEÍNAS SIMILARES A UBIQUITINA**

La diversidad y la ampliación funcional del proteoma de un organismo se puede expandir por modificaciones covalentes post-traduccionales. Los ejemplos de estas modificaciones incluyen pequeñas moléculas como grupos fosfato, metilo o acetilo. A su vez, proteínas enteras pueden ser unidas covalentemente a proteínas sustrato. El ejemplo clásico de una proteína que modifica a otras es la ubiquitina, un polipéptido de 76 aminoácidos muy conservado en eucariotas, pero que está ausente en bacterias<sup>1</sup> y arqueas. La ubiquitina es unida covalentemente a un sustrato por medio de una unión isopeptídica entre su Gly C-terminal y un residuo Lys del sustrato aceptor.

Desde el descubrimiento de la ubiquitina a mediados de los años 70, se ha definido una familia entera de pequeñas proteínas relacionadas a la ubiquitina (llamadas proteínas similares a ubiquitina o **Ubls**, de sus siglas en inglés). En eucariotas superiores, existen aproximadamente 10 homólogos o Ubls, conocidos con los acrónimos SUMO, Nedd8, UCRP, FAT10, HAB, ISGN15, Apg8, Apg12, URM1 y An1. A pesar de no poseer una alta similitud de secuencia, las Ubls poseen esencialmente la misma estructura tridimensional, el plegamiento ubiquitina o  $\beta$ -*grasp*. Todas las Ubls se unen a sus sustratos a través de cascadas enzimáticas relacionadas. La ubiquitina y la mayoría de las Ubls son sintetizadas como precursores inactivos que son procesados en su extremo C-terminal para exponer la Gly carboxilato, que es el sitio de conjugación al sustrato. Proteasas específicas llamadas enzimas deubiquitinantes (DUBs) son responsables del procesamiento en el caso de la ubiquitina, mientras que proteasas específicas de Ubls (ULPs) procesan las otras Ubls.

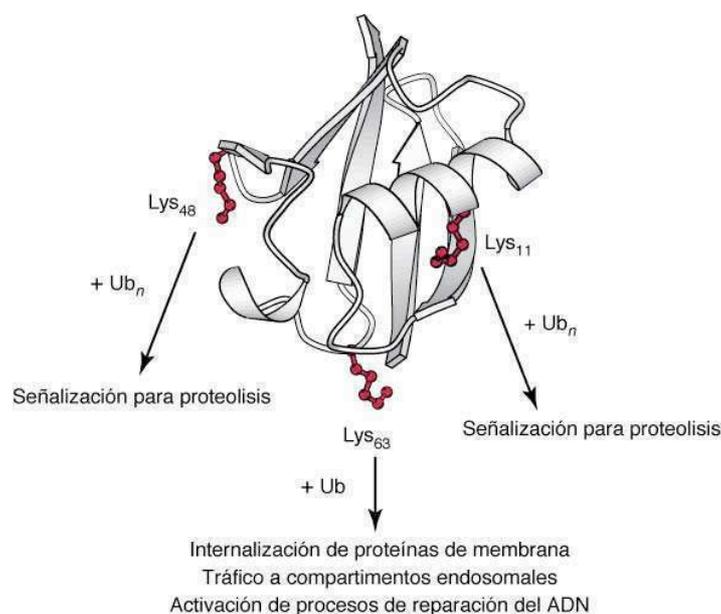
Para ser capaz de modificar una proteína, la Ubl primero debe ser activada. Una enzima activadora específica (llamada E1) utiliza ATP para adenilar la Ubl en su extremo C-terminal. Esta unión anhídrido de alta energía es atacada por un grupo sulfidri-  
lo de la Cys del sitio activo de la E1, generando una unión tioéster entre la E1 y la Ubl, liberando AMP. Desde la E1, la Ubl pasa a la cisteína del sitio activo de una enzima E2, conocida como *enzima conjugadora de Ubl*. Finalmente, la Ubl es unida a su sustrato con la ayuda de una proteína ligasa E3, lo cual resulta en una unión co-

---

<sup>1</sup> Recientemente se ha identificado una proteína, Pup1, que tendría una función similar a la ubiquitina en *Mycobacterium tuberculosis*

valente isopeptídica entre el extremo C-terminal de la Ubl y el grupo  $\epsilon$ -amino de una Lys en el sustrato [24]. La enzima E2 se encuentra en el centro de la cascada de transferencia de Ubl vinculando la activación de la Ubl por parte de la E1 con su eventual transferencia al sustrato catalizado por la E3 (ver más adelante)

Las proteínas pueden ser modificadas de tal manera que la ubiquitina o Ubls son conjugadas (unidas) individualmente a diferentes residuos sobre un sustrato, o cuando éstas son unidas entre sí para formar una cadena que es conjugada al sustrato en un solo residuo (o un pequeño número de ellos). El ejemplo más documentado de este tipo de cadenas poliméricas es para la ubiquitina. Las moléculas de ubiquitina en estas cadenas están unidas entre si de la misma manera que se unen a las proteínas sustrato. En particular, el extremo C-terminal de la ubiquitina más distal se une a la molécula de ubiquitina previa a través de una unión peptídica con el grupo  $\epsilon$ -amino de una Lys de la ubiquitina. La ubiquitina posee siete residuos Lys, los cuales pueden estar involucrados en la formación de la cadena, aunque la Lys<sub>48</sub>, Lys<sub>11</sub> y Lys<sub>63</sub> son los residuos mejor caracterizados involucrados en la poliubiquitinación [25]. Las cadenas unidas a través de Lys<sub>63</sub> presentan un tipo de unión topológica diferente y están ligados en procesos celulares como reparación del ADN y transducción de señales [26]. Funcionalmente, ambos tipos de unión de cadenas de poliubiquitina pueden distinguirse de la monoubiquitinación, el cual está asociado a procesos como la endocitosis y la regulación transcripcional [27]. Tanto *in*



*vitro* como *in vivo*, pueden existir polímeros de ubiquitina con uniones mixtas cuya función no está determinada [28]. Además de la ubiquitina, la única Ubl conocida capaz de formar cadenas son ciertos miembros de la familia SUMO. Se han detectado tanto *in vitro* como *in vivo* en levaduras como en células de mamíferos [29]; sin embargo, no se les ha asignado ninguna función. Es interesante notar que el sitio de ramificación para las cadenas de SUMO se encuentra en la extensión N-terminal no compartida con la ubiquitina

### ***Enzima Activadora de la ubiquitina (E1)***

En la mayoría de los organismos, incluyendo humanos y la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, dos E1 diferentes inician la conjugación de la ubiquitina. Por más de dos décadas, el dogma central en el área era que una sola enzima activadora de la ubiquitina, UBA1, cargaba E2s del sistema ubiquitina, como en eucariotas inferiores. Sin embargo, estudios recientes identificaron a UBA6 como la segunda E1 para la ubiquitina [30]. El mecanismo catalítico está mejor caracterizado para la E1 UBA1. Luego de la adenilación del extremo C-terminal de la Ubl, la ubiquitina adenilada es atacada por la cisteína catalítica de UBA1, produciendo una unión covalente tioéster entre el sulfidrilo de UBA1 y el extremo C-terminal de la ubiquitina. Posteriormente, UBA1 cataliza la adenilación de una segunda molécula de ubiquitina. Por lo tanto, UBA1 se carga asimétricamente con dos moléculas de ubiquitina en diferentes sitios activos: una molécula de ubiquitina está covalentemente unida a la Cys del sitio activo y la segunda ubiquitina esta asociada no-covalentemente al sitio activo de adenilación. Estas ubiquitinas se refieren como ubiquitina (T) y ubiquitina (A) (Figura i6). Finalmente, la UBA1 se asocia con una E2 afín y ocurre una reacción de transferencia tioéster, por lo cual el extremo C-terminal de la ubiquitina (T) es transferida a la Cys del sitio activo de la enzima E2. Los pasos de la reacción de E1 son reversibles. La progresión de la cascada es impulsada por la liberación de fosfato inorgánico y AMP en el primer y segundo paso, respectivamente (Fig. i6).

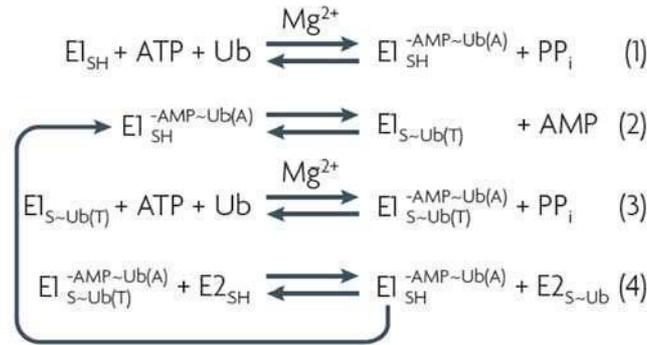


Figura i6 | **Mecanismo enzimático de la activación de la ubiquitina y el ciclo de conjugación.** Ub(A) representa la ubiquitina asociada no covalentemente al sitio activo de adenilación, y Ub(T) representa la ubiquitina que está covalentemente unida a la Cys catalítica de UBA1 a través de una unión tioéster. El paso (1) muestra la formación del adenilato, el paso (2) la formación del tioéster, el paso (3) muestra la doble carga de ubiquitina sobre E1 y el paso (4) la transferencia de ubiquitina a la E2. Se repite el paso 2 sobre la E1 Ub(A)~adenilato formado en el paso 4 para continuar el ciclo.

### **Enzima conjugadora de ubiquitina (E2)**

Los miembros de la familia de enzimas conjugadoras de la ubiquitina (E2) se caracterizan por poseer un dominio catalítico (UBC) de 150-200 aminoácidos, conservados en un 35% dentro de la familia. Estos dominios de 14-16 kDa sirven como plataforma de unión para la E1, las E3s y las Ubls. Dentro de este dominio se encuentra la Cys catalítica que une las Ubls activadas a través de una unión tioéster, previo a la interacción con las E3 ligasas y la subsiguiente conjugación al sustrato.

Las E2 son clasificadas según la existencia de extensiones adicionales al núcleo catalítico; algunas E2s consisten solamente del dominio catalítico (Clase I), otras tienen extensiones adicionales N- o C-terminales (Clase II y III, respectivamente) o ambas (Clase IV). Éstas están involucradas en diferencias funcionales entre las E2s, como la localización subcelular, la estabilización de la interacción con enzimas E1, o la modulación de la actividad de la E3 [31]. Por ejemplo, CDC34 (*cell division cycle 34*) es una enzima E2 de clase III involucrada en la transición de la fase G1-S del ciclo celular eucariota.

La primera tarea importante de la E2 de ubiquitina es recibir ubiquitina y no otra Ubl en su sitio activo. La ubiquitina y las Ubls pueden competir por la misma Lys en el sustrato y disparar diferentes reacciones. Por ejemplo, el antígeno nuclear de células en proliferación (PCNA) monoubiquitinado promueve la reparación del ADN lue-

go del daño, mientras que la modificación del mismo residuo Lys con la Ubl SUMO bloquea la recombinación entre cromátidas hermanas. Aunque las E1s y E2s de las Ubls poseen estructuras similares a aquellas enzimas correspondientes a ubiquitina, las E2s para ubiquitina interactúan específicamente sólo con las dos E1 de la vía de ubiquitina. Las E2s se unen a su E1 afín con alta afinidad sólo si estas acarrean el modificador. Por análisis de estructura se observó que la carga de una E1 con ubiquitina dispara cambios conformacionales en ella, exponiendo así sitios críticos de unión a la E2 y permitiendo la formación del complejo E1-E2 [32]. Durante estos arreglos, un surco cargado negativamente dentro del dominio UFD de la E1 se expone y es reconocida por dos residuos Lys presentes en la hélice  $\alpha 1$  de todas la E2s para ubiquitina, pero que se encuentra ausente en las E2s para SUMO y NEDD8. Las secuencias flanqueantes al dominio UBC de las E2s también contribuyen a la especificidad de la unión de E1. El extremo N-terminal de la E2 para NEDD8, UBE2M, por ejemplo, estabiliza la interacción entre UBE2M y su E1, y al mismo tiempo reduce su afinidad por la E1 para ubiquitina [33].

Luego de ser cargada con ubiquitina, las E2s se acoplan con las E3s para catalizar la ubiquitinación del sustrato (Fig. i7). Una sola E2 es capaz de interactuar con diferentes E3s (como se observa para los miembros de la familia de E2s UBE2D). Los pares de E2-E3 caracterizadas hasta el momento incluyen el complejo SCF (Skp-Cullin1-Fbox ) y la E2 Cdc34 [34]; el complejo de APC/C (*Anaphase promoting complex/Ciclosome*) y las E2s UBE2C y UBE2S [35,36]; la E3 residente del retículo endoplasmático gp78 y la E2 UBE2G2; la proteína sensible a radiación E3 (RAD18) y la UBE2A, que actúa en reparación de ADN [33]. Todas las E2s caracterizadas hasta el momento reconocen a las E3s a través de los *loops* L1 y L2 y la  $\alpha$ -hélice 1 de la superficie de la E2 (Figura i8). Las pequeñas variaciones en estos motivos contribuyen a la especificidad de unión a las E3. Al igual que la asociación con las E1, existen componentes adicionales únicos en las E2s que pueden aumentar aún más la especificidad por la unión a las E3. La E2 Cdc34 utiliza su extremo C-terminal cargado negativamente para unirse a su E3, el complejo SCF.

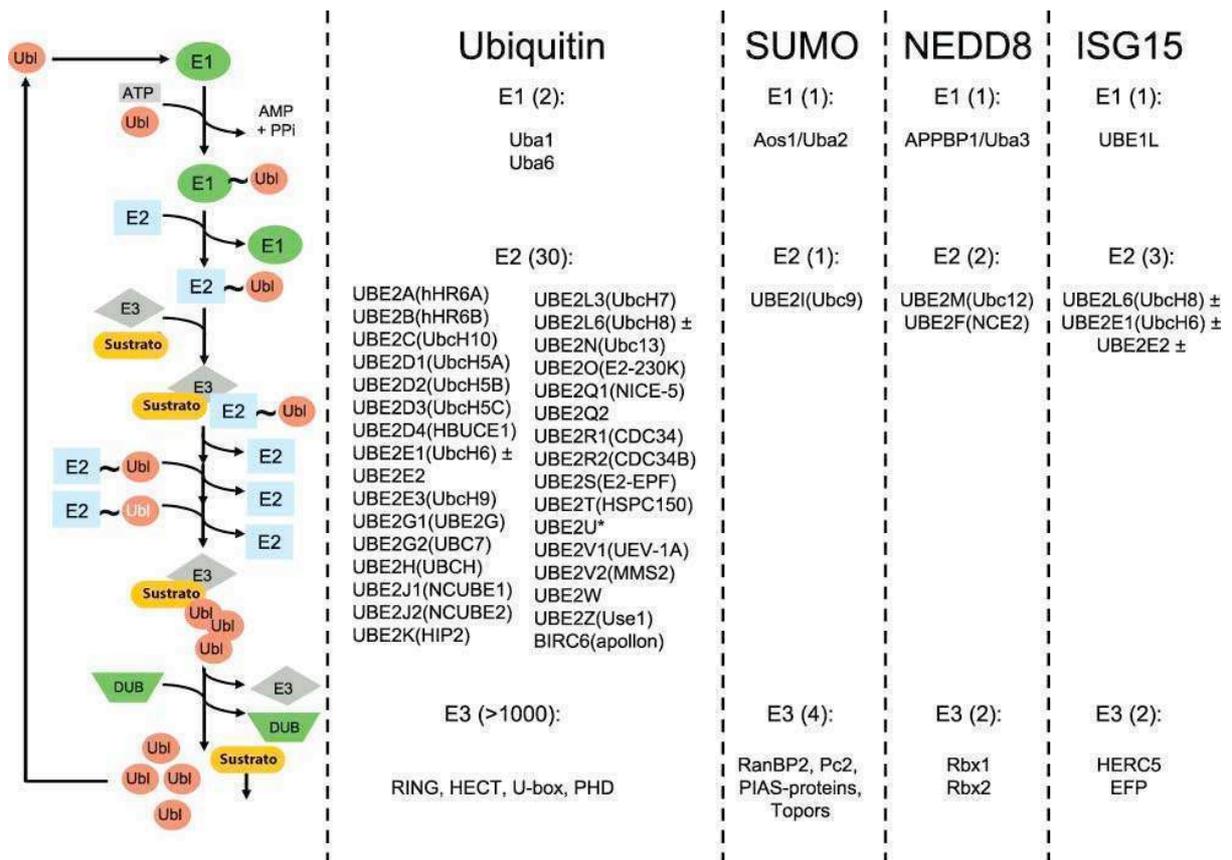


Figura i7 | Esquema de las principales vías de conjugación de Ubiquitina/Ubls en eucariotas superiores. Además de Ubiquitina, las Ubls SUMO, NEDD8, y ISG15 son activadas por su E1 específica. La mayoría de la Ubiquitina/Ubls usan E2 específicas, pero en algunos casos comparten E2s, como ocurre con la ubiquitina y la ISG15, indicado con el símbolo (±). A las E2s indicadas con un asterisco no se les ha asignado una determinada actividad aún. Tanto UBE2L6 y UBE2E2 tienen como nombre alternativo UbcH8. Finalmente, grupos de E3s determinadas median la conjugación covalente de Ubls a los sustratos apropiados. No se muestran las cascadas conjugadoras para Atg8 y Atg12, FUBI, FAT10 y Urm1. Tomado de [31].

Cada vez es más evidente que las E2s pueden determinar la especificidad y la longitud de las cadenas de ubiquitina y pueden influir en la procesividad de la formación de la cadena. El ensamblado de cadenas de ubiquitina es iniciado por la transferencia de la primera ubiquitina a una Lys del sustrato. Posteriormente, el par E2-E3 extiende la cadena, agregando moléculas adicionales de ubiquitina a la ubiquitina ya unida al sustrato. La decisión de si un residuo Lys en el sustrato o en la ubiquitina recibirá la próxima ubiquitina es tomada por la E2; recientemente se han reportado E2s dedicadas a iniciación o elongación. Un ejemplo de la división de trabajo de las E2s entre la iniciación y la elongación de las cadenas ocurre con el complejo de le-

vaduras APC/C, donde la E2 Ubc4 modifica los residuos Lys en los sustratos, mientras que Ubc1 extiende las cadenas de ubiquitina unidas por Lys48 [37] (Fig. i9A).

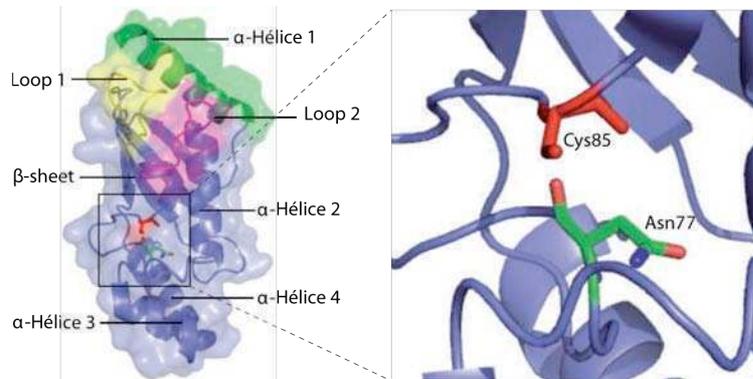


Figura i8 | **Estructura del dominio UBC de la E2 UBE2D2.** El núcleo UBC está compuesto por 4  $\alpha$ -hélices y un hoja  $\beta$  anti-paralela. La  $\alpha$ -hélice 1 que interactúa con la E1 se muestra en verde, y los dos *loops* que interactúan con la E3 se muestran en amarillo y violeta. El acercamiento muestra las posiciones relativas de los residuos Cys85 y Asn77 del sitio activo (modificado de [10])

Algunas E2s involucradas en la iniciación de la cadena de ubiquitina carecen de especificidad por un residuo Lys en el sustrato, lo cual les permite iniciar la formación de la cadena sobre un diverso número de sustratos. Las E2s involucradas en la elongación de la cadena de ubiquitina dependen generalmente de la unión de la primera ubiquitina al residuo Lys en el sustrato. Tanto la E2 Ubc13 (específica para adicionar en la Lys63) como la UBE2S (específica de Lys11) no son capaces de iniciar la cadena de ubiquitina. En consecuencia, la formación de las cadenas unidas del tipo Lys63 sobre PCNA de levaduras durante la reparación de DNA post-replicativa es iniciada por la E2 RAD6, antes que Ubc13 pueda extenderlas. Finalmente, algunas E2s catalizan tanto la iniciación como la elongación de cadenas. La E2 de levaduras Cdc34, por ejemplo, coopera con la E3 SCF para unir cadenas de ubiquitina al regulador del ciclo celular Sic1, iniciando de forma inespecífica la unión de la primera ubiquitina a las Lys del sustrato, y luego elongando estas cadenas añadiendo moléculas de ubiquitina a la Lys48 de la primera ubiquitina unida (Fig. i9B).

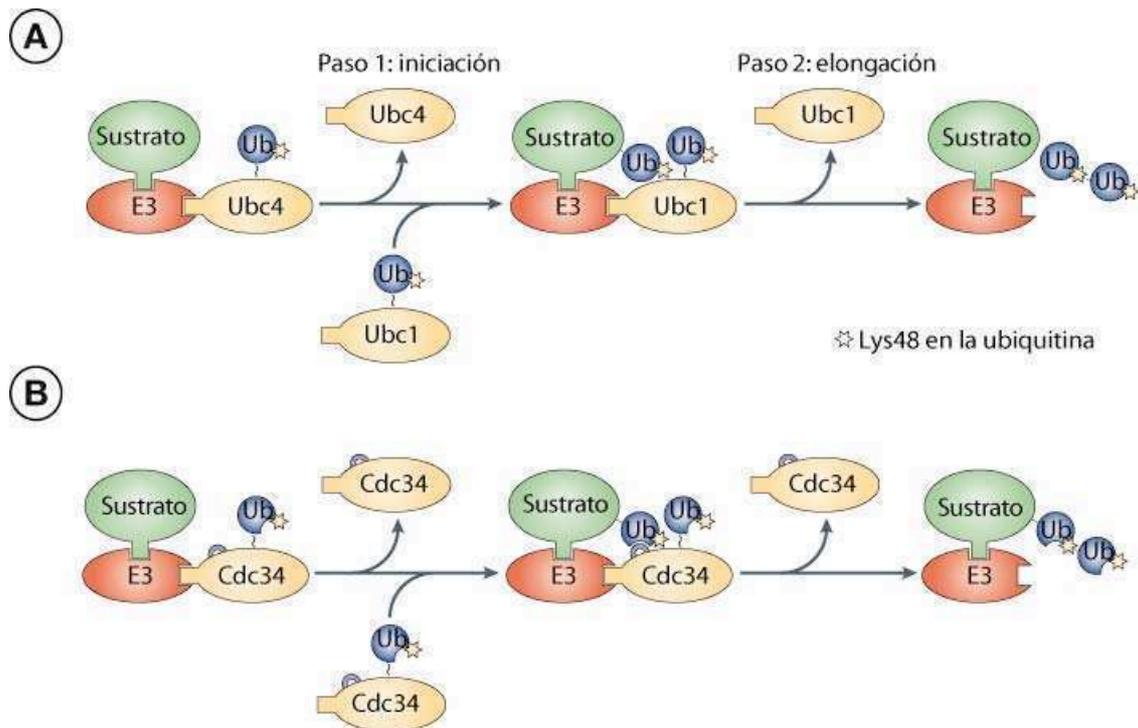


Figura i9 | **Mecanismo de iniciación y elongación de la cadena de ubiquitina.** A) El complejo APC/C de levaduras utiliza la enzima conjugadora de ubiquitina Ubc4 para iniciar la ubiquitinación, y una E2 diferente, Ubc1, para elongar la cadena de ubiquitinas unidas a través de Lys48. B) La E2 de levaduras Cdc34 puede iniciar y elongar las cadenas de ubiquitina. La elongación requiere del *loop* ácido de Cdc34, que podría orientar el grupo Lys que es atacado de forma relativa al sitio activo de la E2. Modificado de [33].

### **Las Ubiquitin Ligasas (E3)**

Los componentes de las E3 son responsables del reconocimiento específico de un gran número de proteínas sustrato en el sistema ubiquitina-proteasoma. Esto requiere tanto de especificidad como de versatilidad, que es provisto por la existencia de entre 500-1000 E3 ligasas diferentes. Estas se clasifican actualmente en cuatro clases de acuerdo con la presencia de dominios: tipo HECT (*Homologous to E6AP C-terminus*), tipo RING finger (*Really Interesting New Gene*), tipo U-box y tipo PHD *finger*. Las E3s con dominio HECT forman intermediarios tioéster con la ubiquitina y luego lo transfieren al sustrato, mientras que las RING E3s median la transferencia directa de la ubiquitina desde la E2 al sustrato (Fig. i11). Se cree que el tipo de E3 RING *finger* forma la familia más grande y se encuentra subdividida en subfamilias; una de éstas, la subfamilia basada en Cullin, es la mayoritaria. Existen 7 tipos de E3s basadas en Cullin, incluyendo el complejo SKP1-CUL1-F-box (SCF) y el complejo promotor de la anafase/ciclosoma (APC/C) [38,39], ambos involucrados en la

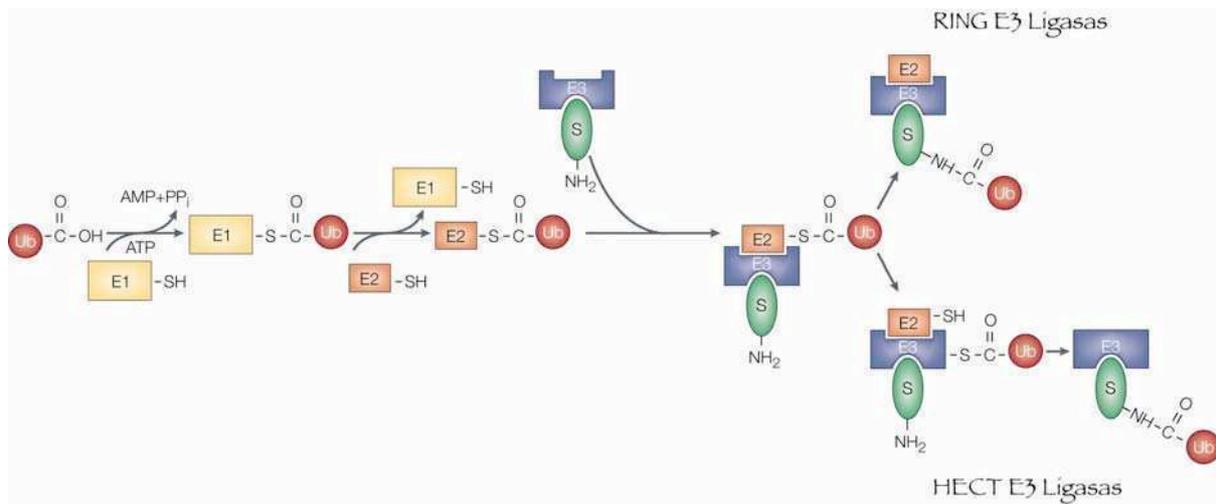


Figura i10 | **La vía de ubiquitinación: HECT y RING E3s.** La ubiquitina libre es activada de forma dependiente de ATP con la formación de una unión tior-éster entre la E1 y el extremo carboxilo de la ubiquitina. La ubiquitina es transferida a una de las diferentes E2. Las E2 se asocian con E3s, que puede o no tener un sustrato ya unido. En el caso de las E3 con dominio HECT, la ubiquitina es transferida a la cisteína del sitio activo del dominio HECT y luego transferida al sustrato (S) (como se muestra), o a una cadena de poli-ubiquitina. En el caso de las RING E3s, la evidencia actual indica que la ubiquitina es transferida directamente de la E2 al sustrato. Tomado de [39].

proteólisis de componentes centrales de la maquinaria del ciclo celular. El complejo SCF está compuesto por tres componentes invariables: **RBX1** (*RING-finger protein*), **CUL1** (proteína de andamiaje), y **SKP1** (proteína adaptadora), así como un componente variable conocido como la proteína **F-box**, que se une a SKP1 a través del dominio F-box, y al sustrato a través de un dominio WD-40 o LRR1 (repeticiones ricas en leucina) (Fig. i11). Se han identificado aproximadamente 70 proteínas F-box en humanos que se ubican dentro de tres categorías: aquellas con repeticiones WD-40 (FBXW), con repeticiones ricas en leucinas (FBXL) u otros dominios (FBXO) [40]. La subunidad F-box determina la especificidad del sustrato por parte del SCF. En *Saccharomyces cerevisiae*, por ejemplo, la unión de la F-box Cdc4 al SCF promueve la ubiquitinación del inhibidor de CDK Sic1, disparando así la activación de la CDK e iniciando la fase S.

El APC/C es estructuralmente similar al complejo SCF, y está compuesto por los componentes invariables APC11 (proteína RING-finger relacionada a RBX1), APC2 (proteína relacionada a CUL1), por lo menos otros once componentes sin una función definida y un componente variable conocido como activador. Hay dos tipos de activadores: *cell division cycle 20* (CDC20) y CDH1. Estos confieren especificidad de sustrato de la misma forma que las F-box lo hacen en el complejo SCF. A pesar de

las semejanzas estructurales y bioquímicas entre el SCF y el APC/C, sus funciones celulares son diferentes. Esto se refleja en el momento de actividad de cada complejo E3: el APC/C se encuentra activo desde mitad de la mitosis (anafase) hasta el final de la fase G1, mientras que el complejo SCF, es activo desde G1 tardío hasta el comienzo de Mitosis. Sus funciones se delimitan a través de un *loop* regulatorio, donde el complejo SCF y el APC/C interaccionan y se regulan mutuamente [41,42].

La F-box es central en la regulación de la ubiquitinación durante el ciclo celular. La tasa de ubiquitinación del SCF no se controla por cambios en la actividad del complejo enzimático, que se mantiene constante a lo largo del ciclo celular. En cambio, la tasa de ubiquitinación se regula por cambios en la afinidad del sustrato por su correspondiente proteína F-box. En general, los sustratos del complejo SCF se unen a su proteína F-box y son ubiquitinados sólo si esos sustratos han sido fosforilados en un sitio específico o un grupo de sitios. La fosforilación es efectuada por las CDKs, vinculando la ubiquitinación y la proteólisis en momentos específicos del ciclo celular. A diferencia del SCF, el complejo APC/C es regulado durante el ciclo celular, y los sustratos del APC/C normalmente no son modificados. El APC/C es activado durante mitosis por fosforilación de las subunidades, y se inactiva durante G1 tardío por la degradación de su E2 específica UbcH10, por degradación e inhibición fosforilativa de los componentes variables CDC20/CDH1, y la expresión de su inhibidor Emi1 [43].

### ***La función de la proteólisis dependiente de ubiquitina en el ciclo celular***

La proteólisis dependiente de ubiquitina genera un mecanismo de irreversibilidad que es esencial para las transiciones de las fases del ciclo celular. Las fosforilaciones activantes o inactivantes de los complejos CDK/ciclina no aseguran la unidireccionalidad del ciclo. Sin embargo, la degradación de una ciclina o CKI obliga al sistema a proceder a la siguiente fase y evitar que un proceso se repita. Por ejemplo, en la fase S, cuando la actividad de CDK es baja, las células activan sus orígenes de replicación. Sin embargo, inician la replicación del ADN sólo luego de activar las CDKs en la transición de G1 a S. La activación irreversible de las quinasas se produce en parte por la degradación del inhibidor de CDKs p27. Si la degradación de

p27 es alterada, las células pueden volver de la fase S a la G1 y reactivar los orígenes de replicación que ya han sido utilizados. Esto permite a las células amplificar genes o cromosomas, un evento observado a menudo en tumores [44].

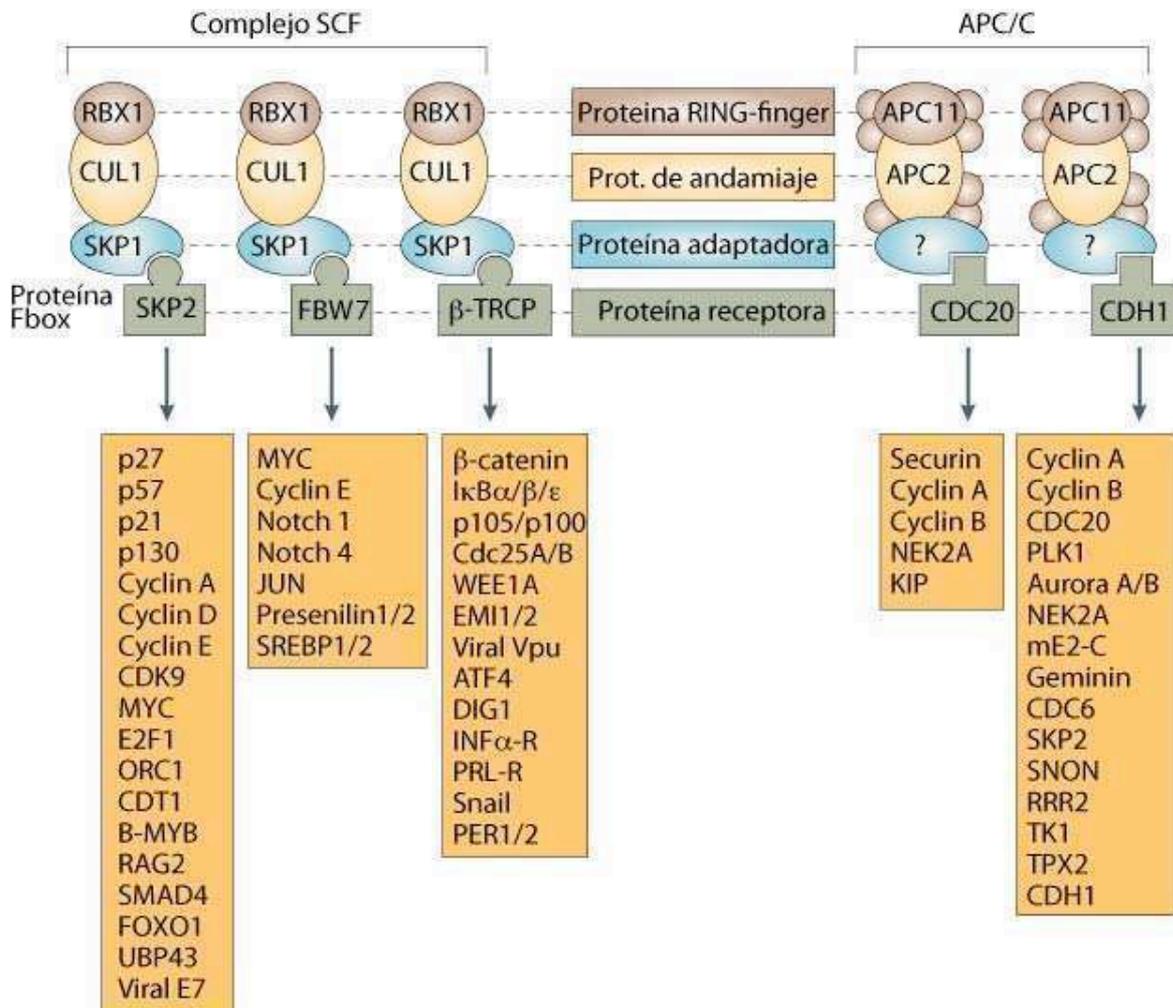


Figura i11 | **Similitud de estructura del SCF y APC/C.** Tanto el complejo SKP1–CUL1–F-box protein (SCF) y el complejo Promotor de la anafase/ciclosoma(APC/C) están compuestos por subunidades fijas y subunidades variables que reconocen los sustratos. El SCF se conforma de los componentes invariables RBX1 (RING-finger protein), CUL1 (proteína de andamiaje) y SKP1 (proteína adaptadora), así como del componente variable proteínas F-box, que es responsable del reconocimiento del sustrato. Dentro de las más de 70 proteínas F-box de humanos, tres proteínas - *S-phase kinase-associated protein 2* (SKP2), la proteína con dominios F-box y WD-40 7 (FBW7) y la proteína  $\beta$ -transducina *repeat-containing protein* ( $\beta$ -TRCP) - son los principales protagonistas en el control del ciclo celular. El APC/C está formado por los componentes invariables APC1 (*RBX1-related RING-finger protein*), APC2 (proteína relacionada a CUL1) y al menos otros 11 componentes cuyas funciones no son conocidas. A su vez, las subunidades activadoras variables, *cell division cycle 20* (CDC20) o CDH1, confieren especificidad de sustrato de la misma manera que las proteínas F-box lo hacen en el complejo SCF y el APC/C [121,122,123].

Consistente con la importancia de p27 en el control del ciclo celular, su degradación se encuentra muy regulada. Cuando la célula se compromete a otra ronda de división, se activan ciertas quinasas que fosforilan a p27 y producen su desplazamiento de la unión a CDK2. Esto permite que la CDK2 fosforile a p27 y pueda ser reconocida por la proteína F-box Skp2. Así, el complejo SCF ubiquitina p27 y lo marca para su degradación por el proteasoma 26S, resultando en una ráfaga de actividad de CDK2, activación de factores de transcripción y síntesis de ciclinas. La consiguiente activación de CDK2 compromete a la célula a entrar a la fase S. Dado que no hay más p27, la célula no puede volver a G1 y la entrada a S es irreversible.

De manera similar, la salida de mitosis depende de la degradación de ciclinas. Las ciclinas del tipo A y B activan la quinasa CDK1, cuya actividad es requerida para establecer y mantener el estado mitótico. La ubiquitinación de las ciclinas A y B por el complejo APC/C y su degradación por el proteasoma 26S apagan la actividad de CDK1 y promueven la salida de mitosis. La importancia de este evento proteolítico es ilustrado por células que fallan en la degradación de ciclinas: estas se arrestan en mitosis.

### ***Ubiquitinación en Tripanosomátidos***

Los primeros trabajos sobre la ubiquitina en Tripanosomátidos se publicaron en el año 1988 describiendo los genes tanto de *T. cruzi* como de *T. brucei* [45,46]. En ellos se describió la organización genómica de los genes de ubiquitina, y se demostró diferencias en el número y tamaños de los genes y transcritos de ubiquitina; por ejemplo, en *T. cruzi* se encontraron más de 10 genes, mientras que una cepa de *Leishmania donovani* poseía solo uno. La proteína de *T. cruzi* posee un 84% de identidad con el producto del gen UBI de *Saccharomyces cerevisiae*, y más importante aún, su extremo C-terminal posee la secuencia aminoacídica LRGG, donde la penúltima Glicina es esencial para la unión isopeptídica con la lisina del sustrato [47]. El primer trabajo sobre la actividad ubiquitin ligasa fue realizado en *T. brucei* [48], donde por medio de ubiquitina marcada con <sup>125</sup>Iodo, se demostró actividad citosólica de un sistema ubiquitin ligasa en el estadio sanguíneo de *T. brucei brucei*, no así en núcleos aislados. A su vez, se estudió la actividad del proteasoma 26S en Tri-

panosomátidos [49,50,51] y cómo la degradación de proteínas por el mismo está involucrado en la diferenciación de los diferentes estadios de los parásitos [50,51,52].

Recientemente, se ha estudiado la funcionalidad de las dos enzimas E1 para ubiquitina presentes en *T. brucei* [53], demostrándose que son necesarias para la supervivencia de los parásitos, y su ausencia produce una disminución en la cantidad total de proteínas ubiquitinadas. A su vez, se cristalizó parte de la proteína Ubl SUMO de *T. brucei*, observándose que la estructura tridimensional está muy conservada con la de SUMO-1 de humanos y Smt3 de levaduras [54].

En *T. brucei*, se estudió la función de algunos de los homólogos del complejo APC/C. Se pudo determinar que los componentes APC1 y CDC27 al ser depletados de la célula, producen un arresto en el crecimiento de los parásitos con un aumento de células en la fase G2/M, sugiriendo una función del APC/C en mitosis, al igual que en otras células eucariotas [55].

## ***OBJETIVOS***

• **OBJETIVO GENERAL**

Estudiar la regulación que ejerce la vía de ubiquitinación en el ciclo celular de Tripanosomátidos

• **OBJETIVOS PARTICULARES**

1. Analizar la presencia de los componentes centrales del complejo SCF en Tripanosomátidos.
2. Estudiar la función que ejerce cada uno de los componentes del complejo SCF en la proliferación y en el ciclo celular de *T. brucei*, a través de las técnicas de ARN de interferencia, inmunolocalización y sobreexpresión.
3. Analizar la actividad de la enzima E2 TbCdc34
4. Identificar sustratos del complejo enzimático, utilizando la técnica de Electroforesis bidimensional diferencial en gel (2D-DIGE)

# ***RESULTADOS***

## **Introducción**

Nuestro laboratorio ha estudiado las bases moleculares del ciclo celular de *T. cruzi* desde hace ya casi una década. Los trabajos previos a esta tesis describieron diferentes CRKs y ciclinas en este parásito, que guardan gran homología con miembros de esas familias de proteínas de distintos organismos. También fue descrita la proteína CKS1, cuyo homólogo en levaduras está implicado en la regulación de las CDKs. Esta proteína es capaz de complementar la mutante p13suc1 (el homólogo de CKS1) de *S. pombe* y de interactuar de forma estable con TcCRK1 y TcCRK3, dos homólogos de CDKs [19].

Se sabe que la proteína de humanos hCKS1 es capaz de interactuar con la proteína F-box SKP2 del complejo SCF, favoreciendo la ubiquitinación del inhibidor de CDKs p27. En ese entonces, varios reportes vinculaban la CKS con la maquinaria de ubiquitinación. Dada la regulación que ejerce el sistema de ubiquitinación sobre las ciclinas y los CKI y en consecuencia, sobre el ciclo celular, nos interesó comenzar el estudio de los complejos de ubiquitinación en Tripanosomátidos, más específicamente el complejo SCF, con el cual CKS1 es capaz de interactuar.

**ANÁLISIS IN SILICO DEL COMPLEJO SCF EN TRIPANOSOMÁTIDOS**

El primer paso en nuestro trabajo fue realizar una búsqueda bioinformática de los componentes del complejo SCF en los genomas secuenciados de Tripanosomátidos. Para ello se utilizaron las secuencias aminoacídicas de las proteínas de humanos y levaduras SKP1, Cullin1, Cdc34 y Rbx1. Se utilizaron como base de datos los genomas de *T. brucei*, *T. cruzi* y *L. major* (GeneDB.org). Fue posible identificar homólogos de las cuatro proteínas que forman parte del *core* del complejo SCF, con una alta conservación de dominios estudiados en otros organismos. En la Tabla I se muestran los homólogos identificados para cada uno de los parásitos, los dominios presentes en cada una de estas proteínas y los números de acceso en la base de datos de sus genomas.

SCF COMPLEX							
Protein	PFAM Domains	<i>T.brucei</i>	GeneDB	<i>T.cruzi</i>	GeneDB	<i>L. major</i>	GeneDB
SKP1	PF03931 PF01466	TbSKP1	Tb11.02.3990	TcSKP1	Tc00.1047053508041.11	LmSKP1	LmjF11.1210
CDC53/CULLIN1	PF00888	TbCDC53	Tb927.8.5970	TcCDC53	Tc00.1047053511075.40	LmCDC53	LmjF24.2290
RBX1	PF00097	TbRBX1	Tb10.70.6035	TcRBX1	Tc00.1047053503965	LmRBX1	LmjF.0023
CDC34	PF00179	TbCDC34	Tb11.01.5790	TcCDC34	Tc00.1047053511727	LmCDC34	LmjF32.0960

TABLA 1. Ortólogos del complejo SCF identificados en los genomas de *Trypanosoma brucei*, *Trypanosoma cruzi* y *Leishmania major* a partir de las proteínas de levaduras y humanos. Los números de acceso corresponden a la base de datos de GeneDB (<http://www.genedb.org>) y a los dominios Pfam (<http://pfam.sanger.ac.uk>)

La secuencia deducida de aminoácidos de TbSkp1 posee un 33% de identidad con el homólogo de humanos (HsSkp1 Número de acceso: P63208). Está compuesta por 182 aminoácidos y posee un peso molecular deducido de 21.13 kDa. La mayor conservación de aminoácidos se encuentra en el extremo C-terminal, involucrado en el reconocimiento del dominio F-box de las proteínas que llevan el mismo nombre (Figura R1).

```

TbSkp1      MAEEVS-VQDVDFTEYCILESNDPTPVKFKVRREAAMMSGLLKDMLEDQ----- 48
TcSkp1      MPEEFD-SQEVDFTKYCVLQSNQPPVEFKVLRREAAMMSGLLKDMLEDDQ----- 48
LmSkp1      MPVEIANSDDVDFSQYCVLQSNHPPVEFKVSRESAKMSGLLRDMLEDQ----- 49
HsSKP1      -----MPSIKLQSSDGE--IFEVDVEIAKQSVTIKTMLEDL----- 34
ScSkp1      -----MVTSNVVLVSGEGE--RFTVDKKIAERSLLLKNYLNDMHDSNLQNNSDS 47
PfSkp1      -----MKNDKIKLVSFEGD--EFIVDKNTASMSTVIMNILEVM----- 36
              * * : * * : * * : * :

TbSkp1      -----NGGDP--IIPIPNVSARTLKLVIKYMHEHHKERADPIEK 85
TcSkp1      -----GDMEP--IIPIPNVSGRTLRLVVEYMEHHYQNRAEPIEK 85
LmSkp1      -----EGNEA--IIPIPNVSGQTLRLVLEYMHEYHCGNPAQPIEK 86
HsSKP1      -----GMDDEGDDD--PVPLPNVNAAILKKVIQWCTHHKDDPPPPEDD 75
ScSkp1      ESDSDSETNHKSKDNNNGDDDEDDDEIVMPVNVRSVQLQKVIWEAEHHRDSNFPDEDD 107
PfSkp1      -----TAEDD--TIPLPNIKTPIPKKIIIEYMEYHINNPADEIPK 73
              : * : * : * : * : * :

TbSkp1      PLK-SNIEKIIISPWDHDFLYTELVDKHDEKQ-HEVLIDVIMAANFLNVRDLLDLTCACVA 143
TcSkp1      PLK-SKIDTIIISPWDRDFLYTHLVKDHDEKQ-HEVLIDVIMAANFLNVKDLLDLTCACVA 143
LmSkp1      PLK-TTIESLVCEWDSNFLFNQLLKNHDEKQ-HEVLIDVIMAANFLNVRDLLDLTCACVA 144
HsSKP1      ENK-EKRTDDIPVWDQEFKVDQGTLFE-----LILAANYLDIKGLLDVTCKTVA 124
ScSkp1      DD--SRKSAPVDSWDREFLKVQDEMLYE-----IILAANYLNKPLLDAGCKVVA 155
PfSkp1      PLITSNLQDVVSSWDFDFVNTDKETLYELIEVKYQMNIMASNYLDIKPLLDLTCGKIA 133
              : * * : * : . : : * : * : * : * : * : * : * : * : * :

TbSkp1      NMIRGKSAEQIRELFNIESDFTPEEEKIREENRWCEEA 182
TcSkp1      SMIRGKTAEQIRALFNIESDFTPEEEKIREENRWCEEV 182
LmSkp1      SMIRGKTAEQIRELFNIENDFTPEEEKIREENRWCEES 183
HsSKP1      NMIKGKTPEEIRKTFNIKNDFTPEEEEAQVRKENQWCEEK 163
ScSkp1      EMIRGRSPEEIRRTFNIVNDFTPPEEAAIRRENEWAEDR 194
PfSkp1      SMMKDKTTEEIRAEFDIVNDFTRREEKQIREENRWCGDI 172
              . * : : : : * : * * : * * * * * : * : * : * : * :

```

Figura R1 | **Alineamiento múltiple de secuencias aminoacídicas de TbSkp1 con otras proteínas Skp1 de eucariotas.** Las secuencias aminoacídicas de las proteínas Skp1 de *Trypanosoma brucei* (TbSkp1: Tb11.02.3990), *Trypanosoma cruzi* (TcSkp1: Tc00.1047053508041.11), *Leishmania major* (LmSkp1: LmjF11.1210), Humanos (HsSkp1: P63208), *Saccharomyces cerevisiae* (ScSkp1: P52286), *Plasmodium falciparum* (PfSkp1: Q8ID38) fueron alineadas utilizando el programa ClustalW. Los asteriscos marcan los residuos conservados. El cuadro en verde indica los residuos involucrados en la interacción con el dominio F-box de las proteínas del mismo nombre [119].

El segundo componente del complejo SCF, TbRbx1, posee el mayor porcentaje de identidad aminoacídica de las 4 proteínas del complejo (63% con su contraparte de humanos)(HsRbx1 - Número de acceso: P62877). El dominio RING está totalmente conservado en las secuencias aminoacídicas deducidas de Tripanosomátidos (Fig. R2). Este dominio está definido por una serie de ocho residuos histidina y cisteína que unen iones de zinc. La identidad de secuencia dentro del dominio RING-H2 de TbRbx1 con la proteína de humanos es de 72%.

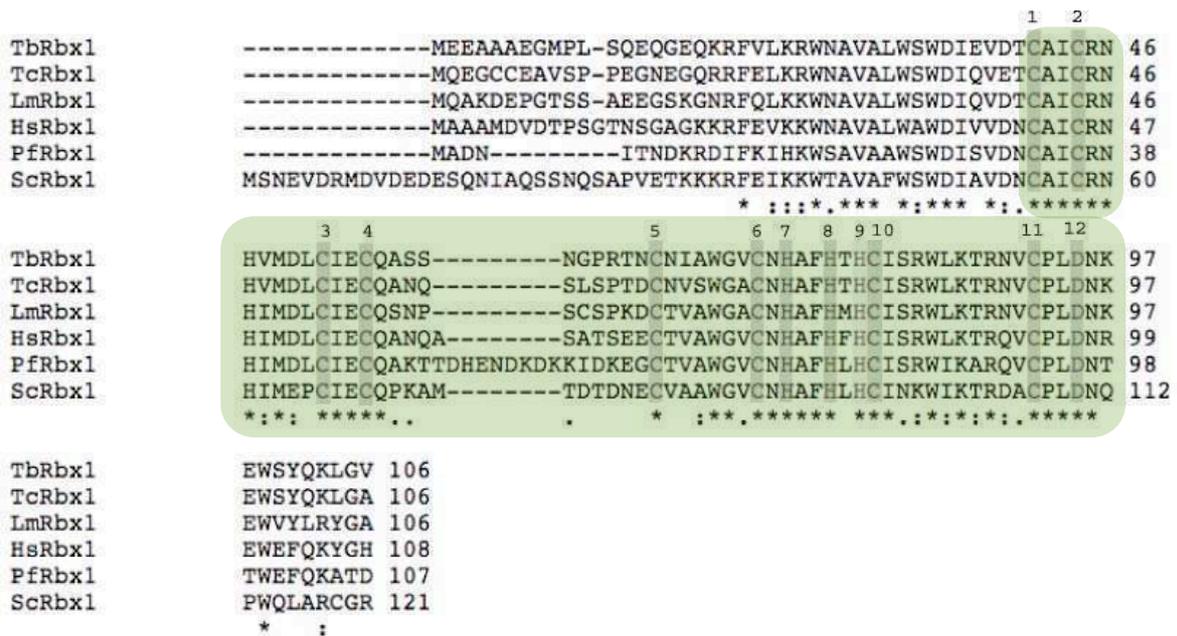


Figura R2 | **Alineamiento múltiple de las secuencia deducida de *T. brucei* Rbx1 con otras Rbx1 de eucariotas.** Se alinearon las secuencias aminoacídicas de *Trypanosoma brucei* (TbRbx1: Tb10.70.6035), *Trypanosoma cruzi* (TcRbx1: Tc00.1047053506495.9), *Leishmania major* (LmRbx1: LmjF21.0023), *humanos* (HsRbx1: P62877), *Saccharomyces cerevisiae* (ScRbx1: NP\_014508) y *Plasmodium falciparum* (PfRbx1: PFC0845c). El alineamiento fue realizado mediante el programa ClustalW. Los asteriscos indican residuos conservados, los números sobre las Cys e His muestran los residuos involucrados en la unión a los iones de zinc; en verde se indica el dominio RING-H2.

La proteína TbCdc34 posee un 20% de identidad con la proteína de humanos (Número de acceso: P49427), está compuesta por 247 aminoácidos y un peso molecular deducido de 28.16 kDa. Dentro del dominio N-terminal están muy conservados varias regiones, incluyendo el sitio activo. Posee el dominio UBC, con la cisteína catalítica (C84)(usualmente en las proteínas Cdc34 ésta es la única cisteína), la serina involucrada en la formación de la cadena de ubiquitina (S86) y la inserción de 11 aminoácidos que la diferencia del resto de las E2 (residuos 93-104) [56,57] (Fig. R3). A su vez, esta E2 posee una extensión en el extremo C-terminal, que en humanos [58] y levaduras [59] se ha determinado como esencial para mediar la interacción con el SCF. Esta extensión C-terminal permite incluir a TbCdc34 dentro de las E2 de la Clase III (ver introducción).



*mology* (CH), que comprende los residuos 352 a 583, es el encargado de reclutar la enzima E2 y la proteína Rbx1. Dentro de este dominio, se encuentra el residuo Arg 442, cuya mutación en la proteína de levaduras (R488C), disrumpe la interacción con Cdc34 [60]. En las proteínas deducidas de tripanosomátidos, este residuo se encuentra conservado (Fig. R4). El extremo C-terminal es la región más conservada de toda la proteína, y es en esta región que se encuentra el residuo lisina (K686 en la proteína de *T. brucei*) que es modificado por la Ubl Nedd8. La neddilación de Cul1 aumenta la actividad ubiquitin ligasa *in vitro*, potencialmente por facilitar el reclutamiento de las enzimas E2 [61]. A su vez se demostró que la neddilación es importante para la actividad de Cul1 *in vivo* [62].

TbCul1	DRVIAALSYVTDRTFLAHSRDLLAQRILSPKKKFDDNIERSFAHRISHCCGVSSTCYLE	475
TcCul1	EKAVAALAYVTDRTFLAHSRELLAQRILFPRKKMDEATERSLIQRISQRCGVSSTSYLE	474
LmCul1	DRIVATLAYVTERDRFIATSREHMADRILLPIKKFSEANERALIQRFQRCGPTSTACLE	477
PfCul1	SEIVEIFNYTSNKETFEEYRVYLANRLIN-NIYISLHIEKKFIEQLYLCGSQYTSKLG	547
HsCul1	NQVMVVKYIEDKDVQKFKYAKMLAKRLVHQNSASDDAEA-SMISLKLQACGFEYTSKLQ	505
ScCul1	EDIITIFKYLTDKDAFETHYRRLFAKRLIHGTSTSAEDEE-NIIQRLQAANSMEYTGKIT	520
	. : : * : : * : * . * :	
<hr/>		
TbCul1	----TVSLHDIFIVNDNFTSKLKKMKIAMGRDQNIVAAQ-----SE	663
TcCul1	----TIQPOAKFFINEDFSSKWKVVPMPTRRDGLLH-----GE	662
LmCul1	----LLQMDELTVNDDFVCRARRMRIPPSLAR-VSVGE-----SE	665
PfCul1	----DWTNSNFYINNNFYPKNVYIKKTTAL-----LS	752
HsCul1	VDEVELKPDTLIKLYLGYKNKLRVNIINVPKTEQKQ-----EQE	697
ScCul1	--DALVKPETQFKLSRPYKALKTNINFASGVKNDILQSLSGGGHDNHGKLGKRLTEDE	737
	. : : : . : .	
<hr/>		
TbCul1	EVAREVEEDRKPAIDACLVRIMKSRRLVLEHSMLEVECKERLLPTFSADPKLVKQRIEELI	723
TcCul1	EIAKKIEEDRRPAIDACLVRIMKSRRLVLSHSLVEECHQKLSQLFSADQKLIKQRIEELI	722
LmCul1	HISKQVEEDRKPAIDGALVRIMKGRSLDHAELVLQCOQLSSRFSPDVKLIKQRIEELI	725
PfCul1	KEHEKTKEDRTMAIEAAIVRVMKMKHKKLFYDQIFDYVKKSLSS-FSPTNQVIEKKIDLLV	811
HsCul1	TTHKNIEEDRKLIIQAAIVRIMKMRKVLKHQQLLGEVLTQLSSRFKPRVPVIKCIDILI	757
ScCul1	RIEKELNTERQIFLEACIVRIMKAKRNLPHPTTLVNECIAQSHQRFNAKVMVKRAIDSLI	797
	. : : * : : : * : * : * : * : * : * : * : * : * :	

Figura R4 | Alineamiento múltiple parcial de secuencias aminoacídicas de TbCullin1 con otras proteínas Cul1 de eucariotas. En el alineamiento superior se puede observar la Arg (flecha) del dominio CH de Cullin1, cuya mutación es la causante de la cepa mutante *cdc53-1* en levaduras. En el panel inferior, se muestra parte del dominio C-terminal de las Cullinas. La lisina (K) aceptora de Nedd8 se marca con una flecha. Los asteriscos marcan los residuos conservados. *Trypanosoma brucei* (TbCul1: Tb927.8.5970), *Trypanosoma cruzi* (TcCul1: Tc00.1047053511075.40), *Leishmania major* (LmCul1: LmjF24.2290), Humanos (HsCul1: Q13616), *Saccharomyces cerevisiae* (ScCul1: Q12018), *Plasmodium falciparum* (Pfskp1: PF08\_0094)

Este análisis mostró que las subunidades homólogas del complejo SCF en Tripanosomátidos se encuentran muy conservados e indicarían que este complejo podría ser funcional en estos parásitos.

### **ARN DE INTERFERENCIA**

#### *Estudio de los efectos originados en la viabilidad de parásitos de *T. brucei* por el silenciamiento de los posibles componentes del complejo SCF*

La secuenciación del genoma de *T. brucei* ha determinado que existen 9,068 genes dentro de sus 11 cromosomas. De estos genes predichos, solo al 50.5% se le ha asignado una función. Los enfoques de genética reversa permiten comprobar la función de un gen, sobre la base de la capacidad de predecir la función de la secuencia de la proteína. El ARN de interferencia (ARNi) en Tripanosomas fue descrito por el laboratorio de Ullu y Tschudi [63] en 1998 durante un estudio diseñado para abordar el mecanismo del splicing de ARNm en *T. brucei*. Ellos observaron que el ARN doble cadena derivado de secuencias codificantes para alfa-tubulina provocaba que las células se redondearan (*fat cells*). Este fue uno de los primeros descubrimientos de la actividad de ARNi en células eucariotas, luego de los primeros trabajos en plantas y gusanos. Varios Tripanosomátidos poseen la maquinaria para ARNi, incluyendo *T. brucei spp.* y *T. congolense*. Sin embargo, el ARNi está ausente en *T. cruzi* al igual que en *Leishmania*.

La utilización de los datos de la secuencia genómica de Tripanosomátidos depende de las herramientas utilizadas para analizar la función de los genes y la biología de los parásitos, y para identificar y validar blancos terapéuticos. En consecuencia, las herramientas genéticas en *T. brucei* están siendo mejoradas constantemente y se dispone de plásmidos para modificar genes *in situ*, para expresión ectópica y para el ARNi [64]. La utilidad del ARNi en *T. brucei* se manifestó en un trabajo reciente donde se analizó la función de todos los genes presentes en el cromosoma I del parásito [65].

Con el objetivo de estudiar la función que cumplen las proteínas homólogas del complejo SCF en *T. brucei*, se utilizó la técnica de ARNi. Para ello se amplificaron fragmentos de entre 305-498 pb correspondientes a una secuencia única de la re-

gión codificante de los genes sin una identidad de secuencia significativa dentro del resto de las secuencias de la base de datos del genoma de *T. brucei* (GeneDB.org). La selección de las regiones se realizó utilizando el programa *on-line* RNAit ([www.trypanofan.org](http://www.trypanofan.org)) [66]. Se diseñaron primers específicos para la reacción de PCR y luego los fragmentos fueron ligados en el plásmido pZJM por reemplazo del fragmento de  $\alpha$ -tubulina del vector [67]. Este plásmido posee dos promotores T7 en direcciones opuestas inducibles por Tetraciclina, por lo que al clonar el inserto entre estos dos promotores, es posible inducir la transcripción de la doble cadena de ARN que interferirá en las células con el mensajero de interés (Fig. R5). Las construcciones resultantes fueron linealizadas por digestión con la enzima de restricción NotI para su integración en la región de ADN ribosomal de *T. brucei*. La transfección de los parásitos procíclicos y sanguíneos de la cepa inducible de *T. brucei* 29-13 y 90-13, respectivamente, se realizó por electroporación (ver materiales y métodos) y luego de aproximadamente un mes se obtuvieron clones estables para cada una de las construcciones.

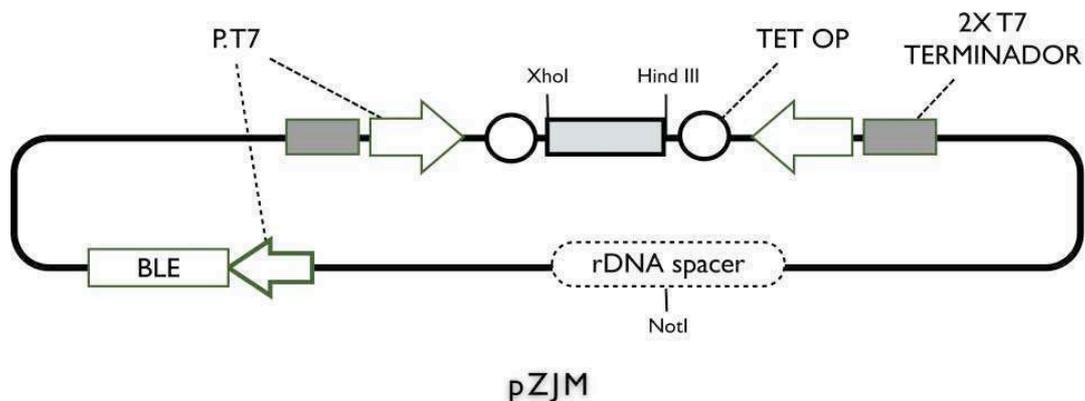


Figura R5 | **Esquema de la construcción utilizada para los silenciamientos.** El vector pZJM es inducible por Tetraciclina, contiene dos promotores T7 (P. T7) para generar la doble hebra de ARN e inducir el ARNi. El plásmido es direccionado a la región transcripcionalmente silenciosa de ADN ribosomal (*rDNA spacer*). Posee un gen de resistencia a la droga Fleomicina (BLE), necesaria para mantener el plásmido integrado en el genoma del parásito. La secuencia de ADN a utilizar es clonada entre los sitios XhoI y HindIII. *TET OP*: operadores para Tetraciclina.

A fin de determinar si la reducción de dichas proteínas afecta la viabilidad de los parásitos, se estudió la tasa de crecimiento de los parásitos de ARNi cada 24 horas durante seis días consecutivos en presencia de Tetraciclina. El agregado de Tetraciclina libera la represión sobre el promotor T7, permitiendo la expresión de la doble hebra. Para evaluar la eficiencia del silenciamiento, se purificó ARN total de estos culti-

vos y se analizó los niveles de ARNm mediante Northern blot (para el estadio procíclico (PCF)) o por *Real-Time PCR* cuantitativa (qRT-PCR) (para el estadio sanguíneo (BSF)). Los resultados obtenidos se muestran para cada una de las proteínas de forma separada.

### ***ARNi de TbRbx1***

Para analizar el efecto que tiene la interferencia de esta proteína, se contó diariamente el número de parásitos en cultivos inducidos y no inducidos con Tetraciclina. La inducción del ARNi resultó en una inhibición en el crecimiento de los parásitos cuatro días después del agregado de la droga en el estadio procíclico. En cambio, en tres clones diferentes analizados del estadio sanguíneo, no se detectó ningún efecto en el crecimiento de los parásitos. El análisis por Northern blot y de qRT-PCR mostró la disminución del ARNm de TbRbx1 luego de la inducción de la interferencia (Fig. R6A). A su vez, se tomaron muestras a diferentes tiempos para realizar tinciones con 4,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) o Ioduro de Propidio para un ulterior análisis mediante citometría de flujo (FACS). La tinción con DAPI de células fijadas permite visualizar por microscopía las moléculas de ADN presentes dentro de ella; de esta manera, es posible estudiar el contenido de ADN nuclear(N) o del kinetoplasto(k) y la tasa N:K refleja la posición de la célula en el ciclo celular (ver introducción: [Ciclo celular en Tripanosomátidos](#)). Por lo tanto, las anomalías observadas en la estructura o número relativo de compartimentos de ADN reflejará defectos nucleares, del kinetoplasto y del ciclo celular. El análisis por FACS nos da información sobre la distribución de las células en las diferentes fases del ciclo celular (G1, S o G2/M). Sin embargo, no es posible diferenciar entre G2 y M, ya que en las dos se encuentra el mismo contenido de ADN.

En parásitos procíclicos, a partir del día 6 luego de la inducción del ARNi de TbRbx1, el análisis por DAPI evidenció una clara reducción en el porcentaje de células con contenido 1N1K en comparación con células no inducidas (88% contra 71%); dicha diferencia aumentó en el día siete post-inducción (86% vs. 68%). Por otro lado, no hubo una alteración apreciable en las configuraciones de células 1N2K o 2N2K (Fig. R6B, *panel izquierdo*).

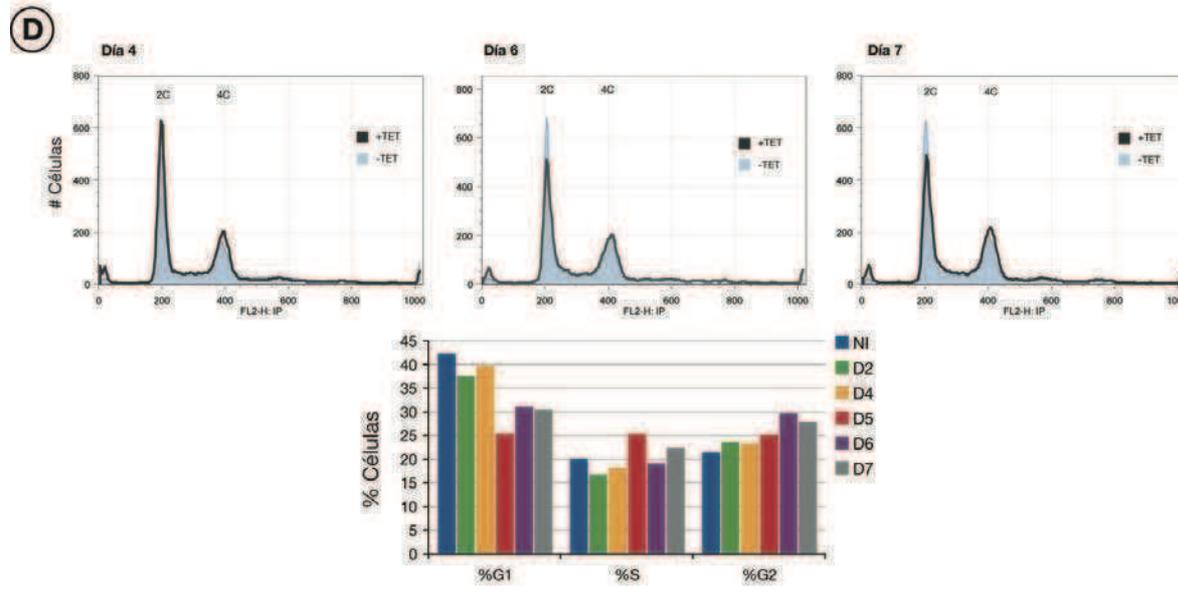
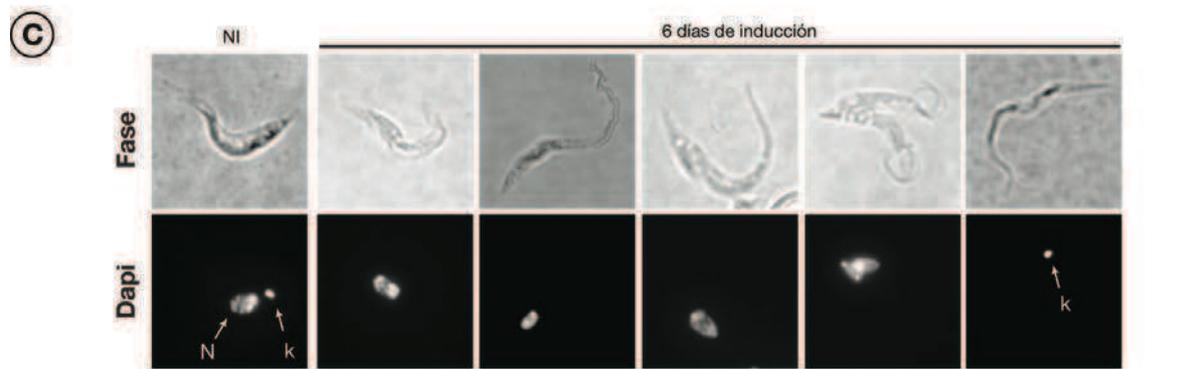
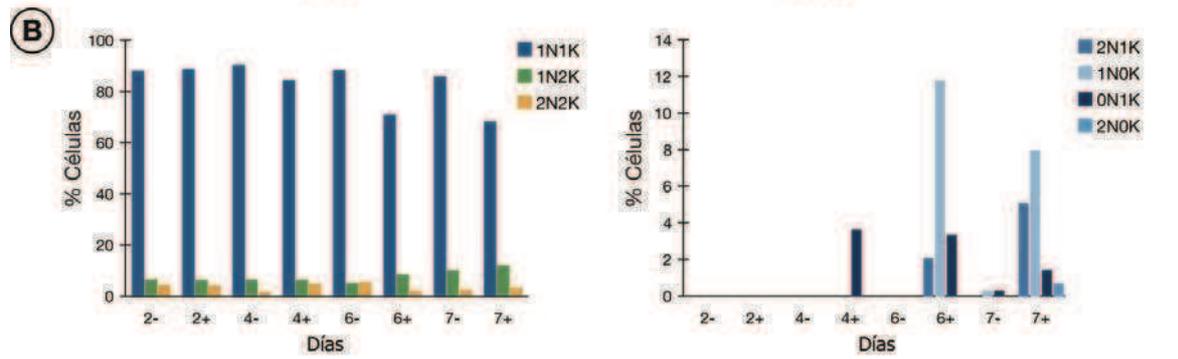
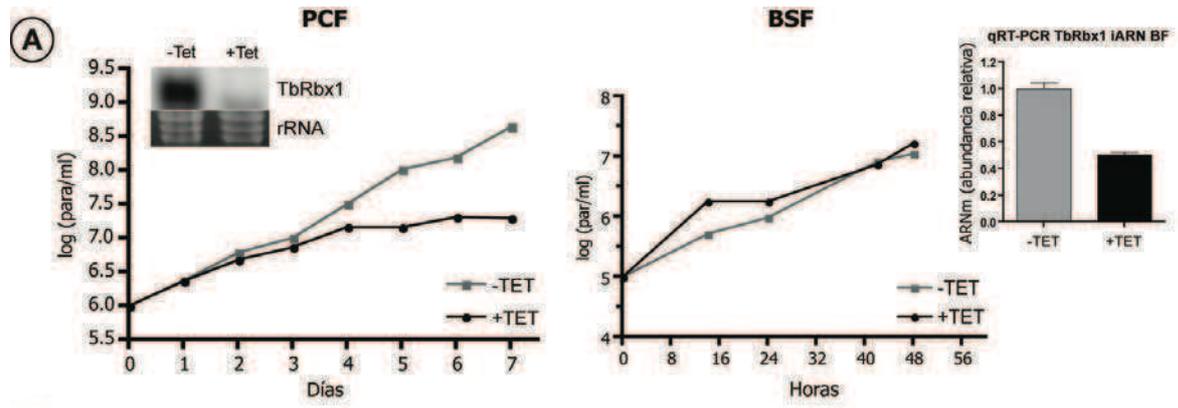


Figura R6 | **TbRbx1 es esencial en la forma procíclica de *T. brucei*.** A) Curvas de crecimiento de parásitos PCF Rbx1 (*panel izq.*) y BSF Rbx1 (*panel der.*) luego de la inducción del ARNi. Células PCF y BSF transfectados con la construcción pZJM-TbRbx1 ARNi fueron cultivados en presencia (+) o ausencia (-) de Tetraciclina (1µg/ml). Dentro de ambas gráficas se muestra el Northern blot (PCF) o la qRT-PCR (BSF) demostrando la degradación del ARNm mediada por el ARNi. B) Configuraciones de núcleos (N) y kinetoplastos (K) del ARNi en PCF TbRbx1 inducidos (+) o no inducidos (-) con Tetraciclina para los tiempos indicados. C) Imágenes de células teñidas con DAPI vistas con microscopía de contraste y fluorescencia. El efecto del ARNi de TbRbx1 se observa sobre la morfología y sobre los núcleos (N) y kinetoplastos (K). D) Análisis de FACS del ARNi de TbRbx1 en células PCF. El panel inferior indica el porcentaje de células en las diferentes fases del ciclo celular, cuantificado mediante el programa Flowjo 7.5.5. Los experimentos fueron repetidos al menos tres veces. *NI*, células no inducidas. *para/ml*: parásitos por ml.

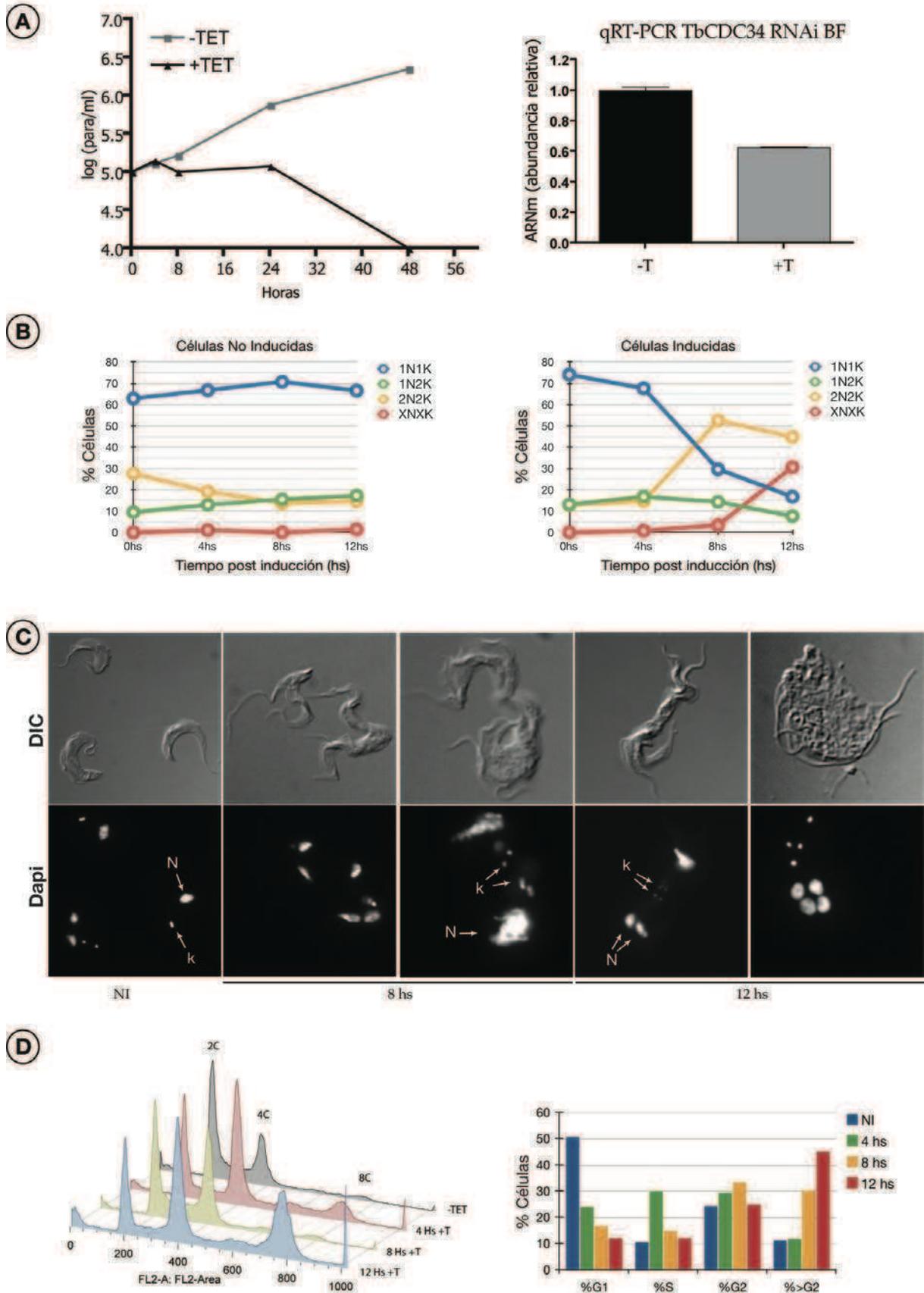
Sin embargo, se pudo observar un aumento de células con contenido 1N0K y 0N1K (zoides) en el día 6 (11,8% y 3,4%, respectivamente) (Fig. R6B, *panel derecho*). El análisis realizado mediante FACS mostró una reducción en el porcentaje de células en la fase G1 a partir del día 6 (13% menos que el control), sin cambios en el número de células en S y un pequeño aumento en población de G2/M (Figura R6D). No se observaron cambios en la morfología de las células durante el periodo de tiempo estudiado. Estos resultados indican que la proteína TbRbx1 podría estar involucrada de forma directa o indirecta en la replicación del kinetoplasto, ya que su depleción provoca la aparición de células con un núcleo y ningún kinetoplasto, así como células sin núcleo y con kinetoplasto, estas últimas denominadas zoides (Figura R6C).

### ***RNAi de TbCDC34***

El análisis del ARNi de TbCdc34 se realizó únicamente en el estadio sanguíneo de *T. brucei*, ya que no fue posible generar líneas estables en el estadio procíclico. Se analizaron tres clones diferentes que mostraron resultados similares. La inducción de la interferencia de TbCdc34 provocó una rápida inhibición del crecimiento, que fue evidente a las 8 horas post-inducción. Esto se correlaciona con la disminución en los niveles de ARNm examinados por qRT-PCR (Fig. R7A). Mediante tinción del ADN con DAPI, se observó un aumento significativo de células mitóticas (2N2K) ( $n > 300$ ), las cuales comprendían el 50% del total a las 8 horas de inducción (Fig. R7B). Se pudo observar células que permanecían unidas por sus extremos posteriores,

que re-replicaron su ADN nuclear y del kinetoplasto, dando como resultado la aparición de tipos celulares anormales con más de dos núcleos y dos kinetoplastos, que comprendían el 30% de las células, con configuraciones XNXX, a las 12 horas post inducción (Fig. R7B y C). Luego de este tiempo, se observaron pocas células viables en el cultivo. Estos datos indican que las células no pueden completar la citoquinesis, provocando una alteración del ciclo celular. Fue posible observar que estas células poseían además múltiples flagelos. Las células no inducidas, a pesar de crecer con una tasa algo menor a la cepa parental no transformada (datos no mostrados), no presentaron este tipo de anomalías (Fig. R7B, *panel izquierdo*). Del mismo experimento se tomaron muestras para su estudio por FACS. El análisis mostró un aumento de células con contenido de ADN 4C y la aparición de células 8C (>2 núcleos) luego de ocho horas de inducción (Fig. R7D). Como se observó en fenotipos similares en otros ARNi [68,69], estas células muestran un surco de división incompleto o una separación parcial de las células (Fig. R7C). Corroborando los resultados obtenidos por DAPI, este estudio sugiere que la proteína TbCdc34 podría tener una función en la finalización de la citoquinesis en la forma sanguínea de *T. brucei*.

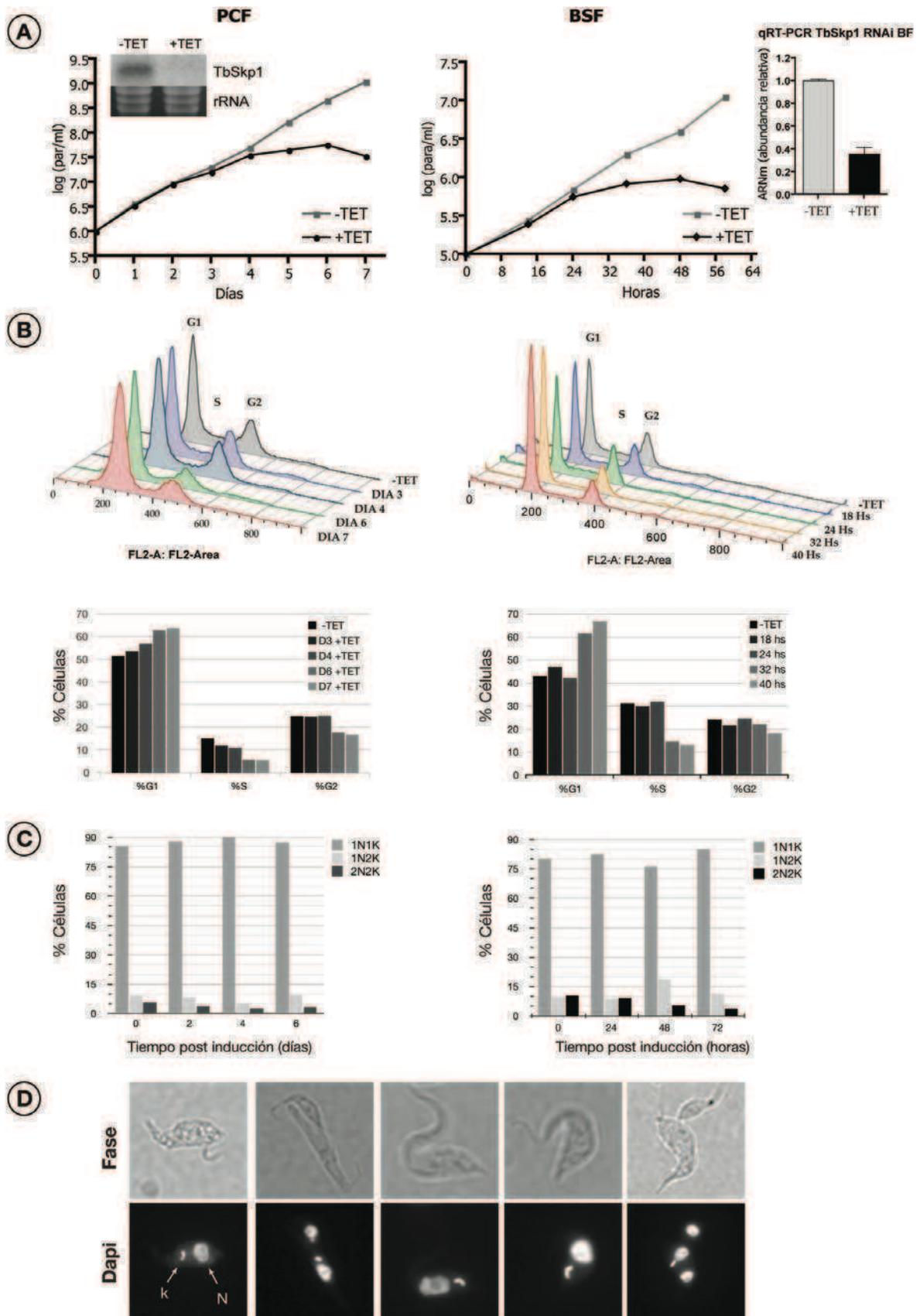
Figura R7 (*siguiente página*) | **TbCdc34 es esencial para la citoquinesis en BSF de *T.brucei***. A) Cinética de crecimiento de parásitos BSF del ARNi de TbCdc34. Las células fueron cultivadas en presencia (+TET) o ausencia (-TET) de Tetraciclina (1µg/ml) (panel izq). qRT-PCR demostrando la degradación del ARNm de TbCdc34 (panel derecho). B) Configuraciones de núcleos (N) y kinetoplastos (K) en células inducidas o no inducidas para el ARNi. C) Imágenes de células teñidas con DAPI observadas por microscopía diferencial de contraste de interferencia (DIC) y fluorescencia. D) Análisis mediante FACS. NI, células no inducidas. Estos experimentos fueron repetidos al menos tres veces. *para/ml*: parásitos por ml.



### **RNAi de TbSKP1**

Para el estudio funcional de TbSKP1 se empleó la misma metodología. Se obtuvieron al menos cuatro clones independientes y se analizaron tres de ellos. Se comprobó que el nivel de silenciamiento del ARNm era similar en todos los clones analizados, y se procedió al estudio detallado de uno de ellos (clon D3). La inducción del ARNi de TbSkp1 produjo una menor tasa de crecimiento tanto en el estadio procíclico (PCF) como en el estadio sanguíneo (BSF) de los parásitos. A partir del día cuatro post inducción, en el estadio PCF, y luego de 24 horas, en el estadio BSF, las células detuvieron su crecimiento, y para el final del experimento, comenzaron a morir. El Northern blot y qRT-PCR confirmaron la degradación del ARNm de TbSkp1. Al examinar el ciclo celular por FACS, las células PCF mostraron en el día seis post-inducción un aumento del 12% de la población en la fase G1/S, mientras que las células en la fase G2/M disminuyeron un 8% y la población en fase S disminuyó un 9%. Resultados similares se obtuvieron para el ARNi de las células del estadio BSF; la población de células en fase G1/S aumentó un 10%, la de fase S disminuyó un 5% y la de la fase G2/M disminuyó un 4,6%, en relación con las células no inducidas. Al examinar los parásitos con tinción con DAPI, las diferencias fueron menores a las encontradas por FACS, pero igualmente confirmaron estos resultados. A su vez se observaron kinetoplastos en forma de “medialuna” (Fig.8D), lo cual indica un arresto de las células en el momento en el cual el kinetoplasto está segregando su nueva copia luego de la replicación. Por lo tanto, el enriquecimiento de células en fase G1/S en el ARNi de ambos estadios de *T. brucei* (PCF y BSF) sugieren que dicha proteína podría tener funciones similares a las de sus homólogos de levaduras o humanos en la regulación de la ubiquitinación de reguladores del ciclo celular en la transición de la fase G1 a S [70,71].

Figura R8 (siguiente página) | **El ARNi de TbSkp1 frena a las células en la transición de fases G1/S del ciclo celular.** A) Curvas de crecimiento de células PCF (panel izq.) y BSF (panel derecho) inducidas (+TET) o no inducidas (-TET) con Tetraciclina para el ARNi de TbSkp1. Dentro de ambas gráficas se muestra el Northern blot (PCF) o la qRT-PCR (BSF) demostrando la degradación del RNAm mediada por el ARNi. B) Análisis de FACS del ARNi de TbSkp1 en células PCF (panel izq) o BSF (panel derecho). El panel inferior indica el porcentaje de células en las diferentes fases del ciclo celular, cuantificado mediante el programa Flowjo 7.5.5. C) Configuraciones de núcleos (N) y kinetoplastos (K) del ARNi en PCF TbSkp1 inducidos (+) o no inducidos (-) con Tetraciclina para los tiempos indicados. D) Imágenes de células teñidas con DAPI vistas con microscopía de contraste y fluorescencia. Se puede observar el alargamiento de los kinetoplastos en las células depletadas de TbSkp1. Los experimentos fueron repetidos al menos tres veces. D, día; *para/ml*: parásitos por ml.



### RNAi de *TbCullin1*

En este caso se procedió de la misma manera que en los ARNi anteriores. Una vez analizado la inducción de las células, se pudo determinar que el silenciamiento de esta proteína no producía ningún fenotipo irregular, así como ningún cambio en la tasa de crecimiento de los parásitos. Sin embargo, el análisis del Northern blot mostró que el nivel de mensajero en las células inducidas no disminuyó como en el caso de *TbRbx1* (aprox. 50% de inhibición para *TbCul1*) (Fig.R9). Esto podría estar indicando o bien que el ARNi no fue lo suficientemente efectivo como para depletar las células de la proteína o que otras proteínas de la familia Cullin pueden reemplazar su función (ver discusión).

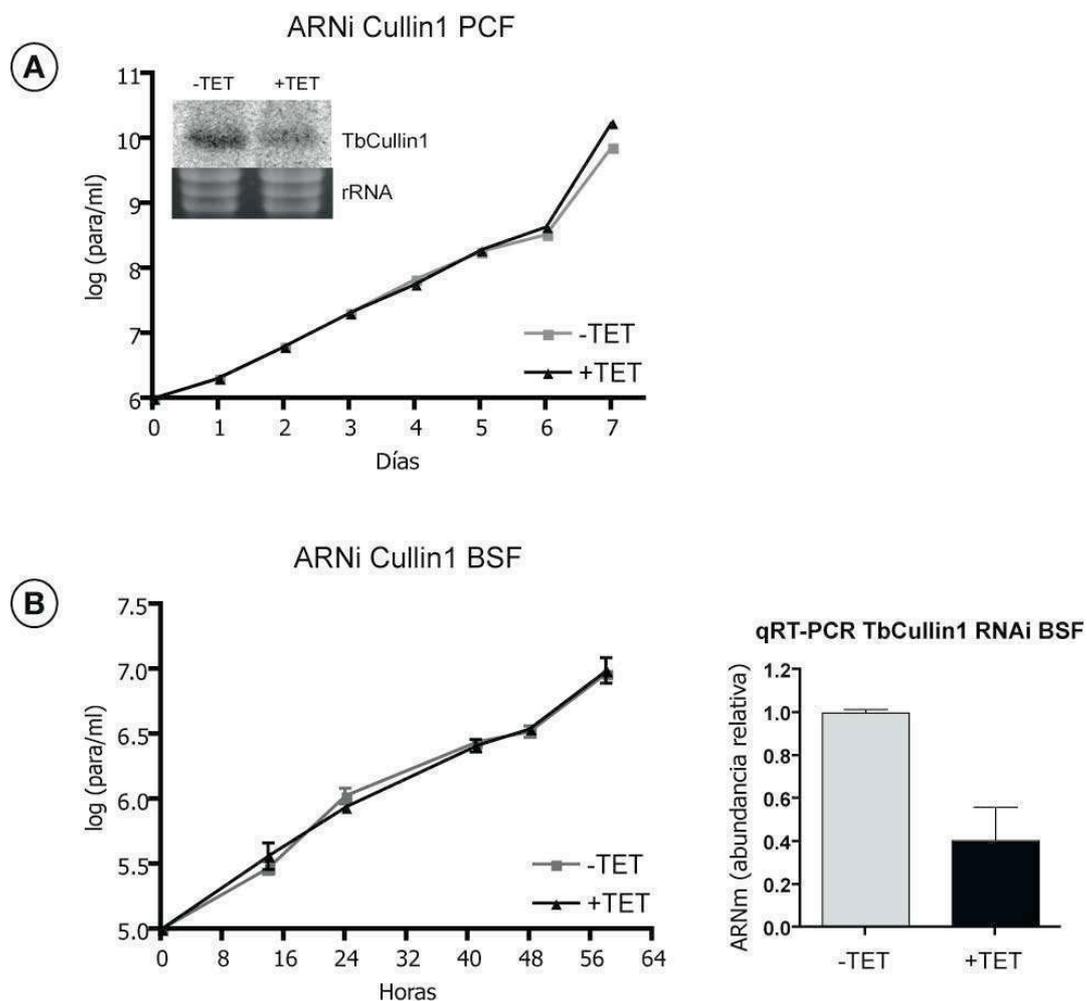


Figura R9 | *ARNi de TbCullin1*. A) Cinética de crecimiento de parásitos BSF del ARNi de *TbCullin1*. Las células fueron cultivadas en presencia (+TET) o ausencia (-TET) de Tetraciclina (1µg/ml). B) Cinética de crecimiento de parásitos PCF del ARNi de *TbCullin1* qRT-PCR demostrando la degradación del ARNm de *TbCullin1* (panel derecho). *para/ml*: parásitos por ml.

### **SOBREEXPRESIÓN Y ETIQUETADO DE PROTEÍNAS DEL COMPLEJO SCF**

Los resultados obtenidos mediante la técnica de ARNi de las proteínas del núcleo del complejo SCF nos mostró que estos genes son esenciales para el crecimiento de *T. brucei*, y estarían involucrados en regular el correcto avance a través del ciclo celular. En esta etapa se estudió si al igual que la depleción de las proteínas del complejo, la sobreexpresión ectópica de ellas producía algún tipo de alteración en el crecimiento de los parásitos.

Para esto se utilizaron las mismas cepas inducibles con Tetraciclina 29-13 y 90-13, pero en este caso se usó el vector de sobreexpresión p2477 (Fig.R10), el cual permite la fusión en marco del gen de interés a un epítipo de seis hemaglutininas en su extremo C-terminal (6xHA) [72]. Este vector, al igual que el pZJM, es linealizado previo a la transfección y es capaz de recombinar en la región que no se transcribe entre los genes ribosomales de RNA (rRNA). La expresión del transgen es regulada por el promotor fuerte EP1 del gen de prociclina. Elegimos trabajar con dos de los cuatro genes del complejo SCF, TbSkp1 y TbCdc34. Ambos genes fueron clonados en marco de lectura con el epítipo en el extremo C-terminal.

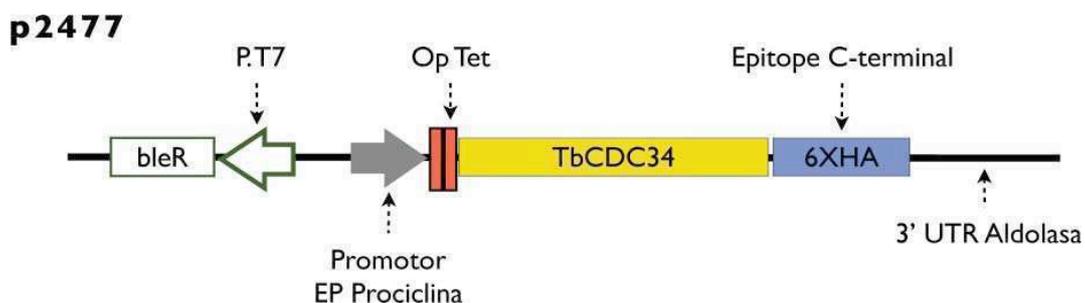
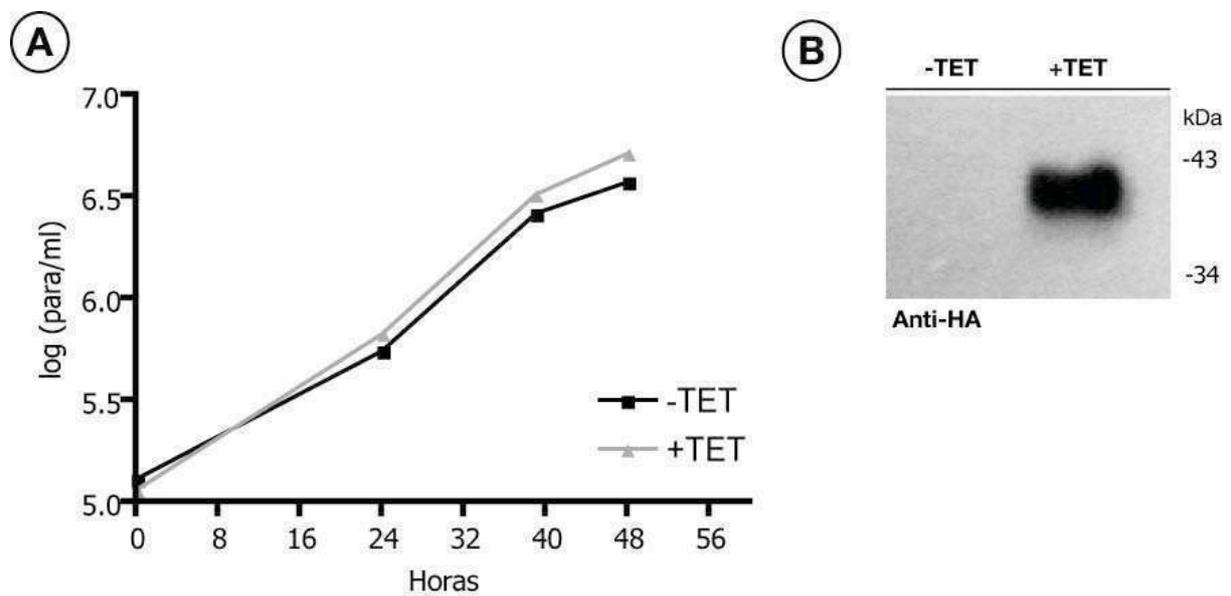


Figura R10 | **Esquema de la construcción utilizada para las sobreexpresiones.** El vector p2477 es inducible por Tetraciclina, contiene el promotor EP1 de Prociclina para la transcripción del transgen. El plásmido es direccionado a la región transcripcionalmente silenciosa de ADN ribosomal (*rDNA spacer*). El promotor T7 transcribe constitutivamente el gen de resistencia a la droga Fleomicina (bleR), necesario para mantener el plásmido integrado en el genoma del parásito. La secuencia de ADN es clonada entre los sitios HindIII y BAMHI en marco con el epítipo C-terminal. *Op Tet*: operadores para Tetraciclina.

### Sobreexpresión de TbSkp1

La secuencia completa del gen de TbSkp1 fue clonada en el plásmido p2477 para generar la fusión a un epítopo de seis hemaglutininas (6xHA). Se transfectaron parásitos de la cepa 90-13 del estadio sanguíneo de *T. brucei* con la construcción linealizada. Se obtuvieron 4 clones independientes por dilución seriada y se analizó el crecimiento de los mismo en presencia o ausencia del inductor Tetraciclina. Los resultados obtenidos fueron similares y se presenta el análisis de uno de ellos (Fig. R11A). La inducción de la sobreexpresión de TbSkp1-6xHA no produjo variaciones en la cinética del crecimiento de los parásitos. Se confirmó la sobreexpresión de la proteína por Western blot y revelado con el anticuerpo anti-HA (Fig. R11B). Por consiguiente, la sobreexpresión de TbSkp1 no estaría afectando el crecimiento de los parásitos del estadio BSF de *T. brucei*.

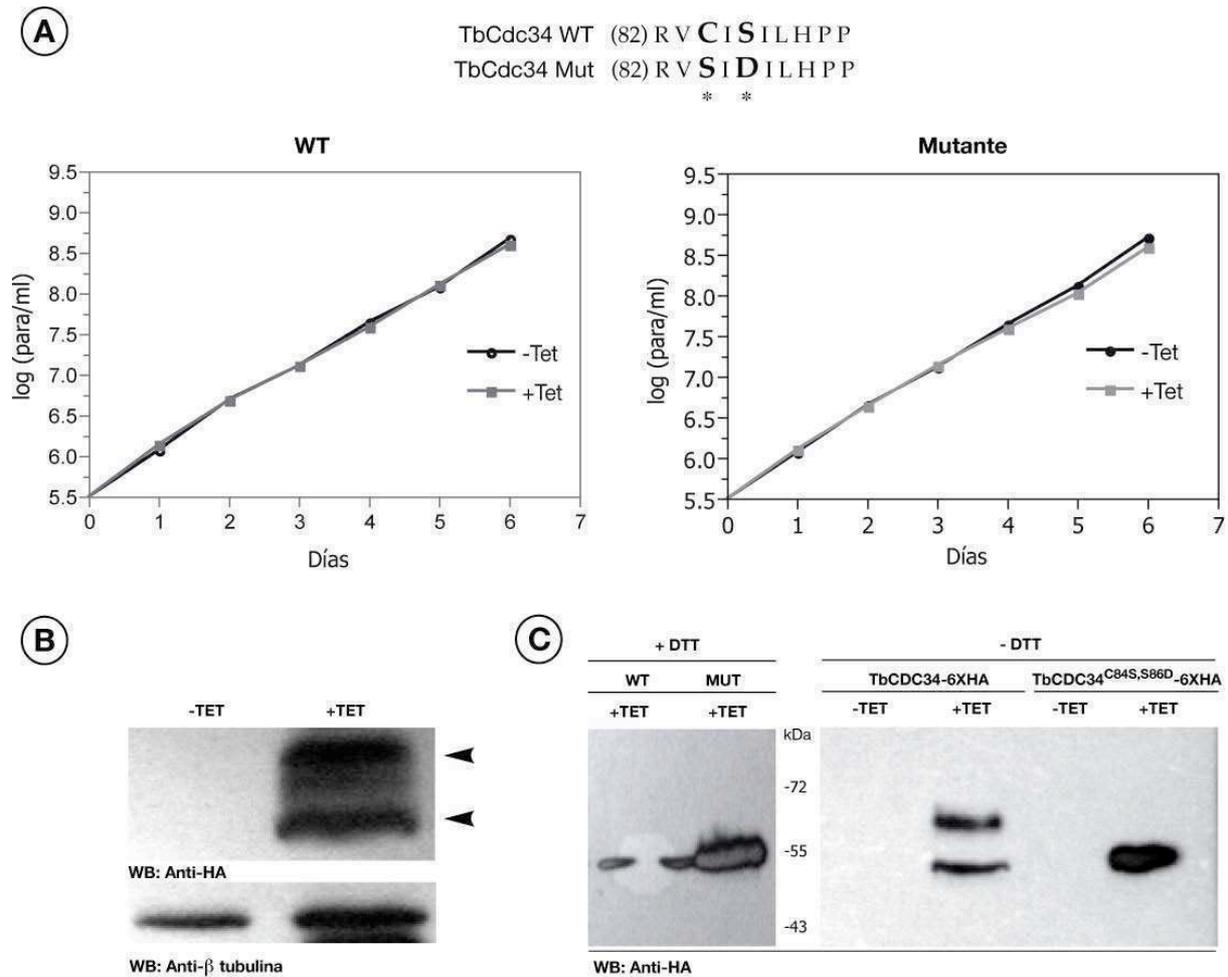


**Figura R12 | La sobreexpresión de TbSkp1-6xHA no afecta la proliferación de *T. brucei*.** A) Curvas de crecimiento de células BSF inducidas (+TET) o no inducidas (-TET) para la sobreexpresión de TbSkp1 indican que no se producen variaciones en la tasa de crecimiento de las mismas. B) Análisis por Western blot de la sobreexpresión de TbCdc34 a partir del agregado de Tetraciclina. *para/ml*: parásitos por ml.

### **Sobreexpresión de TbCdc34**

En *Saccharomyces cerevisiae*, la mutante *CDC34-C95S,L99S* codifica para una enzima conjugadora de ubiquitina inactiva, y su sobreexpresión en cepas *wild type* (*wt*) bloquea el crecimiento celular [73]. Con el fin de investigar el efecto de la sobreexpresión de TbCdc34 en *T. brucei*, se expresó la versión *wt* y una doble mutante (Cdc34-6xHA y Cdc34<sup>MUT</sup>-6xHA) en células procíclicas y sanguíneas. Por mutagénesis dirigida se generó la versión mutante de la cisteína del sitio activo (C84S) y la serina adyacente (S86D) de TbCdc34. Se eligió mutar estos dos aminoácidos, ya que la sustitución de la cisteína catalítica C95 o serina S97 genera una proteína no funcional *in vivo* tanto en humanos como en levaduras [57,73].

Una vez transfectados y seleccionados los parásitos con las construcciones generadas, se analizó el crecimiento de los mismos en presencia o ausencia del inductor de la expresión Tetraciclina. Las curvas de crecimiento de los parásitos que sobreexpresan TbCdc34 (Cdc34-6xHA) o la versión mutada (TbCDC34<sup>C84S,S86D</sup>-6XHA) frente a parásitos no inducidos no mostraron diferencias en la tasa de crecimiento, ni en el estadio procíclico (Fig. R12A) ni en el sanguíneo (no mostrado). La expresión de las proteínas ectópicas se analizó por Western blot utilizando el anticuerpo anti-HA (Fig. R12B). De forma inesperada, además de la banda correspondiente a la fusión de TbCdc34 y el epítipo de HA (28kDa + 39 kDa, respectivamente), se pudo observar una segunda banda en extractos de parásitos que sobreexpresan la proteína *wt* en ausencia del agente reductor Dithiothreitol (DTT) en el buffer de siembra; en presencia de DTT, esta segunda banda desaparece (Fig.R12C, *izquierda*). Esto no fue observado en el caso de la proteína mutada en la cisteína catalítica (Fig. R10C, *derecha*).



**Figura R12 | La sobreexpresión de TbCdc34-6xHA no afecta la proliferación de *T. brucei*.** A) Esquema que muestra los aminoácidos mutados en TbCdc34. Curvas de crecimiento de células PCF inducidas (+TET) o no inducidas (-TET) para la sobreexpresión de TbCdc34 *wt* o mutada en la cisteína del sitio activo, indican que no produce variaciones en la tasa de crecimiento de las mismas. B) Análisis por Western blot de la sobreexpresión de TbCdc34 a partir del agregado de Tetraciclina. En ausencia de DTT en el buffer de siembra, se observa una banda de mayor peso molecular al esperado para TbCdc34 (flechas). Como control se reveló la membrana con anti- $\beta$ -Tubulina. C) En presencia de DTT, la banda de mayor peso molecular desaparece (+DTT, izq). La proteína mutada en la cisteína catalítica y la serina adyacente (TbCDC34<sup>C84S,S86D</sup>-6XHA) no muestra este cambio en la movilidad, en presencia o ausencia de DTT (+/-DTT). *para/ml*: parásitos por ml.

La formación de un intermediario tioéster entre Cdc34 y ubiquitina puede detectarse como un cambio en la movilidad de  $\sim 8$ kDa en un gel SDS-PAGE en condiciones no reductoras (p.ej. sin DTT). Al tratar la muestra con DTT, la unión tioéster entre la cisteína del sitio activo de la enzima y el extremo carboxi-terminal de la ubiquitina se rompe y se anula el cambio en la movilidad [74]. Para confirmar si este cambio en la movilidad de la proteína se debía a una asociación entre TbCdc34 y ubiquitina, se realizaron ensayos de inmunoprecipitación con el anticuerpo anti-HA en extractos

proteicos de parásitos que sobreexpresan TbCdc34-6xHA y TbCDC34<sup>C84S,S86D</sup> 6xHA. Fue posible inmunoprecipitar estas proteínas, pero la naturaleza de esta unión es tan inestable que no fue posible inmunoprecipitar la proteína modificada (aún en presencia de N-etilmaleimida (NEM), un agente protector de tioles que bloquea la actividad de isopeptidasas y enzimas deubiquitinantes)[74]. Posteriormente se utilizó una matriz (UbiQapture™-Q Kit) capaz de aislar proteínas mono- u poli-ubiquitinadas de extractos proteicos (independientemente del tipo de unión de cadena - ver Introducción). Utilizando esta matriz se purificó la proteína *wt* y mutante de extractos proteicos de procilicos, y luego se analizó por Western blot utilizando el anticuerpo anti-HA. Como se muestra en la figura R13, la proteína *wt* sobreexpresada fue retenida por la matriz, no así la forma mutante, a pesar de que luego de la elución, la banda sensible a DTT no pudo detectarse. Esto podría significar que si la proteína es ubiquitinada, en la elución la unión se rompe y sólo la banda correspondiente a TbCdc34 es detectada.

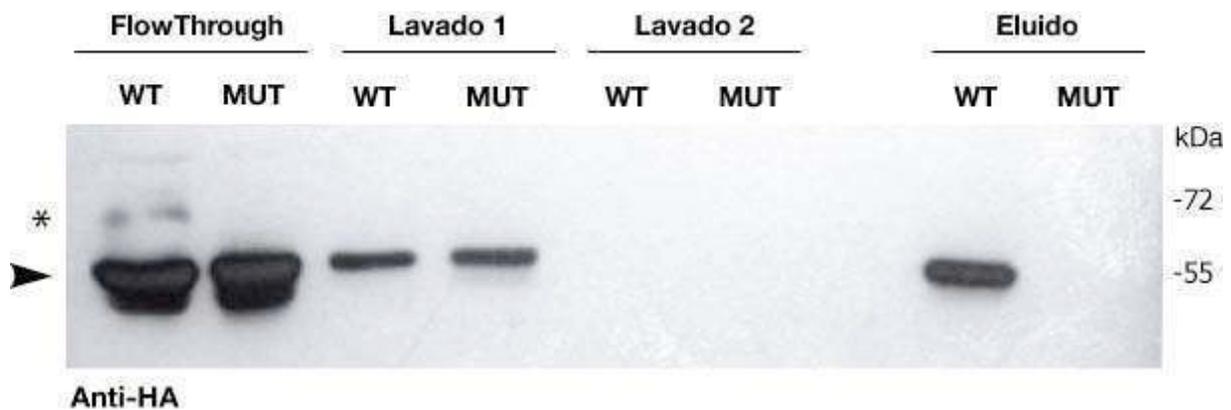


Figura R13 | TbCdc34-6xHA es retenida por columna que une proteínas ubiquitinadas. Extractos proteicos de parásitos que expresan la proteína *wt* o mutante de TbCDC34 fueron incubados con una resina UbiQapture y analizados por SDS-PAGE 10% y Western blot con anticuerpo anti-HA. La flecha indica la banda correspondiente a TbCdc34-6xHA y el asterisco a TbCdc34-6xHA modificada.

De estos experimentos podemos concluir que la sobreexpresión de TbCdc34, *wt* o mutante, no produce ningún efecto en el crecimiento de los parásitos y que es probable que al igual que sus homólogos de humanos y levaduras, sea capaz de formar una unión con ubiquitina a través de la cisteína catalítica.

### ***Ensayo de formación de intermediario tioéster***

Hay varias formas de evaluar la formación de la unión tioéster entre la ubiquitina y una enzima E2. Se puede observar directamente el cambio en la migración de la enzima en gel o evaluando indirectamente a la E2 por detección de la ubiquitina. Para confirmar que la enzima TbCdc34 es capaz de formar una unión con la ubiquitina, se clonó la proteína en un vector de expresión bacteriano con el fin de obtener la proteína recombinante con un tracto de seis residuos histidina en su extremo N-terminal (His-TbCdc34). La enzima purificada se utilizó para un ensayo *in vitro* de formación del intermediario tioéster entre la ubiquitina y TbCdc34 [75]. El ensayo consiste en incubar la enzima E1, la enzima E2 y ubiquitina, y en caso de producirse el intermediario tioéster E2-Ub, se detecta por un cambio en la movilidad de la E2 en un gel SDS-PAGE. Para el ensayo se utilizó la enzima E1 y la ubiquitina de humanos (ver materiales y métodos) y buffer de ubiquitinación. Como control positivo, se utilizó la proteína CDC34 de levaduras con un tracto de seis histidinas en su extremo C-terminal (ScCdc34-His) (cedido por R. Deshaies, Howard Hughes Medical Institute, California, USA). Luego de 60 minutos de incubación a 37°C, las reacciones se detienen por calentamiento a 100°C y se analizan por SDS-PAGE 10% en condiciones no-reductoras. El Western blot con el anticuerpo anti-ubiquitina reveló que TbCdc34 es capaz de conjugar moléculas de ubiquitina al igual que la enzima de *S. cerevisiae* (Fig. R15).

Visto y considerando los resultados obtenidos por la sobreexpresión de TbCdc34, donde se observa un corrimiento en la movilidad de la enzima en geles de poliacrilamida, que la mutante de la cisteína del sitio activo no sufre esta modificación; que la enzima es retenida en una columna que atrapa proteínas ubiquitinadas y en un ensayo de formación del intermediario tioéster *in vitro* TbCdc34 fue capaz de unirse a la ubiquitina de humanos, podemos afirmar que esta proteína posee la capacidad de recibir de la enzima E1 moléculas de ubiquitina activadas y podría estar involucrada en la ubiquitinación de sustratos en el parásito *T. brucei*.

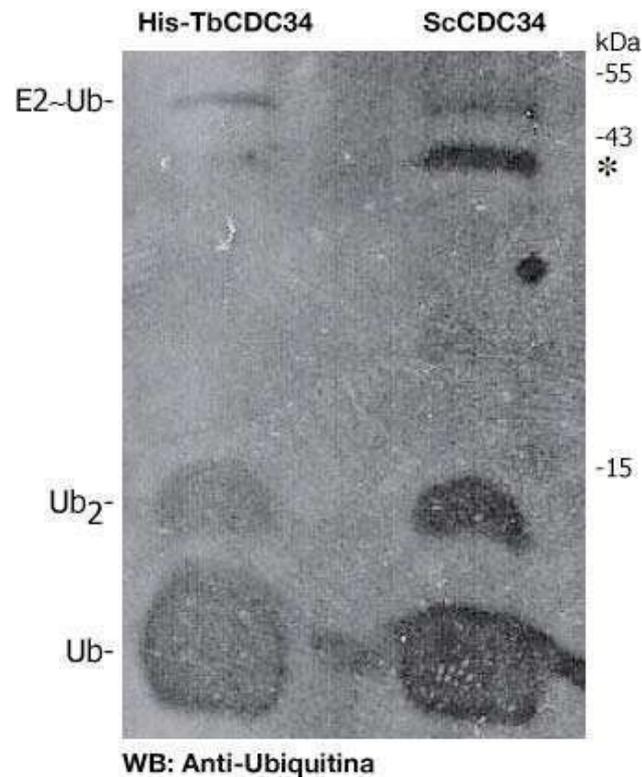


Figura R15 | **Ensayo de formación del intermediario tioéster.** Las proteínas recombinantes TbCdc34 (1,25 µg) o ScCdc34 (1,25 µg) fueron incubados con la E1 de humanos, ATP, y 5 µg de Ubiquitina por 1 hora a 37°C. Las reacciones fueron detenidas en buffer SDS sin DTT y analizadas por SDS-PAGE no reductor y Western blot con el anticuerpo anti-ubiquitina. La posición del intermediario entre la E2 y ubiquitina está indicada a la izquierda. El asterisco indica reactividad cruzada del anticuerpo con la proteína ScCdc34.

### **Localización de TbCdc34**

Con el objetivo de intentar dilucidar la localización subcelular de la proteína TbCdc34, se realizó otra construcción que sobreexpresa la proteína, esta vez con un epítopo C-terminal de proteína fluorescente azul claro (*Cerulean Fluorescent Protein*, CFP). El plásmido empleado fue el p2679 [72], igual al empleado para la fusión con 6xHA, pero en este caso con la secuencia codificante de CFP (ver figura R10). Este plásmido también es inducible con Tetraciclina. La secuencia codificante de TbCdc34 fue clonada en el plásmido de sobreexpresión en marco con la secuencia codificante de CFP. Se transfectaron parásitos procíclicos de la cepa 29-13 y una vez obtenido los clones estables de parásitos que contienen dicha construcción, se procedió a analizar la expresión de la proteína de fusión por Western blot luego de

su inducción por dos días en presencia de Tetraciclina en el medio de cultivo (Fig. R14A). Se pudo observar que la proteína de fusión se concentra en la región posterior de la célula, en una zona donde emerge el flagelo de la célula (Fig. R14B). Se conoce que el único flagelo de la célula se encuentra asociado al cuerpo basal del parásito, y emerge desde una invaginación de la membrana celular conocida como bolsillo flagelar [76]. A pesar de no haber podido obtener imágenes de TbCdc34-CFP junto con otros marcadores celulares, experimentos que se verán más adelante muestran que esta inferencia es plausible (ver sección *Epitope tagging endógeno de TbCdc34*).

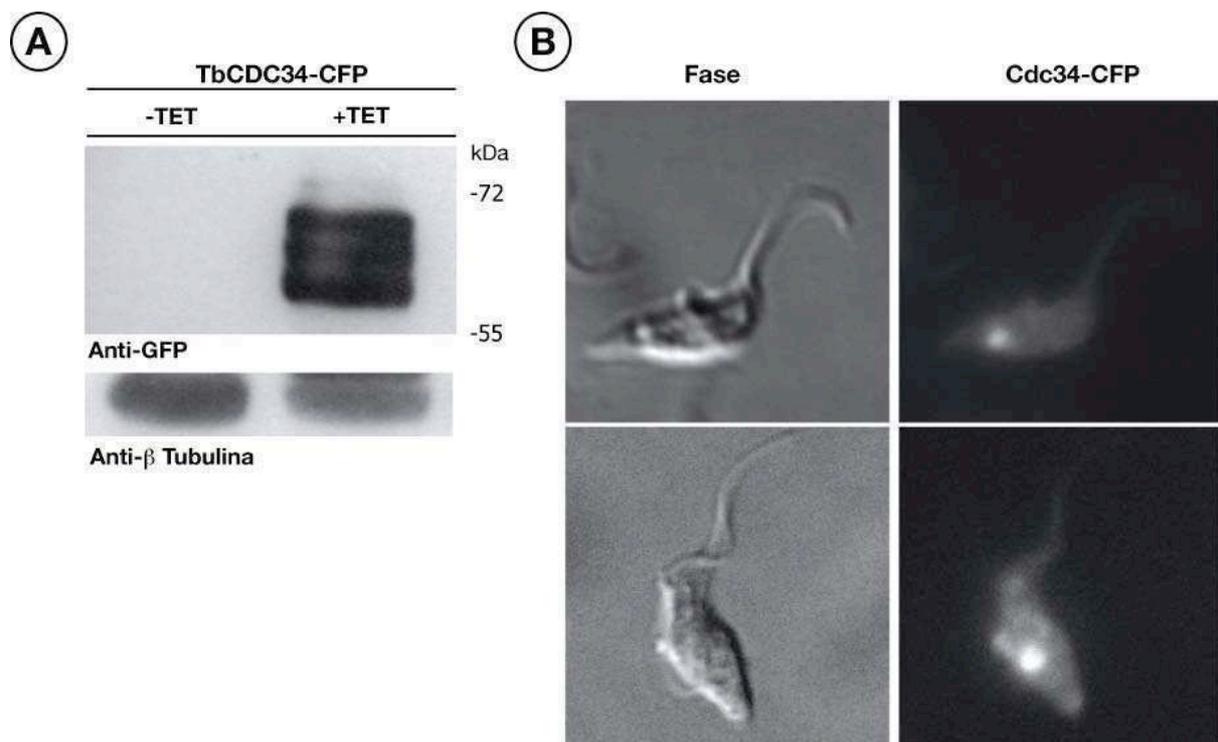


Figura R14 | **Sobreexpresión de TbCdc34-CFP en parásitos PCF de *T. brucei*.** A) Western blot de parásitos PCF no inducidos (-TET) o inducidos (+TET) con Tetraciclina (1µg/ml) revelados con el anticuerpo anti-GFP. La membrana fue revelada también con anti-β Tubulina como control de carga. B) Parásitos BSF 90-13 con la construcción p2477-TbCdc434-CFP se fijaron con paraformaldehído 4%.

### ***Etiquetado (Epitope Tagging) de TbCdc34***

Dado que TbCDC34 se encuentra representada en un único locus en *T. brucei*, se decidió desarrollar una línea de parásitos etiquetada de esta proteína (tag/+). Para ello se utilizó un plásmido diseñado para el marcado endógeno de genes de *T. brucei*, pEnt6b [72], el cual se modificó reemplazando uno de los epítopes por uno de 6 Hemaglutininas (6xHA) (Fig. R15). Para ello, se amplificó por PCR el epítope 6xHA y el extremo C-terminal de la secuencia génica de TbCdc34 usando como molde el plásmido utilizado previamente para sobreexpresarla (ver sección de sobreexpresiones). Luego, se amplificó la región 3'UTR del gen endógeno de TbCdc34 con primers específicos a partir de ADN genómico. El plásmido pEnt6b fue modificado de la siguiente manera: por restricción se eliminó el epítope original utilizando las enzimas SpeI y BamHI, y luego se insertó la porción final del gen + el epítope de seis HA; luego se digirió esta construcción con las enzimas HindIII y SpeI y se clonó el fragmento de 300 pb correspondientes al 3'UTR de TbCdc34. De esta manera se generó el vector modificado pEnt6b-TbCDC346xHA que nos permitió realizar la modificación del locus endógeno de este gen (Fig. R15B). Este plásmido contiene además la secuencia de blasticidin S deaminase (*BSD*) de *Streptomyces griseochromogenes*, que codifica para la resistencia a blasticidina. Con la construcción obtenida se transfectaron parásitos de la cepa 29-13 (procíclicos) y se seleccionaron para su integración por el agregado de la droga blasticidina al medio por aproximadamente 3 semanas.

Se logró obtener una línea celular con el epítope fusionado a TbCdc34 en su extremo C-terminal (+/-) en uno de los alelos del gen (línea celular heterocigota). La tasa de crecimiento de estos parásitos modificados fue similar al crecimiento de la línea parental (dato no mostrado). Se analizó la correcta expresión de la proteína endógena etiquetada mediante Western blot con el anticuerpo anti-HA (Fig. R16A). Se pudo observar que al igual que en la sobreexpresión de TbCdc34, además de la banda correspondiente a TbCdc34-6xHA, se revela en condiciones no reductoras otra banda de mayor peso molecular (Fig. R16A, -DTT).

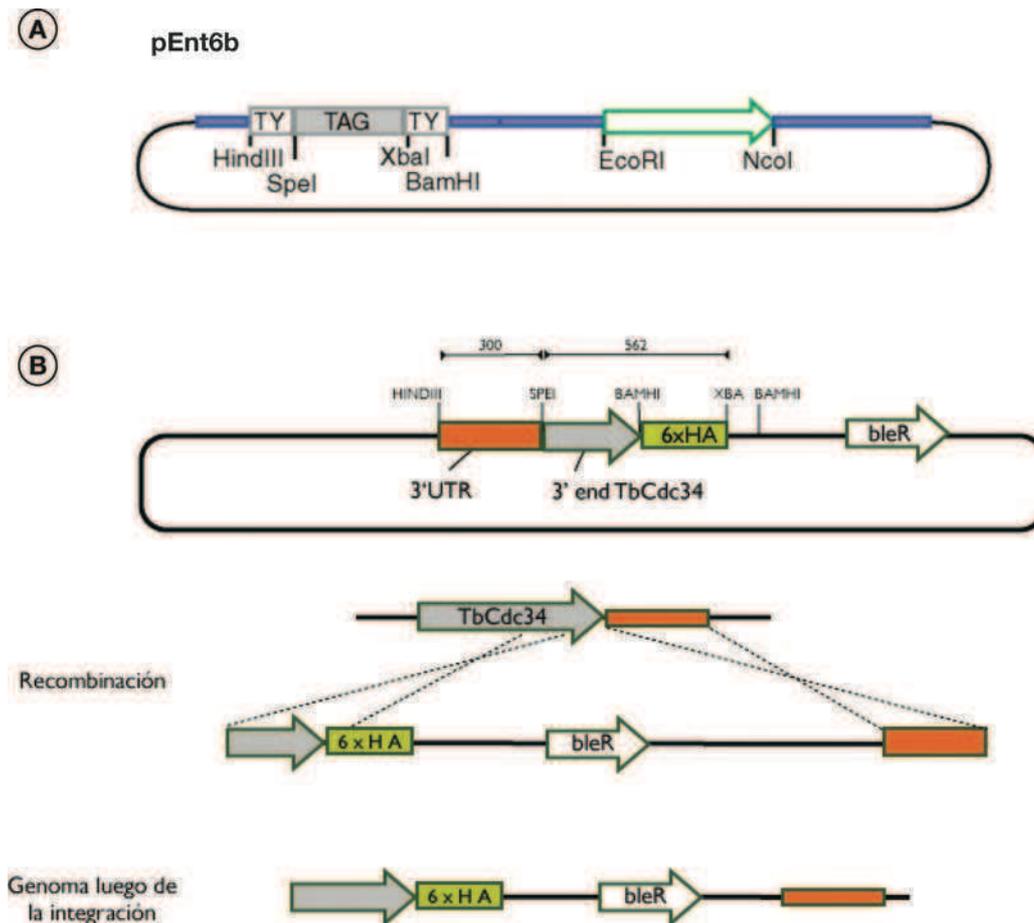


Figura R15 | Diagrama de la construcción utilizada para el etiquetado endógeno de TbCDC34. Vector pENT6B-G de etiquetado endógeno. Este vector permite adicionar una etiqueta (Tag) en el gen endógeno tanto en el extremo C- como en el N-terminal. B. Modificación realizada en el vector pENT6B-G en la cual se fusiona el extremo final del gen de TbCDC34 a un epítipo de 6xHA.

Para corroborar los resultados previos de la localización subcelular de TbCdc34, se utilizó el anticuerpo anti-HA en parásitos PCF fijados que expresan la proteína endógena de fusión. Las inmunofluorescencias permitieron detectar la proteína concentrada en una estructura adyacente al kinetoplasto, en parásitos que poseían la configuración 1N1K -fase G1/S-(Fig. R16B). Aparentemente, a partir del comienzo de la división del kinetoplasto, la señal de la proteína se aprecia en forma más difusa. En algunas células se observaron algunos puntos en la parte anterior de la célula. Este resultado es similar al observado al sobreexpresar TbCdc34 fusionado a CFP, lo cual indicaría que la proteína se localiza en una estructura cercana al kinetoplasto, posiblemente el cuerpo basal. Esta suposición no la hemos podido corroborar, dado que no nos fue posible utilizar un marcador específico de esta organela.

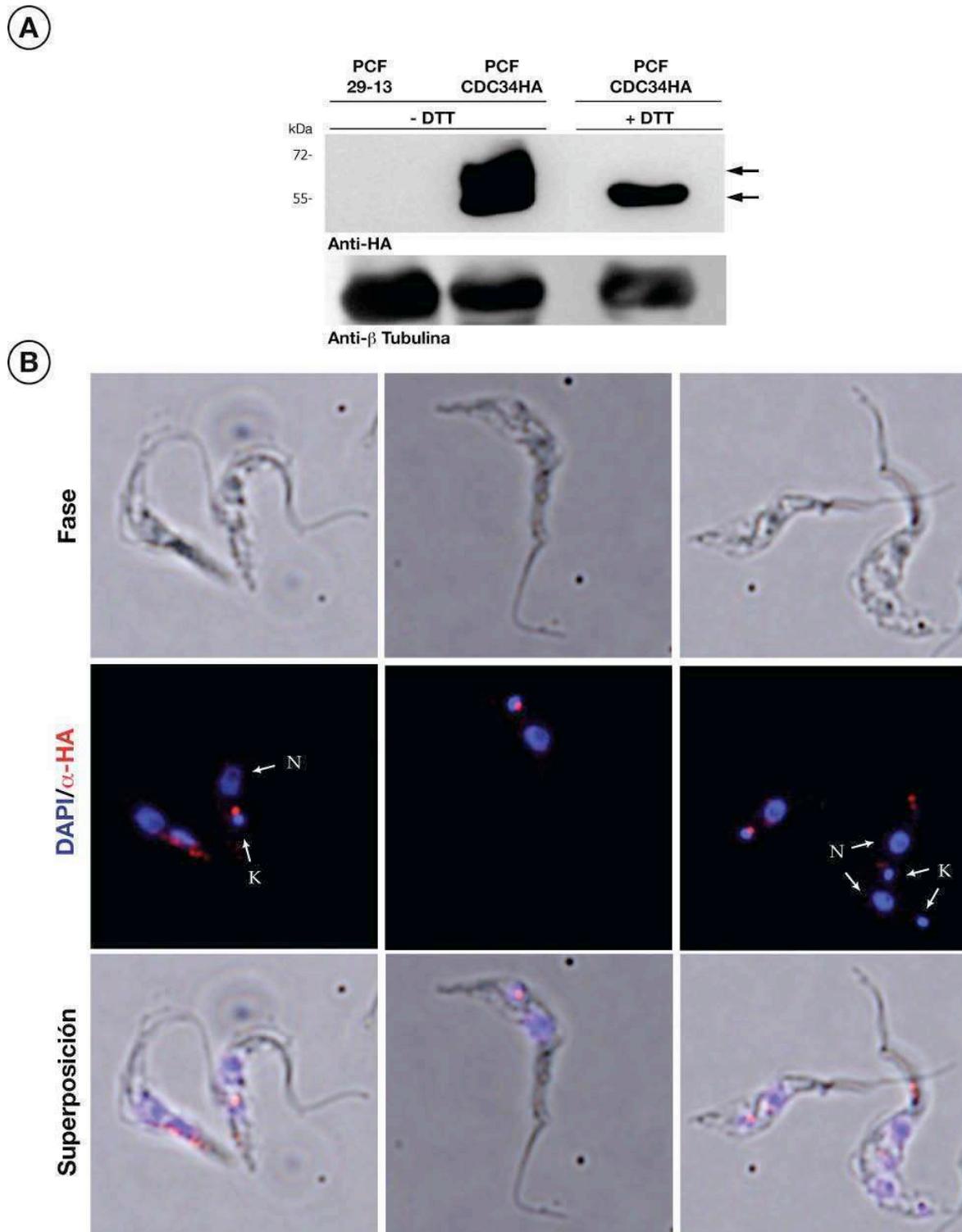


Figura R16 | **Localización subcelular de TbCdc34-6xHA en células PCF de *T. brucei*.** A) Western blot de la expresión de TbCdc34-6xHA (calle 2 y 3). Células de la línea parental 29-13 fueron utilizadas como control negativo (calle 1). Proteínas totales de  $5 \cdot 10^6$  parásitos fueron analizadas por Western blot con el anticuerpo anti-HA (arriba) o anti- $\beta$ -tubulina (abajo) como control de carga. Las proteínas totales fueron sembradas con buffer de siembra con (+DTT) o sin (-DTT) poder reductor. B) Inmunofluorescencia indirecta de TbCdc34-6xHA utilizando el anticuerpo anti-HA. Las células que expresan la proteína de fusión endógena fueron fijadas con paraformaldehído 4% y marcadas con el anticuerpo primario anti-HA y secundario anti-rabbit Alexa Fluor 546 (rojo) y DAPI (azul). N, *núcleo*; K, *kinetoplasto*

Posteriormente se investigó si los niveles de la proteína variaban de acuerdo con la fase del ciclo celular. Para ello se utilizó un método de sincronización desarrollado recientemente para células procíclicas de *T. brucei* [77]. Las células procíclicas que expresan TbCdc34-6xHA a niveles endógenos fueron cultivados toda la noche (12 horas) en presencia de 0.2 mM de hidroxurea. Los parásitos fueron lavados y se reinició el cultivo en ausencia de la droga. Se tomaron muestras cada dos horas para su análisis mediante FACS. A las 0 horas, la mayoría de las células se encontró en la fase S del ciclo celular (Fig. R17A). Luego de dos horas, las células alcanzaron el pico de la fase G2/M. Desde las cuatro a seis horas, hubo un cambio constante de las células desde la fase G2/M a fase G1.

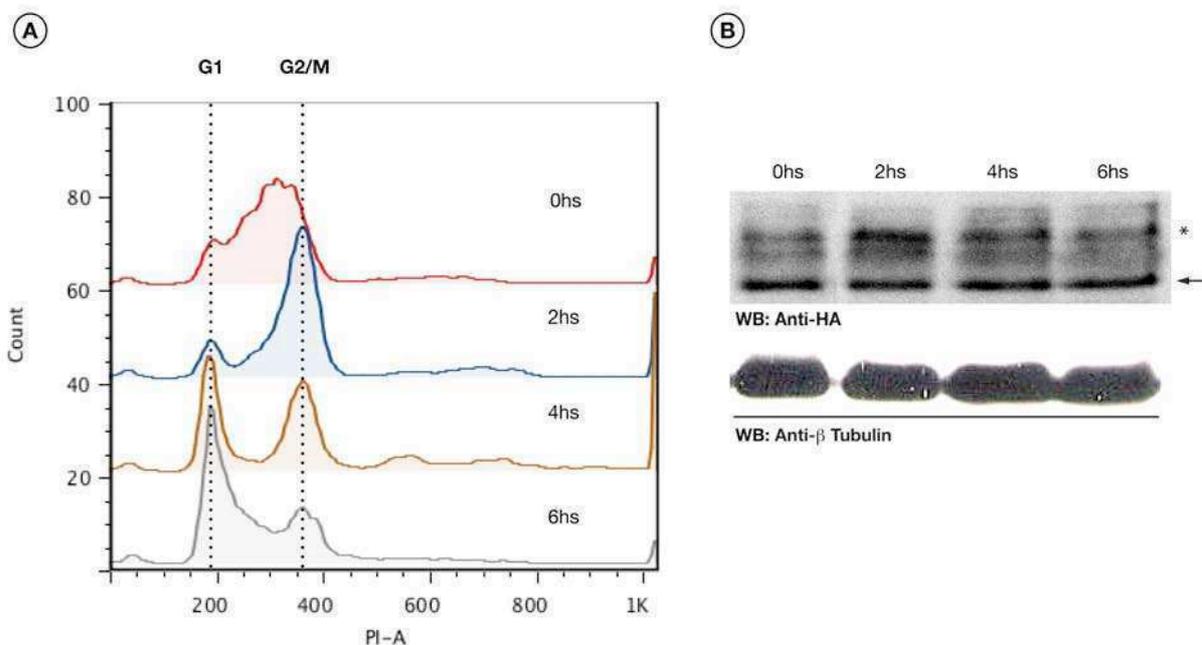


Figura R17 | Sincronización con hidroxurea (HU) de células PCF de *T. brucei* que expresan TbCdc34-6xHA endógena. Células PCF 29-13 con pENT6b-TbCdc34-6xHA fueron tratados por 12 hs con 0.2 mM HU, lavados dos veces con medio, y se tomaron muestras para análisis por FACS y Western blot. A) Histogramas generados por el programa Flowjo indican los resultados del cell sorting para el contenido de ADN. Las líneas punteadas indican los picos correspondientes a las fases del ciclo celular. B) Western blot de TbCdc34 en las diferentes muestras tomadas de la sincronización. Se sembraron un total de  $5 \times 10^6$  células en buffer de siembra sin DTT, se resolvieron en un SDS-PAGE 12% y se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa. La parte superior muestra el revelado con anti-HA y la parte inferior el control de carga con anti- $\beta$  Tubulina. La flecha indica la banda correspondiente al peso molecular de TbCdc34-6xHA, el asterisco indica la banda correspondiente a la misma proteína modificada. WB: Western blot

Para analizar la expresión de TbCdc34-6xHA a lo largo del ciclo celular, se analizó por Western blot los lisados proteicos de las células sincronizadas. Se observó que los niveles de la proteína no variaron a lo largo de las diferentes fases del ciclo celular (Fig.R17B - flecha), así como tampoco se evidenciaron diferencias significativas en la cantidad de proteína modificada (Fig.R16B - asterisco). Este resultado es similar al observado con la proteína Cdc34 de levaduras, en donde se determinó por Western blot que los niveles de la proteína se mantienen constantes en células arrestadas en las fases G1, S y M [78], y se mantienen constantes en células asincrónicas. Por lo tanto, no hay evidencia de que Cdc34 sea regulada por degradación, como ocurre en el caso de la enzima E2 Ubc7, la cual en determinadas condiciones es enviada a degradación por el proteasoma [79].

### ***TbCDC34 es esencial para la infección en ratones***

Para determinar si la ausencia de la proteína TbCdc34 inhibe la capacidad de los parásitos de generar una infección en un hospedador mamífero, se inocularon ratones de la cepa C3H/He con parásitos BSF de ARN interferencia de TbCdc34. Este tipo de estudio se ha realizado con el fin de establecer si una proteína determinada es un blanco potencial para desarrollo quimioterapéutico. La inducción del ARNi de diferentes proteínas de *T. brucei*, como por ejemplo el de TbRack1, no generan una infección en ratones [80], al igual que el ARNi contra la glicoproteína variante de superficie (VSG)[81] o la proteína de la bastón paraflagelar [82]. Un grupo de 5 ratones fue inoculado con la cepa parental del estadio sanguíneo de *T. brucei* 90-13, con la cual se generaron los parásitos transgénicos, para observar el progreso de infección en los ratones (Fig. R18). Otro grupo de 5 ratones fue inoculado con la cepa ARNi TbCdc34 y luego de generarse una infección de aprox.  $1 \times 10^7$  parásitos/ml, se les administró agua con Doxiciclina (1  $\mu$ g/ml). Esta droga induce la interferencia en el parásito al igual que la Tetraciclina, y al ser más estable en solución, permite su utilización en experimentos *in vivo*. Otro grupo de 5 ratones previamente inoculado fue utilizado como control y sólo se le administró agua. En los tiempos indicados se cuantificó la parasitemia en sangre periférica. En ratones a los que no se les sumi-

nistró Doxiciclina, se alcanzó una concentración de  $10^9$  parasitos/ml a las 96 horas, tiempo en el cual los ratones comenzaron a morir (Fig. R18, -Dox). En contraste, aquellos parásitos a los que se les suministro Doxiciclina, el número de parásitos en sangre cayó rápidamente, siendo indetectables a las 96 horas (Fig. R18, +Dox). La droga *per se* no modificó el número de parásitos en sangre de la cepa parental 90-13 (Fig.R18, *panel izq.*). Estos resultados indican que la proteína TbCdc34 es esencial tanto para la viabilidad del parásito sanguíneo en el modelo murino, así como para aquellos cultivados *in vitro*.

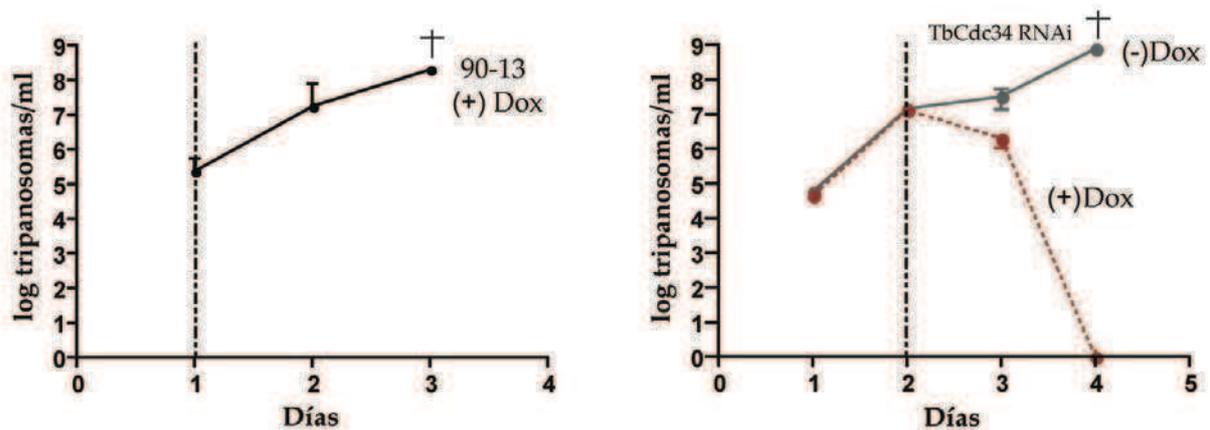


Figura R18 | TbCdc34 es esencial para generar una infección en ratones. La parasitemia en sangre periférica de ratones se analizó en los tiempos indicados, luego de la inoculación intraperitoneal de las formas sanguíneas de la cepa parental 90-13 (izq.) o de la cepa de ARNi de TbCdc34 (clon B2) (derecha). Las líneas punteadas verticales indican el momento en el cual se agregó Doxiciclina al agua de los animales seleccionados. El agregado de Doxiciclina a los ratones infectados con la línea celular de ARNi de TbCdc34 (+Dox, *panel derecho*) produce la eliminación de los tripanosomas en el día 4, mientras que al grupo que no se le suministró la droga, comenzaron a morir (-Dox, *panel derecho*). Los resultados son representativos de 4 experimentos. Las cruces indican que los ratones murieron dentro de las 24 horas del último recuento de parasitemia.

## BUSQUEDA DE SUSTRATOS DEL COMPLEJO SCF

### Electroforesis bidimensional diferencial en gel (2D-DIGE)

La electroforesis en dos dimensiones es un método capaz de estudiar la expresión global génica a nivel de proteínas. Sin embargo, la comparación de diferentes proteomas por la electroforesis bidimensional es complicada por la sustancial variación de gel a gel. La electroforesis bidimensional diferencial en gel (2D-DIGE) es una variación de la electroforesis bidimensional clásica en la cual las proteínas de hasta tres muestras distintas, antes de ser separadas, son marcadas con fluoróforos diferentes, espectralmente distinguibles. Las tres muestras son mezcladas y separadas en un único gel, reduciendo la variabilidad entre geles y mejorando la reproducibilidad y la capacidad de extraer información cuantitativa de los análisis. Así, este sistema permite la cuantificación estadística de pequeñas variaciones en los niveles de expresión de proteínas entre distintas muestras (Fig. R19).

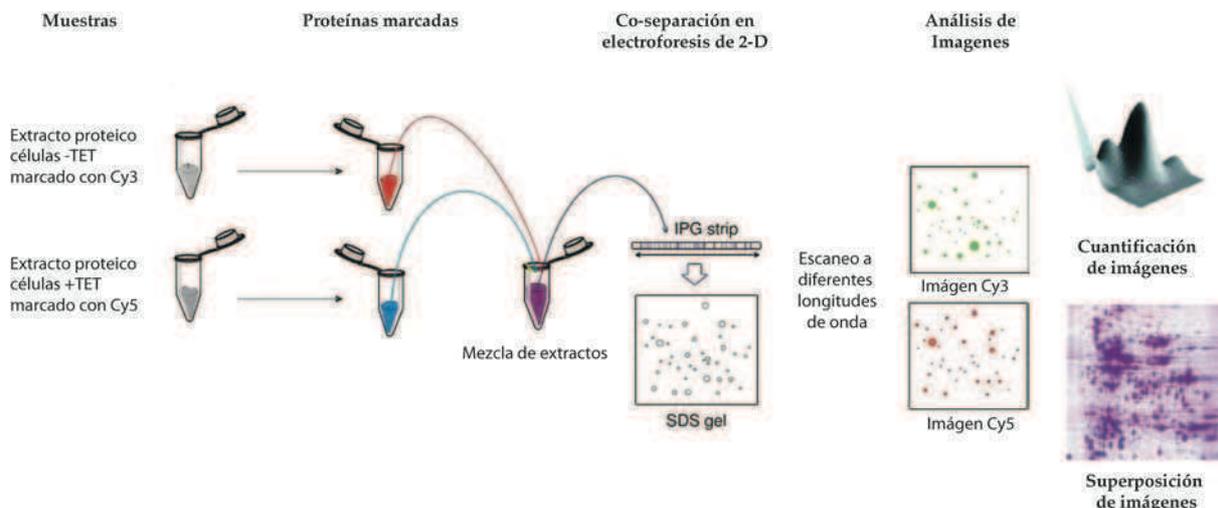


Figura R19 | Esquema simplificado que muestra los pasos utilizados en la Electroforesis bidimensional diferencial en gel (DIGE) para el análisis de la expresión de proteínas en células cultivadas en dos condiciones diferentes. Las muestras de proteínas son marcadas con Cy3 y Cy5, el análisis de las imágenes se realiza en el programa Decyder. Adaptado de Westermeyer R, Scheibe B. In Posch A. Ed. *Sample Preparation for 2D PAGE. Methods in Molecular Biology, Humana Press, Totowa, NJ (2007)*

Los colorantes CyDye DIGE consisten en 3 fluoróforos espectralmente resolubles (Cy2, Cy3 y Cy5) que coinciden en masa y carga. Los fluoróforos permiten detectar hasta 125 pg de proteína y dar una respuesta lineal a la concentración de proteína

de hasta cuatro órdenes de magnitud. En comparación, la tinción con plata detecta 1-60 ng de proteína con un rango dinámico menor a 100 veces. Los CyDye contienen un grupo reactivo N-hidroxisuccinimidil ester. Esto permite la marcación de residuos lisina dentro de las proteínas, formando una unión covalente con el grupo amino de dichos residuos [83]. La concentración de fluoróforo utilizada en una reacción de marcación de proteína asegura que éste sea limitante. Esto lleva a la marcación del 1-2% de los residuos lisina, y en consecuencia a sólo una pequeña porción de cada proteína en la muestra; por eso se lo denomina “marcación mínima”. El aminoácido lisina lleva una carga positiva, la cual, cuando el colorante CyDye se acopla, reemplaza la única carga de la lisina con la suya asegurando que el punto isoeléctrico de la proteína no cambie. Cuando se acopla a la proteína, el fluoróforo le agrega aproximadamente 500 Da a la masa de la proteína. Esto produce que las proteínas marcadas tengan una reducción en su migración en el gel con respecto a las no marcadas. Para asegurar que la mayoría de las proteínas no marcadas sean escogidas y que haya suficiente proteína para su análisis por espectroscopia de masa, el gel es teñido posteriormente para proteínas totales, por ejemplo con el colorante Sypro Ruby. La imagen del gel resultante es emparejado con el conjunto de imágenes escaneadas en la longitud de onda de los fluoróforos con el programa de análisis diferencial 2D Decyder. De esta manera se identifican los *spots* diferenciales y se eligen cuales serán recortados para su identificación por espectroscopía de masa.

Dado que se demostró que las proteínas del complejo SCF están involucradas en el control de ciclo celular, nos preguntamos cuales serían los posibles sustratos de este complejo. Si realmente estas proteínas se encuentran involucradas en la ubiquitinación de proteínas reguladoras del ciclo celular, la ubiquitinación de estas estaría impedida en las líneas de ARNi, y por lo tanto, no estarían siendo degradadas por el proteasoma 26S. De esta forma, si comparamos extractos proteicos de células inducidas contra no inducidas, en teoría sería posible identificar cuáles no están siendo degradadas, y por lo tanto, ubiquitinadas. Con este fin, aplicamos la tecnología 2D-DIGE para comparar los niveles globales de proteínas del ARNi de TbSkp1 en el estadio procíclico, y en el estadio sanguíneo, para células inducidas del RNAi de TbCdc34.

### 2D-DIGE del ARNi de TbSkp1

Para el análisis de los extractos proteicos del ARNi de TbSkp1 en células PCF, se decidió estudiar dos tiempos diferentes después de la inducción del ARNi; para eso se extrajeron proteínas del día 4 y día 6 después del agregado de Tetraciclina. Los gels resultantes fueron analizados usando el programa DeCyder. El análisis del gel correspondiente al día 4 no mostró ningún *spot* diferencial entre el extracto inducido contra el no inducido (no se muestra). Sin embargo, al comparar los extractos proteicos del día 6, pudimos encontrar diferencias de hasta dos magnitudes en 57 *spots* (Fig. R20). Estos 57 *spots* fueron secuenciados mediante MALDI-TOF y se pudieron identificar 39 proteínas. Varios de los *spots* correspondían a la misma proteína, lo que se interpreta como variaciones en la abundancia de una misma proteína modificada post-traduccionalmente. Es posible que la depleción de TbSkp1 provoque un cambio en las modificaciones post-traduccionales de una proteína, modificando la movilidad de las proteínas en una o ambas dimensiones del gel. A continuación se presentan algunas de las proteínas identificadas en este estudio y sus funciones conocidas:

n° de acceso	Nombre	razón inducido/ no inducido	
Tb11.01.1290	14-3-3-like protein	+1,9	
Tb11.01.3180	Activated protein kinase C receptor homolog (Track)	-1,97	
Tb10.70.3410	Protein kinase Spk1 (MAP kinase spk1)	+1,2	
Tb927.1.2360	alpha tubulin	+1,97	Citoesqueleto
Tb927.1.2350	beta tubulin	+1,8	
Tb10.70.5680	EF-1-alpha	+1,78	Traducción Folding Respuesta a estres
Tb09.211.1690	Telomerase-binding protein p23 (Hsp90 co-chaperone)	+1,8	
Tb927.6.3750	Heat shock 70 kDa protein	+1,5	
Tb10.70.0280	Chaperonin Hsp60, mitochondrial precursor	+1,6	
Tb927.2.5160	Chaperone protein DnaJ	+1,65	
Tb10.70.6920	Intraflagellar transport protein IFT172 (WD40)	+1,7	F-box?
Tb10.70.7300	Hypothetical protein, conserved (WD40)	+1,6	

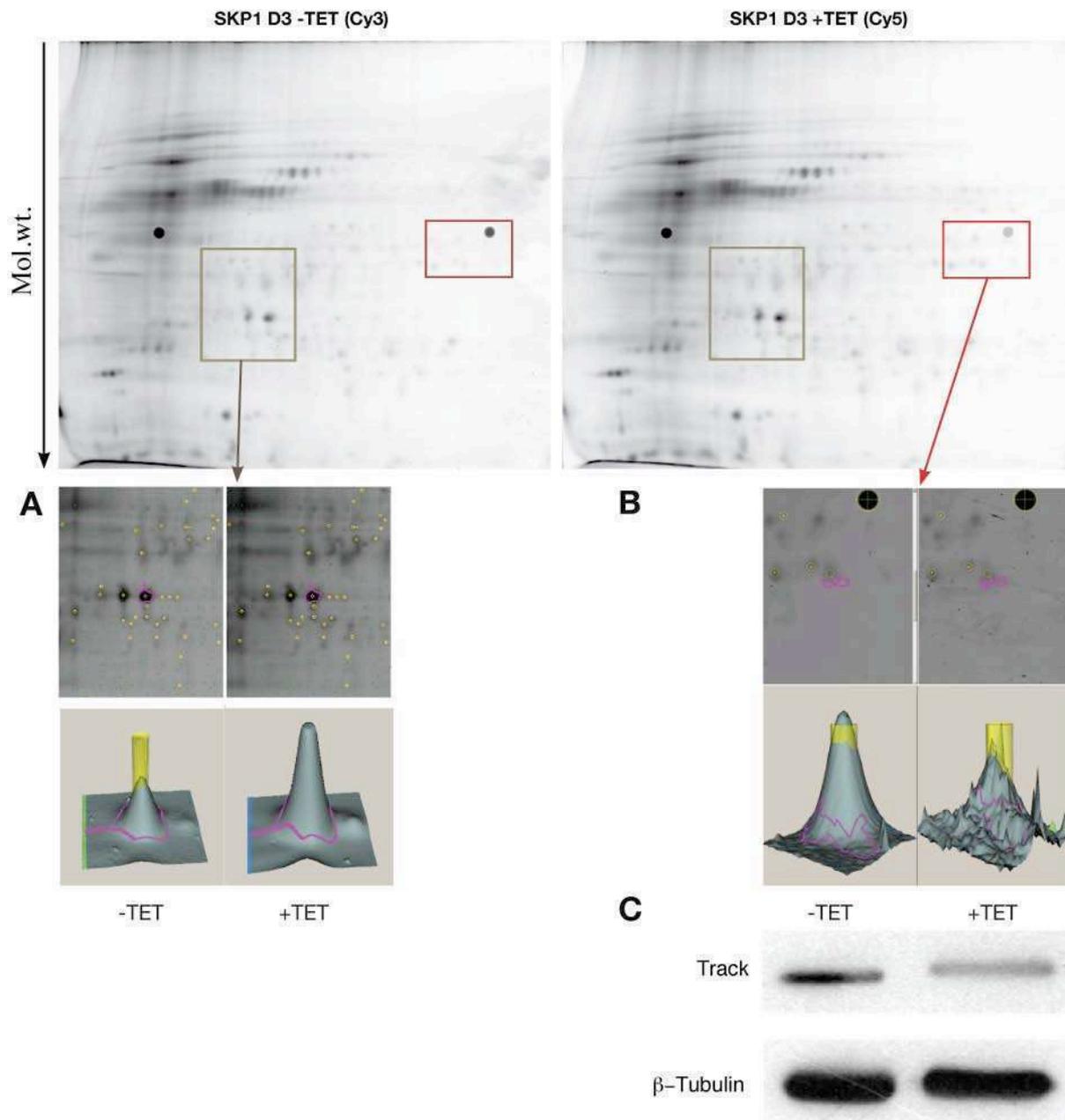


Figura R20 | **Análisis de DIGE del ARNi de TbSKP1.** Análisis de DIGE de TbSKP1-ARNi (D3) del estadio procíclico utilizando tiras de pH en el rango 4-7. Extractos proteicos de células sin inducir (-tet) e inducidas (+tet) fueron marcados con Cy3 and Cy5, respectivamente. Los geles fueron analizados utilizando el programa Decyder (GE Healthcare), que fue utilizado para analizar las diferencias de los spots. El panel superior muestra el gel teñido con Sypro Orange. El panel A muestra el *spot* correspondiente a EF-1 alpha (Tb10.70.5680) y el panel B el *spot* correspondiente a TbTrack (Tb11.01.3180), ambos identificados por MALDI-TOF. Panel C) Western blot corroborando la disminución de la proteína TbTrack luego de la inducción del ARNi de TbSkp1 (anticuerpo gentilmente cedido por el Dr. Larry Ruben, Southern Methodist University, USA). Como control de carga se utilizó el anticuerpo anti- $\beta$ -Tubulina.

Los resultados obtenidos mostraron variaciones en la abundancia de varias proteínas que se sabe están involucradas en la regulación del ciclo celular de *T. brucei*.

Por ejemplo, la proteína similar a 14-3-3 (Tb11.01.1290), ha sido vinculada con la regulación del ciclo celular tanto en PCF como en BSF [84]. El ARNi de esta proteína mostró defectos en la citoquinesis y mitosis. En el caso de TbRACK (Tb11.01.3180), un homólogo del receptor de proteína quinasa C activada (RACK), el ARNi en células PCF y BSF mostró que TbRACK es esencial para el ingreso del surco que posibilita la citoquinesis (en PCF) y para la citoquinesis en si (en BSF)[80]. Para corroborar los resultados obtenidos, realizamos un SDS-PAGE de una dimensión con extractos proteicos del ARNi de TbSKP1. Por Western blot se demostró la disminución en la abundancia de TbRACK en el extracto de células depletadas de TbSKP1. Para ello se utilizó el anticuerpo específico contra TbRACK, el cual fue cedido gentilmente por el Dr. Ruben [80]. Se demostró que los niveles de TbRACK se encuentran disminuidos aproximadamente 2 veces en el extracto de parásitos que carecen de TbSkp1, como se esperaba en vista del resultado del DIGE (Fig. R20B y C). El resto de las proteínas identificadas no pudo ser corroborado dada la carencia de anticuerpos. Hasta el momento no se pudo determinar si alguna de estas proteínas se encuentra ubiquitinada en extractos proteicos del parásito y cual es la relación entre TbSkp1 y cada una de ellas.

### **2D-DIGE del ARNi de TbCdc34**

Una vez concluido el análisis de las diferencias en los extractos del ARNi de TbSkp1, nos planteamos un estudio similar en el ARNi de TbCdc34 en BSF, en donde el fenotipo observado fue más extremo que para el caso de TbSkp1. Dado que se logró obtener líneas estables sólo en el estadio sanguíneo para el ARNi de TbCdc34, fue necesario poner a punto la extracción de proteínas y las condiciones de las corridas bidimensionales, ya que hasta ese momento no se había logrado una buena resolución de las proteínas en ese estadio. Existían publicaciones donde se habían realizado separaciones bidimensionales de extractos proteicos de células de estadios sanguíneos, tanto en *T. brucei* [85], como en *Leishmania* [86], pero las condiciones utilizadas eran incompatibles con los requerimientos necesarios para la marcación por CyDye's. Aunque resulte extraño, las condiciones de corrida son muy diferentes a los utilizados para el estadio procíclico (desde el buffer de extracción de proteínas hasta el tiempo y voltaje utilizado para la primera dimensión). Una vez re-

suelto este problema, se pudo realizar un análisis de las diferencias a nivel global de las proteínas en los extractos inducidos *versus* no inducidos del ARNi de TbCdc34. Para ello se indujo el ARNi de TbCdc34 y se tomaron muestras para la extracción de proteínas a las 8 horas post-inducción.

La figura R21A muestra los perfiles de proteínas expresadas en los parásitos 90-13 inducidos o no inducidos para el ARNi de TbCdc34, separadas por un gradiente de isoelectroenfoque de rango de pH 4-7 (tira de 18cm) y resueltas en un gel de poliacrilamida 12%. El análisis del gel permitió detectar 6021 spots mediante la tinción con los CyDye (Fig. R21B). El gel resultante se analizó con el programa Decyder y se seleccionaron *spots* con una diferencia de volumen mayor a 2,5 veces. Se obtuvo como resultado 70 *spots* disminuidos en el extracto de ARNi de TbCdc34 (1.2% de las proteínas totales) y 73 *spots* aumentados. Estos *spots* fueron recortados del gel mediante una estación robótica Ettan Spot Handling Workstation (Amersham Biosciences), digeridos con Tripsina y secuenciados, pudiéndose identificar solamente 4 proteínas. Este bajo número de proteínas identificadas, y a su vez con un bajo porcentaje de confiabilidad, se pudo deber a: 1) poca cantidad de proteína presente en cada uno de los *spots* (no siempre la señal que uno observa con los Dyes se correlaciona con cantidad de proteína) o 2) la composición del buffer de extracción de proteínas puede afectar la generación de péptidos para su identificación por MALDI-TOF. En la siguiente tabla se muestran las proteínas identificadas que presentan variaciones en el extracto de parásitos del ARNi de TbCdc34:

n° de acceso	Nombre	
Tb11.01.5790	<b>ubiquitin-conjugating enzyme E2, TbCdc34</b>	<b>Disminuida</b>
Tb927.7.6310	<b>PLK polo-like protein kinase</b>	<b>Aumentada</b>
Tb927.1.2350	<b>beta tubulin</b>	<b>Aumentada</b>
Tb10.70.0960	<b>NEK family, HsNEK1-like</b>	<b>Aumentada</b>

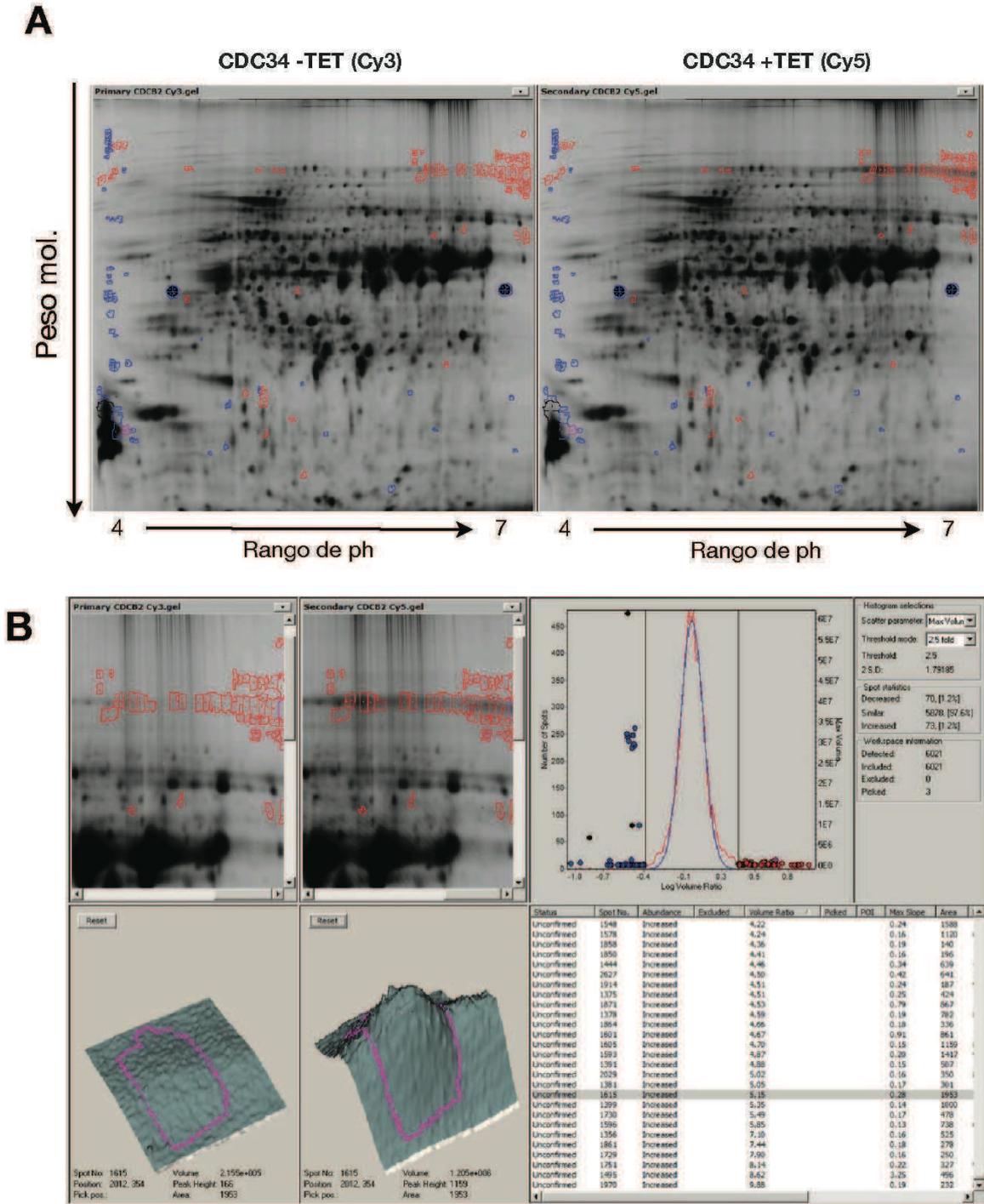


Figura R21 | Análisis de DIGE del ARNi de TbCdc34. Análisis de DIGE en dos dimensiones de TbCdc34-ARNi (clon B2) del estadio sanguíneo utilizando tiras de pH en el rango 4-7. Extractos proteicos de células no inducidas (-tet) e inducidas (+tet) fueron marcados con Cy3 y Cy5, respectivamente. Los gels fueron analizados utilizando el programa Decyder (GE Healthcare) para analizar las diferencias de los spots y seleccionarlos para su posterior identificación por espectroscopía de masa.

Es interesante notar que dos de estas proteínas están involucradas directamente con la regulación del ciclo celular de *T. brucei*; en primer lugar TbCdc34, que fue interferida y PLK [69,87,88]. A su vez, aunque aún no estudiada, se identificó la proteína similar a la NEK1 (NIMA (*Never in Mitosis gene A-related kinase 1*) de humanos), la cual se le han asignado funciones en el ciclo celular [89] y citoesqueleto [90]. Sin embargo, aún no se ha podido determinar si estas proteínas son sustratos directos de TbCdc34 o bien, si modifican sus niveles en la célula por la alteración indirecta de alguna vía de señalización.

# ***DISCUSIÓN***

## ***Discusión***

El ciclo celular es una secuencia de eventos de transducción de señales que ocurren cuando una célula se divide en dos células hijas, consistiendo en periodos de crecimiento, replicación del ADN, mitosis nuclear y citocinesis. Cada evento se encuentra estrictamente acoplado al paso previo y subsiguiente. Dentro de cada célula, una maquinaria de control asegura que cada uno de los eventos ocurra en el momento indicado, en el orden correcto y solo una vez por ciclo celular. Las vías que controlan la progresión del ciclo celular son necesariamente complejas, con varios bucles de retroalimentación y puntos de control para prevenir la prematura o inapropiada progresión a la siguiente etapa.

Dos modificaciones post-traduccionales gobiernan muchos de los procesos regulatorios dentro del control del ciclo celular: la fosforilación y la proteólisis mediada por ubiquitinación. La fosforilación es controlada por quinasas y fosfatasas y puede activar o inactivar sustratos o enviarlos a su degradación. La ubiquitinación es catalizada por complejos multiprotéicos, como el complejo promotor de la anafase (APC/C) o el complejo SKP1-Cullin-F-box (SCF), que marcan a sus sustratos para degradación por el proteasoma. Estos dos procesos están interconectados durante la regulación del ciclo celular, donde la ubiquitinación es dependiente de la previa fosforilación (de los sustratos o de las propias subunidades del APC) y la degradación proteolítica controlando la actividad de quinasas [91,92].

El ciclo celular de los tripanosomas tiene varios aspectos interesantes, ya que la regulación del mismo difiere en los diferentes estadios del ciclo de vida, la mitosis y la citocinesis parecen estar reguladas separadamente, y muchos de los reguladores del ciclo celular eucariota no están conservados o se encuentran ausentes [17]. En algunos casos, la división celular es aún más compleja en los parásitos que en su hospedador. Los Tripanosomátidos deben coordinar otros eventos del ciclo celular con la replicación y segregación de sus organelas únicas, que incluyen el cuerpo basal, flagelo, Golgi y kinetoplasto. A su vez, estos poseen dos fases S diferentes que deben ser coordinadas; una para el ADN mitocondrial contenido en el kinetoplasto y la otra para el ADN nuclear [15]. Estas importantes diferencias implican que los mecanismos que regulan el ciclo celular de parásitos deben diverger significativamente de sus contrapartes mamíferas.

Rbx1 es una proteína esencial de los complejos E3 ligasas SCF y VHL (von Hippel-Lindau) que interactúa con diferentes proteínas Cullin y enzimas conjugadoras de ubiquitina E2 para catalizar la polimerización de ubiquitina de diversos sustratos [62,93]. La proteína Rbx1 comprende un dominio RING-H2 *finger*, rico en Cys que coordina la unión de dos iones zinc alternando entre residuos Cys e His. [38]. Las cepas mutantes *rbx1* en levaduras exhiben un fenotipo multibrotes (*multibudded*) y son deficientes en la degradación de las ciclina Cln2 y el inhibidor de CDKs Sic1 [94]. Los homólogos de Rbx1 de Tripanosomátidos poseen el dominio RING-H2 muy conservado, con todas los residuos Cys e His necesarios para la unión de los átomos de zinc. La depleción del mensajero de TbRbx1 por ARNi afectó el crecimiento de los parásitos en el estadio procíclico, no así en el estadio sanguíneo. Luego de cuatro días de inducción del ARNi en las células PCF 29-13, el número de parásitos en cultivo disminuyó. Esto evidencia que la proteína es esencial para la división de los parásitos. Se pudo observar una disminución marcada de la población de células en G1 en el día 5 *post* inducción, acompañada de un aumento de células en fase S, sin que se modifique el porcentaje de células en la fase G2/M; esto indica que la desregulación en el ciclo celular de los parásitos está ocurriendo en algún momento de la fase S, punto en el cual la síntesis o segregación del ADN se detiene. De los estudios morfológicos realizados se pudo concluir que TbRbx1 está vinculada de alguna manera en la división del ADN mitocondrial, dado que el fenotipo observado en esta línea celular mostró un aumento en el número de células sin kinetoplasto. A pesar de que los parásitos no mantienen un dosaje de ADN mitocondrial, la división celular sigue adelante, dando como resultado células hijas con núcleo y kinetoplasto (1N1K), con núcleo sin kinetoplasto (1N0K) o sin núcleo con kinetoplasto (0N1K). A este último tipo celular se la conoce con el nombre de zoides. Por lo tanto, TbRbx1 estaría cumpliendo su función dentro de la replicación de ADN del kinetoplasto (kADN), de forma independiente a la síntesis o replicación de ADN nuclear. Este fenotipo ha sido observado en el ARNi de la ADN polimerasa mitocondrial de *T. brucei* (POLID) [95], en donde los fenotipos son similares. Un análisis más profundo de esta línea celular mostró redes anormales del ADN del kinetoplasto, y luego de ocho días de inducción, la desaparición completa de las mismas.

Por su parte, en *Caenorhabditis elegans*, Rbx1 es esencial para la progresión del ciclo celular y el metabolismo cromosómico; la depleción de Rbx1 por ARNi causa

defectos en meiosis, condensación mitótica cromosómica y segregación, y citoquinesis [96].

La primera cullina reportada, cul-1, fue identificada en nematodos como un gen necesario para las transiciones del desarrollo de la fase G1 del ciclo celular a la fase quiescente G<sub>0</sub> [97]. La mutante *cdc53<sup>ts</sup>* (Cullin1 de levaduras) fue identificada en una búsqueda de fenotipos similares a los observados a la mutante *cdc34<sup>ts</sup>* (ver más adelante). También se observó que Cdc53 era capaz de co-precipitar con Cdc34. Independientemente, Cdc53 fue identificada como una proteína que co-purificaba con la ciclina Cln2. Estos autores demostraron que Cdc53 se unía a Cln2 y que las mutantes *cdc53<sup>ts</sup>* no eran capaces de degradar a la ciclina [98]. En nuestro estudio, la ausencia de fenotipo en el ARNi de la subunidad Cullin1 del SCF en *T. brucei* puede ser atribuido al hecho de que existen varios genes de la misma familia en el genoma de parásitos. En células humanas se expresan siete cullinas diferentes (CUL1, 2, 3, 4A, 4B, 5 y 7) las cuales nucleon una ubiquitina ligasa [99]. Un gran número de evidencias indican que las cullinas comparten la misma arquitectura modular. Mientras que el dominio N-terminal de Cullin1 ancla los sustratos del SCF uniéndose al adaptador Skp1, los extremos N-terminal de Cul2 y Cul3 reclutan sustratos al unirse a las proteínas estructuralmente similares a Skp1, Elongin C y BTB, respectivamente [62]. Así como el genoma humano posee genes de la familia de las cullinas, se identificó en el genoma de *T. brucei* al menos seis genes con dominios CH (*cullin homology*) (**Tb927.8.5970** - Cullin1; **Tb927.10.7490** - similitud con Cullin2; **Tb927.3.1290** - Cullin4b; **Tb927.8.5210** - similar a Cullin3; **Tb927.10.6930** y **Tb10.v4.0249** - sin similitud a alguna Cullina en especial). Teniendo en cuenta estos datos, sería posible que la ausencia de Cullin1 en las células pueda ser compensada por alguna otra proteína de la familia. Otra posibilidad es que el ARNi no haya sido efectivo en la degradación del mensajero, y los niveles que se mantienen sean suficientes para la síntesis de la proteína. Para resolver esto, se necesitará realizar un nuevo ARNi contra una región diferente del mensajero hasta lograr una degradación más eficiente o realizar un *knock out* del gen.

El ARNi de TbSkp1 dio como resultado un arresto de las células en la transición G1/S tanto en el estadio procíclico como en el estadio sanguíneo. Corroborando es-

ta conclusión, se observaron células cuyo ADNk se encontraba en forma de “media-luna”, indicando que su segregación se detuvo. Esta división ocurre normalmente en células en fase S del kinetoplasto o G1/S del núcleo, ya que existe un pequeño retraso en el comienzo de la replicación del núcleo con respecto a la del kinetoplasto [1]. Este inicia su replicación antes que el núcleo y a su vez es más corta, y consecuentemente su segregación ocurre antes del comienzo de la mitosis nuclear. A su vez, esta observación concuerda con las funciones conocidas de esta proteína formando parte del complejo SCF en *H. sapiens* y *S. cerevisiae* [70,100,101,102]. En *S. cerevisiae*, las mutantes *skp1-11* se arrestan en G1 con contenido de ADN 1C, indicando que Skp1 es requerida para la entrada en la fase S. A diferencia de *skp1-11*, las mutantes *skp1-12* muestran arresto en las fases G1 y G2. Estos resultados indicaron que Skp1 también es requerida para la transición hacia la Mitosis [70]. Recientemente se reportó que el ARNi de TbSkp1 produce un bloqueo de las células en G2/M en el estadio sanguíneo de *T. brucei* [103]. El nivel de inhibición del ARN mensajero de TbSkp1 en este trabajo podría explicar las discrepancias entre nuestro análisis y el de Benz y Clayton [103]. En nuestro caso utilizando un vector de ARNi diferente al empleado por ellos, se obtuvo un 80% de degradación del mensajero (determinado por qRT-PCR), mientras que la interferencia obtenida en su trabajo fue menor (aprox. un 40%). Nuestros resultados muestran un fenotipo similar en ambos estadios del ciclo de vida de *T. brucei* como consecuencia del ARNi de TbSkp1, indicando que esta proteína estaría cumpliendo la misma función en ambos estadios. Sin embargo, no podemos descartar que TbSkp1 pueda tener una función específica en ambos puntos de control del ciclo celular (G1/S y G2/M), como ocurre en levaduras, y el nivel de interferencia de la proteína en la célula evidencie diferentes fenotipos. De hecho, el complejo SCF actúa en diferentes fases del ciclo celular gracias a la utilización de diferentes proteínas F-box capaces de reconocer diferentes sustratos fosforilados [102].

Las enzimas conjugadoras de ubiquitina (E2) constituyen una familia de proteínas que participan en un paso intermediario o final de la ubiquitinación del sustrato de los complejos E3. Cdc34 es una de las 10 enzimas conjugadoras de ubiquitina conocidas en *S. cerevisiae*. La función más estudiada de Cdc34/Ubc3 es la regulación en la transición de G1/S. En esta levadura, Cdc34 es requerida para la proteólisis de

los inhibidores de CDK Sic1 y la resultante activación de los complejos ciclina/CDK que catalizan la entrada a la fase S [104]. El silenciamiento del mensajero de TbCdc34 reveló una función importante en el crecimiento de los tripanosomas del estadio sanguíneo. A pesar de varios intentos utilizando diferentes plásmidos (pZJM, p2T7-177), no fue posible lograr líneas estables de parásitos para la interferencia en el estadio procíclico. El estudio de la interferencia de TbCdc34 en el estadio sanguíneo mostró una baja en el número de células con la configuración 1N1K y un aumento de células con 2N2K y XNXK ( $X > a 2$ ), indicando un arresto del ciclo celular en un estado de pre-citoquinesis. A pesar de que estos parásitos no pudieron completar la citoquinesis, reiniciaron la replicación del ADN del kinetoplasto y del núcleo, lo que generó la acumulación de células con una configuración XNXK y un surco en formación. Este fenotipo es similar al obtenido en el ARNi en el estadio sanguíneo de *T. brucei* de la proteína MOB1 [68] y la quinasa similar a Polo (PLK) [69,105], que producen una desregulación del ciclo celular debido a la falla en completar la citoquinesis y una consecuente re-replicación del núcleo y kinetoplasto.

En el estadio sanguíneo de *T. brucei*, la inhibición de mitosis frena la citoquinesis, no así la re-replicación del ADN nuclear y del kinetoplasto. A su vez, la citoquinesis es inhibida por defectos en la duplicación del cuerpo basal, del flagelo o del Golgi, eventos que ocurren tempranamente en el ciclo celular [20]. Por otro lado, el ARNi de PLK demostró que esta proteína es necesaria para la iniciación de la citoquinesis, y en la duplicación del cuerpo basal [69]. Dado que en nuestro estudio no realizamos en los parásitos silenciados para TbCdc34 un análisis del contenido de cuerpos basales, solo podemos concluir que el silenciamiento de la proteína TbCdc34 frena la citoquinesis en el estadio sanguíneo de *T. brucei*. ¿Este fenotipo es debido a un freno en el proceso mismo de citoquinesis o a una falla en la duplicación del cuerpo basal o del Golgi? Con los análisis realizados sobre los parásitos interferidos no podemos contestar esta pregunta, pero el análisis de la localización de la proteína tal vez pueda dar algún aporte que nos acerque a responderla.

En células de mamíferos, se demostró que Cdc34 se localiza en estructuras punteadas en células en interfase, predominantemente en el núcleo, y en células en mitosis es reclutada al huso mitótico al comienzo de la anafase [106]. En cambio, tanto la sobreexpresión de la proteína TbCdc34 fusionada a CFP como la inmunofluores-

cencia de la proteína etiquetada endógenamente, mostraron una localización puntual próxima al kinetoplasto. Esta señal definida se observó en algunas células que se encontraban en la fase G1 del ciclo celular (1N1K); sin embargo, la señal aparece más difusa cuando el kinetoplasto comienza a dividirse. Los estudios de la localización subcelular de PLK en *T. brucei* muestran que esta proteína se encuentra asociada al Golgi en la primera fase del ciclo celular (1N1K), y que a medida que las células avanzan en su duplicación, ésta va progresando junto con la zona de unión al flagelo (FAZ) [88], que es el punto donde el flagelo se adhiere al cuerpo celular. En *T. brucei*, el nuevo Golgi se ensambla a una distancia fija del viejo, y esta distancia parece estar determinada por una estructura bilobulada [107]. Un lóbulo de esta estructura está asociada con el viejo Golgi, y el otro al nuevo, señalizando la posición del crecimiento. En un trabajo reciente, se le asignó otra función a PLK de *T. brucei* en la biogénesis del bilóbulo, que a su vez afecta la biogénesis del Golgi [87]. La localización de esta PLK coincide con la observada en esta tesis para TbCdc34: una señal puntual próxima al kinetoplasto que se observa en algunas células con la configuración 1N1K, que luego se torna más difusa y comienza a moverse hacia el extremo anterior de la célula en contacto con el flagelo. Teniendo en cuenta los datos bibliográficos y nuestras observaciones, es posible que TbCdc34 se localice en esta estructura bilobulada y esté involucrada en el control de la biogénesis del Golgi. Un estudio más detallado de la cepa de ARNi de TbCdc34 podrá aclarar si en ausencia de la proteína ocurren cambios en la duplicación de esta organela.

La proteína ScCdc34 de levaduras contiene un dominio N-terminal de 170 aminoácidos que se encuentra conservado dentro de las proteínas E2. Este dominio aparentemente es suficiente para la formación de complejo E2-Ub, ya que las E2 más pequeñas están compuestas casi exclusivamente de este dominio [76]. En la proteína ScCdc34, este dominio posee una inserción de 11 residuos cerca de la Cys aceptora de la ubiquitina. Se demostró que la generación de una doble mutante de la Cys aceptora de la ubiquitina y la Lys contigua inhibe la función de Cdc34 en el ciclo celular [73]. A su vez, la S97 de ScCdc34 (S95 en humanos) es esencial para la viabilidad celular [57] y es requerida para la interacción entre monómeros de la E2 o el ensamblaje de cadenas de poliubiquitina [108]. El homólogo de *T. brucei* posee estos residuos esenciales cerca de la Cys aceptora, así como la inserción característica de 11 residuos cercanos al sitio activo. La sobreexpresión de la proteína *wt* o

de una versión doble mutante de la Cys aceptora (C84S) y de la Ser 86 (S86D) de TbCdc34 no mostró ningún tipo de alteración en el crecimiento de los parásitos. Esto podría atribuirse a que la proteína endógena es suficiente para efectuar su función, a pesar de la presencia de formas exógenas de la misma. La sobreexpresión de TbCdc34 etiquetada mostró un corrimiento de ~8kDa en geles de poliacrilamida sin poder reductor (DTT). Esta movilidad también se observó cuando se etiquetó el locus endógeno, pero no cuando se sobreexpresó la versión mutante de la Cys aceptora. En condiciones reductoras, este cambio en la movilidad de la proteína *wt* desapareció. Estos datos apuntan a que la Cys 84 de TbCdc34 podría estar formando una unión tioéster con ubiquitina. A pesar de no poder demostrar esta unión en la proteína endógena (por Inmunoprecipitación), los datos del ensayo *in vitro* demostraron que TbCdc34 fue capaz de formar un intermediario tioéster con la ubiquitina de humanos. A su vez, la retención de la proteína *wt* en una resina capaz de unir proteínas ubiquitinadas (no así la doble mutante), estaría indicando que el intermediario observado en extractos proteicos de *T. brucei* sería resultado de la unión entre TbCdc34 y la ubiquitina de los parásitos.

### **Enzimas E2 como blancos terapéuticos**

El sistema de ubiquitina-proteasoma (UPS) tiene un gran impacto sobre la medicina, dada el amplio rango funcional y las múltiples enfermedades asociadas a su desregulación (desde cáncer y síndromes neurodegenerativos hasta perturbaciones en el sistema inmune y otras enfermedades). Se han desarrollado inhibidores del proteasoma y pequeñas moléculas que apuntan a inhibir específicamente componentes del sistema UPS. Alguno de estos son las enzimas E1, las enzimas deubiquitinantes (DUBs) [109] y la interfase de unión entre proteínas F-box y sustratos (por ejemplo, Skp2 y p27) [110]. Existe evidencia de que el proteasoma podría ser un blanco terapéutico en parásitos protozoarios. El inhibidor de proteasoma Lactacistina es capaz de bloquear el crecimiento del estadio sanguíneo y procíclico de *T. brucei*, al igual que en *Leishmania*, indicando que el proteasoma de estos parásitos es esencial para la progresión del ciclo celular [91]. Así como en el caso de la familia de Cullinas, *T. brucei* posee un gran número de homólogos a las proteínas E2 (Fig. D1).

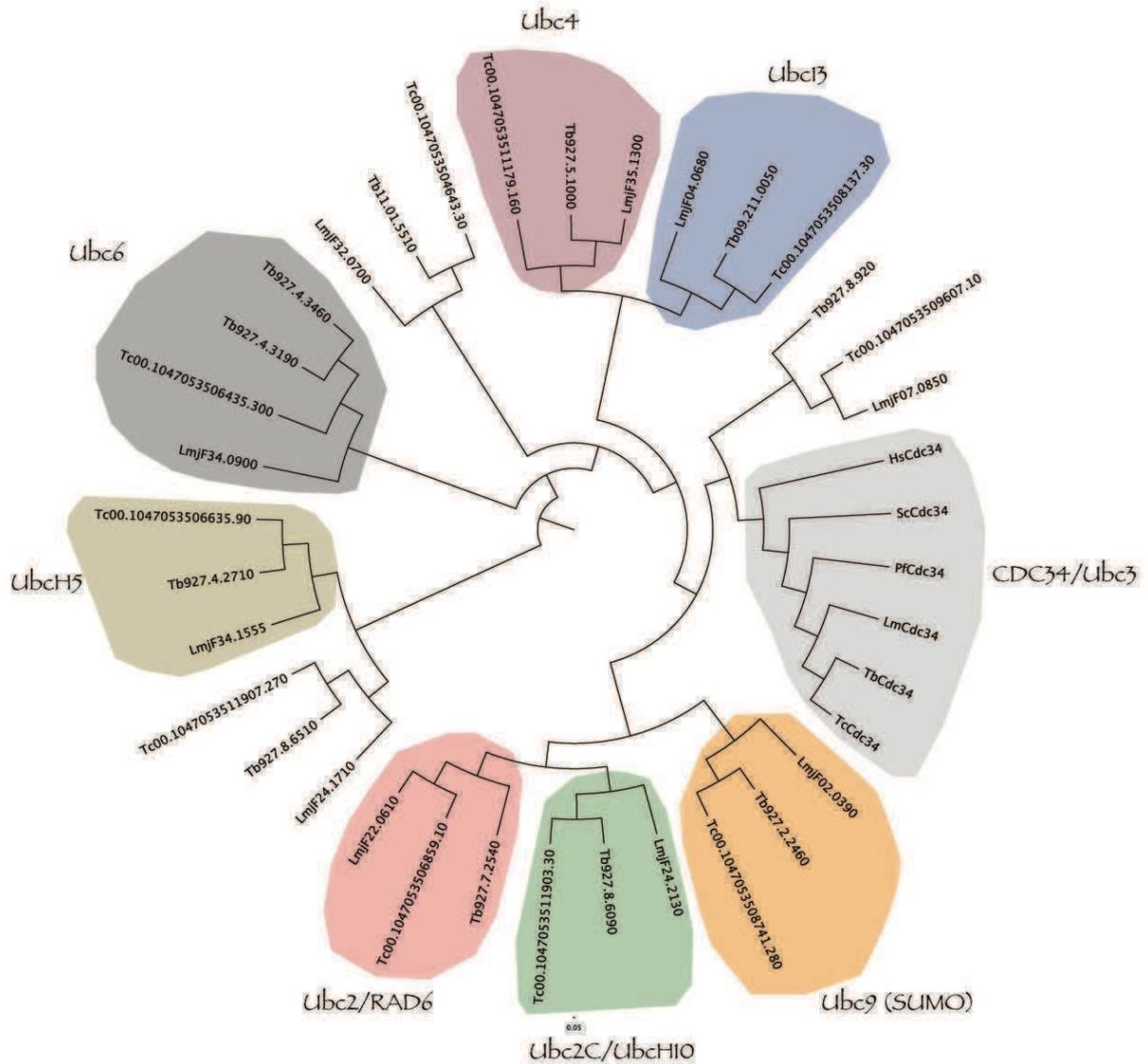


Figura D1 | Dendrograma de enzimas conjugadoras de UbIs en *Trypanosoma brucei*, *Trypanosoma cruzi* y *Leishmania major*. Se indican las E2 de humanos o levaduras con las que poseen identidad. El alineamiento fue generado con ClustalW y el dendrograma con el programa Figtree v.1.1.2

El análisis realizado sobre TbCdc34 y las posibles enzimas de la familia E2 presentes en el genoma de *T. brucei* plantean la interesante tarea de estudiar sus funciones para generar una lista de enzimas esenciales para el crecimiento de los parásitos. Dada las diferencias existentes en sus secuencias aminoacídicas y probablemente en su estructura tridimensional, un *screening* contra una biblioteca química de pequeños inhibidores podría identificar una droga que inhiba estas enzimas y por lo tanto el crecimiento del parásito. En un estudio de este tipo, fue posible rastrear un inhibidor (Hesperidina) capaz de inhibir la actividad de la Aurora quinasa de *T. brucei* (TbAUK1). En concentraciones nanomolares, se inhibió la actividad de TbAUK1 *in*

*vitro*, e *in vivo*, la droga produjo el mismo fenotipo que el ARNi de TbAUK1 [111], confirmando que TbAUK1 es el blanco intracelular. Sobre la base de los resultados obtenidos en ratones, en donde se ha demostrado que TbCdc34 es necesaria para la morfogénesis celular y proliferación en un modelo animal, un estudio de este tipo permitiría encontrar inhibidores de TbCdc34 que detengan la propagación de *T. brucei* y quizás otros Tripanosomátidos en el hospedador humano.

### ***Combinación de ARNi y proteómica comparativa para la identificación de sustratos de ubiquitinación***

El avance a través de la fase G1 en *T. brucei* requiere de la actividad de ciclinas y CRKs. El ARNi de la ciclina CYC2 arresta a las formas sanguíneas y procíclicas en la fase G1 [81,82], y la ciclina CYC4/CycE3 también podría ser necesaria para el avance en esta fase del ciclo celular [82]. El ARNi de CRK1 tanto en células BSF como en PCF produce un aumento de células en G1 [83]. La mayoría de las ciclinas involucradas en la regulación del ciclo celular en levaduras y células de mamíferos tiene un tiempo de vida corto y el proceso de destrucción de proteínas depende del sistema ubiquitina-proteasoma. Hammarton *et al* sugirieron que tanto CYC2 como CYC3 son degradadas por la vía del proteasoma en *T. brucei*, dada la presencia de un putativo dominio de destrucción (*Destruction box*) en CYC3 y que el agregado de los inhibidores del proteasoma MG132 y Lactacistina al cultivo bloquean la degradación de estas proteínas [84]. En un intento de determinar si estos reguladores del ciclo celular son, en efecto, ubiquitinados como ocurre con las proteínas de otros eucariotas, se realizó un análisis proteómico comparativo del ARNi de TbSkp1 mediante la técnica de DIGE. Recientemente, se ha aplicado la técnica de DIGE para la identificación de proteínas que forman parte de estructuras flagelares en *T. brucei* utilizando una metodología similar a la nuestra [112]. Con este experimento no fue posible detectar ninguna ciclina, lo cual no implica que estas proteínas estén siendo ubiquitinadas por este supuesto complejo. El hecho de que las proteínas CYC2 y CYC3 poseen una vida media de entre seis a nueve horas [113], podría explicar la dificultad en su detección. La degradación de estas ciclinas pudo observarse al sobreexpresarlas, y hasta el momento no se ha podido detectar ninguna ciclina endó-

gena por Western blot, tanto en *T. brucei* como en *T. cruzi* (datos de nuestro laboratorio), lo cual muestra los bajos niveles de estas proteínas en las células.

Los inhibidores de CDK (CKI) son pequeñas moléculas que cumplen una función importantísima en la regulación del ciclo celular. En Tripanosomátidos, no se ha podido identificar homólogos a estas proteínas en sus genomas. Con nuestro enfoque se quiso identificar proteínas que pudiesen cumplir funciones similares a los CKI. La proteína diferencialmente expresada en el DIGE de TbSkp1, Tb09.211.1690, similar a la *telomerase-binding protein p23* (Hsp90 co-chaperona), posee un peso deducido de 19 kDa, y su homólogo de *S. pombe*, es capaz de interaccionar con CDK2 [114]. Dado que posee un tamaño similar a los CKI de humanos, se investigó si poseía características funcionales similares a estas proteínas. El exceso de un CKI debería frenar el avance del ciclo celular, ya que posee la capacidad de inhibir a las CDKs. Sin embargo, su sobreexpresión en *T. brucei* no mostró ninguna modificación en la tasa de crecimiento de los parásitos (dato no mostrado); se están realizando estudios sobre su posible función en el ciclo celular del parásito.

En nuestro análisis por DIGE dentro de las proteínas identificadas para el ARNi de TbSkp1, existen varios reguladores conocidos del ciclo celular en *T. brucei*. Fue posible identificar a TbTrack, un homólogo del receptor de la proteína quinasa C activada (RACK), que ya ha sido estudiada y se determinó su implicancia en la regulación de la citoquinesis de *T. brucei* [80]. Esta proteína fue detectada en dos *spots* diferentes, lo que podría indicar un cambio en el tipo de modificación post-traduccional de la misma; coincidentemente, se ha demostrado que TbTrack se encuentra fosforilada en estos parásitos [115]. El hecho de que TbTrack aparezca disminuida en sus niveles en el ARNi de TbSkp1 contradice lo esperado, pues si es realmente ubiquitinada, sus niveles deberían aumentar al depletar las células de la subunidad TbSkp1. Es muy posible que la ausencia de TbSkp1 modifique alguna vía involucrada en la fosforilación de TbTrack.

El estudio proteómico realizado con extractos de TbSkp1 se repitió para el ARNi de TbCdc34. A pesar de no haber obtenido suficientes péptidos para tener una confiabilidad del 95% con respecto a las proteínas identificadas, fue posible observar cambios en la abundancia de ciertos reguladores del ciclo celular, como PLK y NEK2, así como corroborar que los niveles proteicos de TbCdc34 disminuían luego de la in-

ducción del ARNi. Es interesante notar que TbPLK tiene un pico de expresión en *T. brucei* entre la fase S y G2/M [88], y en nuestro estudio los niveles de TbPLK aparecen aumentados en ausencia de TbCdc34. Esto podría deberse a dos razones: 1) TbPLK es ubiquitinada por TbCdc34, y en su ausencia, no es enviada para su degradación por el proteasoma, o bien 2) dado que el ARNi de TbCdc34 produce un aumento de células en la fase G2/M, los niveles de TbPLK aparecen aumentados ya que coincide con el pico de su expresión. En células de *Xenopus*, *Drosophila* y vertebrados, PLK es degradada al igual que Aurora A/B y Nek2A por el complejo APC/C [92]. Estos resultados aún preliminares han permitido identificar proteínas que se sabe están involucradas en el control del ciclo celular y que estarían siendo reguladas por TbCdc34.

A partir de los resultados obtenidos mediante la técnica de DIGE, esperamos confirmar la ubiquitinación de las proteínas identificadas para ir generando un mapa cada vez más completo de los actores de la regulación del ciclo celular de Tripanosomátidos.

### **Las proteínas F-box en Tripanosomátidos**

A pesar de no haber sido presentado formalmente en esta tesis, se realizó un análisis de la presencia de proteínas F-box en los genomas de *T. cruzi* y *T. brucei*. Utilizando la secuencia aminoacídica completa de diferentes proteínas F-box de humanos, levaduras o plantas, se identificaron genes que poseen este dominio, pero que carecen de los dominios de interacción proteína-proteína, como WD40 o LRR, característicos de ellas (Anexo). Interesantemente, en *T. brucei* los genes que codifican proteínas con el dominio F-box son siete y se encuentran agrupados en el cromosoma 1 (así como otro gen en el cromosoma 4: Tb927.4.3000). Dos de estos genes fueron recientemente estudiados por ARNi en *T. brucei* [103], en donde se observó que la ausencia de dichas proteínas produce la inhibición del crecimiento de los parásitos. Sería interesante analizar si TbSkp1 interacciona con alguna de estas proteínas F-box y a su vez, estudiar cómo estas proteínas reconocen a sus sustratos, teniendo en cuenta que carecen de los dominios de reconocimiento de proteínas fosforiladas. Podría ocurrir que en estos organismos el módulo dominio F-box y dominio WD-40 se forme por la unión entre dos proteínas diferentes que los contienen.

El trabajo presentado en esta tesis demuestra por primera vez la existencia de un complejo SCF conservado en los genomas de *Trypanosoma brucei*, *Trypanosoma cruzi* y *Leishmania major*. A lo largo del trabajo nos acercamos a comprender la función que pueden llegar a tener las proteínas de este complejo dentro del ciclo celular de *T. brucei*. Como se mencionó previamente, la regulación del ciclo celular de los parásitos posee características que difieren de sus homólogos eucariotas y era de esperarse diferencias en las actividades de las proteínas que forman parte del complejo, a pesar del alto grado de conservación estructural de los mismos. Las interferencias de TbSkp1 y TbRbx1 mostraron arrestos en las fases G1/S y S, respectivamente, mientras que TbCdc34 provocó que las células se detuvieran en un estado pre-citoquinesis, y en el caso de TbCullin1 no se evidenció fenotipo alguno. Al analizar los resultados en conjunto, es difícil enmarcar a estas proteínas dentro de una función única y aseverar que estén formando parte de un único complejo durante todo el ciclo celular. Teniendo en cuenta la bibliografía que existe sobre estas proteínas, es posible que sean capaces de interactuar y formar complejos con otras subunidades. Esto se podrá determinar en experimentos de Tap-Tag para conocer con seguridad sus pares de interacción. Sin embargo, lo que si se ha podido determinar es la esencialidad de tres de las cuatro “subunidades” estudiadas. Esto es positivo, ya que muestra la importancia del sistema ubiquitina en Tripanosomátidos y la conservación que existe desde estos organismos unicelulares hasta células de mamíferos. También cabe destacar la importancia de TbCdc34 en la replicación del parásito tanto *in vitro* como en un modelo murino, indicándola como un blanco factible para el diseño racional de drogas anti-parasitarias. Aún así, quedan por delante muchas preguntas por responder y trabajo a realizar. A partir de este trabajo, se espera contribuir en la comprensión del intrincado control que existe en la regulación del ciclo celular de estos parásitos, en el cual el sistema de ubiquitinación posee una función sumamente importante.

# ***CONCLUSIONES***

*CARACTERIZACIÓN DEL COMPLEJO SCF EN T. BRUCEI.*

En la siguiente tabla se resumen los resultados obtenidos para el análisis de los componentes homólogos al complejo SCF de eucariotas en *T. brucei*.

Componente	Localización	ARNi		Fenotipo de sobreexpresión
		Fenotipo en BSF	Fenotipo en PCF	
<b>TbSkp1</b>	N.D. <sup>1</sup>	Arresto de células G1/S	Arresto de células G1/S	Normal
<b>TbRbx1</b>	N.D.	Pérdida del kinetoplasto	Normal	N.D
<b>TbCulin1</b>	N.D.	Normal	Normal	N.D
<b>TbCdc34</b>	Próximo al kinetoplasto (posiblemente cuerpo basal o Golgi)	Acumulación de células en citoquinesis, re-replicación de ADN	N.D.	Normal

<sup>1</sup>N.D.: No determinado

# ***MATERIALES Y MÉTODOS***

### **Cepas de bacterias *E. coli***

**DH5 $\alpha$ F'**: F'/endA1 hdR17( $r_k^- m_k^+$ ) supE44 thi-1 recA1 gyrA96 (Nal<sup>r</sup>) relA1  $\Delta$ (lacZYA-argF)(m80lacZ $\Delta$ M15).

**BL21/Lys**: F- ompT hdS<sub>B</sub> ( $r_B^- m_B^-$ ) gal (DE3) dcm pLysS, (cam<sup>R</sup>).

### **Medios de cultivo**

LIT (Liver Infusion Tryptose), cultivo de epimastigotes de *T. cruzi*: 1 litro. Disolver 5g infusión de hígado, 5g triptosa, 68 ml de 1M NaCl, 5.3 ml de 1M KCl, 22 ml 1M HPO<sub>4</sub>Na<sub>2</sub>. Autoclavar. Agregar 10 ml 20% glucosa, 1 ml hemina (1g en 50 ml 0.2 M NaOH), 100 ml de suero fetal bovino (10% final), 100  $\mu$ g/ml estreptomicina, 100 U/ml penicilina.

LB: 1% p/v bacto-triptona, 0.5% p/v extracto de levaduras, 1% p/v NaCl.

LB-agar: LB + 1.5%p/v bactoagar.

Concentración de ampicilina utilizada: 50  $\mu$ g/ml.

Concentración de IPTG para placas: 0.1 M; disolver 120 mg en 5 ml de H<sub>2</sub>O. Agregar 100  $\mu$ l/placa. Concentración final para placas: 0.5 mM.

Concentración de X-Gal para placas: 50 mg/ml. Disolver en dimetilformamida. Agregar 50  $\mu$ l/placa. Concentración final para placa: 40  $\mu$ g/ml.

### **Soluciones.**

TE: 10 mM Tris-HCl pH 8, 1 mM EDTA pH 8.

TBE 10x: 1 litro. 108 gr Tris base, 55 gr ácido bórico, 40 ml 0.5 M EDTA pH 8.

TAE 50x: 1 litro. 242 gr. Tris base, 57.1 ml ácido acético glacial, 100 ml 0.5 M EDTA pH8.

Buffer de siembra para muestras de DNA, 6x: 0.25% p/v azul de bromofenol, 0.25% p/v Xylene Cyanol y 30% v/v glicerol.

Buffer de siembra para muestras de RNA 4x: 1mM EDTA pH 8, 0.25% p/v azul de

## **Técnicas Electroforéticas**

**Geles de agarosa:** Los geles de agarosa se preparan con buffer TBE 0,5x o TAE 1x al 0.7-2 % con 0.5 µg/ml de bromuro de etidio. Las corridas electroforéticas se realizan a 5-10 V/cm. Antes de sembrar, las muestras se resuspenden con el correspondiente volumen de buffer de siembra 6x. Los geles son visualizados y fotografiados mediante el uso de transiluminadores de luz UVC.

**Geles de agarosa con formaldehído:** Se arman geles de agarosa 1-2% con 6% formaldehído en buffer MOPS 1x pH 7. Las muestras se preparan de la siguiente manera: 1 volumen de solución de RNA más 1 volumen de RNA LB 4x más 2 volúmenes de formamida deionizada. Luego se calientan 10 min a 65°C y se colocan en hielo hasta el momento de sembrar. La corrida electroforética se realiza con buffer MOPS 1x a 5-10 V/cm

**Electroforesis en geles de poliacrilamida desnaturalizantes (SDS-PAGE):** Se utiliza el método de Laemmli (1970). Se arman geles desnaturalizantes (0.1 % SDS) discontinuos en celdas BioRad 220. Las muestras analizadas se preparan agregando los volúmenes correspondientes de CB 6x y calentando por 5 min a 100°C. Como buffer de corrida se usa Tris-glicina-SDS 1x.

## **Análisis Bioinformático**

Las secuencias que codifican para las proteínas publicadas en este trabajo, han sido anotadas en el sitio <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>. Para la búsqueda de secuencias se utilizó la base de datos de GeneDB ([www.genedb.org](http://www.genedb.org)) la cual provee acceso a los proyectos genoma de *T. cruzi*, *T. brucei* y *Leishmania*. Los alineamientos de secuencias se realizaron con el programa ClustalW ([www.ebi.ac.uk/clustalw](http://www.ebi.ac.uk/clustalw)). Para la selección de la secuencia apropiada para inducir el RNA de interferencia se utilizó el programa automatizado RNAit (<http://trypanofan.path.cam.ac.uk/software/RNAit.html>). Esta herramienta permite la selección automática de la región a silenciar y los primers necesarios teniendo en cuenta la especificidad del silenciamiento. Para el análisis de secuencias de proteínas se utilizaron las herramientas del servidor ExPasy (<http://ca.expasy.org/>). Para el análisis de sitios de fosforilación, se utilizó el servidor NetPhos 2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/>).

## **MÉTODOS DE ADN Y ARN**

### ***Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)***

A partir de secuencias identificadas se diseñaron los oligonucleótidos que se usaron en las diferentes reacciones de amplificación por PCR. La mezcla de amplificación estuvo siempre compuesta por el ADN molde correspondiente (1-10 ng para plásmido y 500-800 ng para ADN genómico), 100 ng de cada oligonucleótido, 1-2 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM de cada dNTP, buffer Taq ó Pfu 1x y 2,5-5 U/50µl de enzima ADN polimerasa. Las reacciones se llevaron a cabo en volúmenes de 25-50 µl. Las condiciones generales de las reacciones llevadas a cabo, involucran los siguientes pasos:

**1. Desnaturalización** inicial del ADN por calentamiento a 95 °C durante 5 min.

**2. Ciclado** (por lo general se utilizaron 35 ciclos) y comprende 3 pasos:

*desnaturalización* a 95 °C durante 1 min.

*pegado del oligonucleótido* durante 1 min a la temperatura de “annealing” (la temperatura utilizada está relacionada con la longitud y composición de bases del mismo).

*elongación* a 72 °C (el tiempo de elongación depende del tamaño del inserto a amplificar, y se lo calcula a razón de 1 ó 2 min por cada kpb para la Taq polimerasa y la Pfu respectivamente).

**3. Extensión final**, a 72 °C durante 10 min. para terminar de extender las cadenas incompletas.

Una alícuota del producto de la reacción (aproximadamente el 10-20%) se analizó mediante electroforesis en gel de agarosa.

*\*Colony PCR.*

La técnica de *colony PCR* es un método rápido de detección de presencia de inserto en un determinado plásmido, a partir de colonias individuales de bacterias o levaduras. Dicha técnica se llevó a cabo de acuerdo al siguiente protocolo: se picó parte de la colonia con una punta de pipeta estéril, y se la resuspendió en agua bidestilada. Se lisaron las bacterias mediante calentamiento a 90-100 °C durante 10 min., y luego se centrifugó 10 min a 14.000 rpm. Finalmente se tomaron 5µl del sobrenadante

y se utilizaron como molde para llevar a cabo la reacción de PCR de acuerdo al protocolo antes mencionado.

### ***Clonado en TOPO TA***

Para el clonado de fragmentos de PCR para su posterior secuenciación y clonado en plásmidos de expresión, se utilizó el kit de Invitrogen Topo TA cloning. Para ello los fragmentos amplificados con PFU fueron incubados posteriormente con 1 µl de TAQ a 72°C por 20 min. El producto de PCR sin purificar fue incubado con el plásmido pCR®4-TOPO® , 1 µl de una solución NaCl y 3 µl de dH<sub>2</sub>O a temperatura ambiente por 20 min. Luego, 2 µl de la reacción fueron agregados a 50 µl de bacterias competentes y transformadas por shock térmico (ver transformación de bacterias).

### ***Reacciones de ligación***

En cada reacción de ligación se utilizaron entre 50 y 100 ng de vector. Se hicieron diferentes relaciones molares de inserto:vector (1:1, 3:1 y 5:1) manteniendo constante la masa de vector y variando la cantidad de inserto. La masa del inserto se calculó de la siguiente manera:

$$\frac{\text{masa del vector} \times \text{tamaño del inserto} \times \text{relación inserto-vector}}{\text{tamaño del vector}} = \text{masa del inserto}$$

Los volúmenes de reacción fueron de 10 o 20 µl utilizando la enzima ADN ligasa del fago T4 (New England Biolabs). Para ligar extremos romos se usó 1 U de enzima y para extremos cohesivos 0,1 U. Las incubaciones fueron a 16 °C durante toda la noche o a T° ambiente por 1-2 hs.

### ***Digestiones con endonucleasas de restricción***

Se utilizó aproximadamente 1 U de enzima por microgramo de ADN a digerir, utilizando el buffer y la temperatura indicado para cada enzima según las instrucciones del fabricante (New England Biolabs).

### ***Purificación de fragmentos de ADN de geles de agarosa***

Se utilizó el kit de extracción de ADN de geles de agarosa QIAquick (Qiagen), de acuerdo a las indicaciones del fabricante.

### ***Purificación de fragmentos de ADN de geles***

Los fragmentos de restricción o productos de PCR a purificar fueron separados por electroforesis en geles de agarosa en buffer TAE 1X. Las bandas correspondientes al fragmento de ADN a purificar se cortaron del gel visualizándolas en un transiluminador de luz UV. Posteriormente, los fragmentos de ADN se purificaron utilizando en la mayoría de los casos el kit QIAquick (Qiagen), siguiendo las instrucciones del fabricante. Para verificar el proceso de purificación se analizó una alícuota mediante electroforesis en gel de agarosa.

### ***Cuantificación de ADN y ARN***

Las muestras de ADN y ARN se cuantificaron por medición de la absorbancia a 260 nm.

Las concentraciones se calcularon conociendo que 1  $DO_{260nm}$  de ADN= 50  $\mu\text{g/ml}$  y 1  $DO_{260nm}$  de ARN= 40  $\mu\text{g/ml}$  y teniendo en cuenta el factor de dilución.

En algunos casos las muestras de ADN también cuantificaron por gel, comparando las intensidades observadas al UV con las intensidades dadas por un marcador de masa conocida.

### ***Mutagénesis dirigida***

Para generar las mutaciones en el gen de TbCdc34, se utilizó el kit de mutagénesis dirigida *QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene)*. Se diseñaron primers específicos para la generación de una doble mutante (C84S y S86D) y se siguió las indicaciones del fabricante. Brevemente, se utilizó la secuencia codificante de TbCdc34 clonada en el plásmido pCR4-TOPO como molde. Utilizando los pri-

mers diseñados conteniendo las mutaciones deseadas, se amplificó el plásmido y se trató con la enzima DpnI para eliminar el plásmido molde. Se transformaron bacterias y se secuenciaron clones para corroborar la inserción de las mutaciones deseadas. A continuación se muestran la región de TbCdc34 que fue modificada (en la parte inferior se muestra la secuenciación de uno de los clones):

```
TbCdc34 (245) GTGTGTGCATTTCTATTCTTCATCCACCCGGAGAGGATGAGATGAACAAA  
pCR3-M13F 301) GTGTGAGTATTGATATTCTTCATCCACCCGGAGAGGATGAGATGAACAAA
```

y las mutaciones obtenidas:

```
TbCdc34 Mut (82)RVSIDILHPPGEDEMNKEE  
TbCdc34 WT (82)RVCISILHPPGEDEMNKEE
```

### ***Real-time RT-PCR cuantitativa***

Se centrifugaron  $1 \times 10^8$  células a 3450 x g por 10 min. a 4°C y se lavaron con PBS frío. Las células se congelaron en hielo seco y se extrajo ARN total con el reactivo Trizol (Invitrogen) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. El ARN purificado fue cuantificado por espectroscopia con un espectrofotómetro ND-1000 (Nanodrop Technologies) y la integridad del ARN fue evaluado por electroforesis en gel de agarosa. Las muestras fueron tratadas con DNasa libre de RNAasa (Promega) de acuerdo a las instrucciones del fabricante y se generó el cADN con el kit de Transcriptasa reversa Superscript III (Invitrogen), utilizando oligo dTs + 5 µg de ARN total. La expresión de los genes fue monitoreado por qRT-PCR utilizando los primers de la lista a continuación. El gen de la subunidad 8 de transamidasa de GPI (GPI8) (Tb10.61.3060) de *T. brucei* fue utilizado como control endógeno para la normalización de los genes. Las reacciones de qRT-PCR fueron realizadas en un volumen total de 20 µl utilizando una mezcla *Power SYBR Green PCR Master Mix* (Applied Biosystems) en un equipo Rotor-Gene 6000 (Corbett Life Science) con 10 ng de cDNA y 500 nM de cada primer sentido y antisentido. Las condiciones de ciclado: 95°C por 10 min. seguido de 40 ciclos de 30 seg. a 94°C, 30 seg. a 60°C, 30 seg a 72°C. Todos los fragmentos de los genes fueron amplificados en triplicado de la misma preparación de ARN y se consideró el valor promedio. Los datos fueron nor-

malizados al nivel del gen de referencia endógeno GPI8 y los valores de expresión de las muestras no inducidas con Tetraciclina.

### ***Lista de Primers utilizados***

Pares de primers	Secuencia	Plásmido
<b>ARNi</b>		
pZJM.TbSKP1		
Fwd: HindIII	CCCGGATCCAAGCTTCGGTACAGGACGTGG	pZJM
Rev: XhoI	CCGCTCGAGCGCACAGGTGAGATCCAGTA	
pZJM.TbCDC34		
Fwd: HindIII	CCCGGATCCAAGCTTCATGAGCTTACGTGC	pZJM
Rev: XhoI	CCGCTCGAGCTTCACGGTTCTTGCGGTA	
pZJM.TbRBX1		
Fwd: HindIII	CCCGGATCCAAGCTTGAGGAAGCGGCTGC	pZJM
Rev: XhoI	CCGCTCGAGTTCTGGTACGACCATTCTT	
pZJM.TbCULLIN1		
Fwd: HindIII	CCGCTCGAGGTGTACGCTGATGGTGTTT	pZJM
Rev: XhoI	CGCCTCGAAGGAATGTAAAG	
<b>Sobreexpresiones</b>		
p2477.TbSKP1		
Fwd (OL2779): HindIII	CCCAAGCTTCCGCCACCATGGCGGAAGAGGTGTCG	p2477
Rev (OL2780): BamHI	CGGGATCCAGAACCCGCCTCTTCGCACCAGC	
p2477/2619.TbCDC34		
Fwd (OL2781): HindIII	CCCAAGCTTCCGCCACC ATGTCTGCAATCCCTTAC	p2477/p2619
Rev (OL2780): BamHI	CGGGATCCAGAACCCATCAATGCCTCCATTA	
<b>Mutagénesis</b>		
CDC34 <sup>MUT</sup>		
OL2785	CCCGATGGTTCGTGTGAGTATTGATATTCTTCATCCACCCG-p2477 GAGAG	
<b>Real-Time PCR</b>		
<i>SKP1</i>		
OL2717	GAACATGATCCGTGGGAAGTCT	
OL2718	CGGGAGTGAAGTCGCTTTCA	
<i>CDC34</i>		
OL2719	TTTGTGCCCATTCCTCAAGAG	
OL2720	TCGTCATCATACCCCATTGCT	
<i>CULLIN1</i>		
OL2721	GGGCGCTTTGGAATGACA	
OL2722	CTAATCAGGATGGATGCCTTCAC	
<i>RBX1</i>		

OL2723	GTTTCTTATTCTCCTCGTTACCTTCAG
OL2724	AAAGAAATCAACCTAGCATATCATAACCT
<i>GPI8</i>	
OL2272	CGAAGCGCATTGGATAGC
OL2273	AGCGCGTGATGACAGTGAAG

### **Etiquetado endógeno**

<i>pENT6b-TbCdc34-6xHA</i>		pENT6b
OL2804	AAGCTTCCCTCGAGCAGCATTCAACTCTTAC	
OL2805	ACTAGTCATAAACCGTTCCATCAG	
OL2806	CCCAAGCTTGCCTTGCGATGGTAAAT	
OL2807	CCGCTCGAGCACGCACTGAGTGAATG	

## **TÉCNICAS DE HIBRIDACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS**

### ***Purificación de ARN total***

El ARN total de los distintos estadios de *T. cruzi* y de *T. brucei* se extrajo utilizando el reactivo comercial TRIzol (GIBCO BRL) de acuerdo al siguiente protocolo: parásitos previamente lavados con PBS se resuspenden en 1 ml de TRIzol. Dicho reactivo produce la lisis celular manteniendo en todo momento la integridad del ARN. Una vez que los parásitos han sido resuspendidos, se los incuba durante 5 min a temperatura ambiente para permitir la disociación completa de los complejos núcleo proteicos. Posteriormente se agregan 0,2 ml de cloroformo, se agita vigorosamente durante 15 s, se incuba la muestra de 2-3 min y luego se centrifuga a 16.000 x g durante 10 min a 4°C. Se separa el sobrenadante (fase acuosa) que contiene al ARN y se lo precipita mediante el agregado de 0,5 ml de isopropanol. Se incuba la muestra a temperatura ambiente por 10 min y posteriormente se la centrifuga a 12.000 rpm durante 20 min. Se remueve el sobrenadante y se lava el precipitado con etanol 75 %. El pellet se seca brevemente y luego se resuspende en agua. La cuantificación del ARN obtenido se realiza midiendo la absorbancia de la muestra a 280 y 260 nm. La integridad del ARN purificado se corrobora mediante electroforesis en geles de agarosa.

### ***Northern blot***

10-30 µg de RNA de los diferentes estadios extraídos tal como se describió anteriormente, se separan por electroforesis en condiciones desnaturizantes en geles

de agarosa al 1,5 %. La electroforesis se lleva a cabo a 70 V constantes durante 4-5 h. Una vez finalizada la misma, se fotografía el gel y se transfiere por difusión pasiva durante toda la noche utilizando membranas de Nylon (Hybond™ N+, Amersham Life Science). Una vez finalizado el tiempo de transferencia, se fija el ARN a la membrana mediante su exposición a luz ultravioleta. Para evitar el pegado inespecífico de la sonda se lleva a cabo la pre-hibridización de la membrana mediante su incubación en una solución Church durante 3 h a 65°C. Posteriormente se hibrida toda la noche con la sonda marcada a 60-65°C. Una vez finalizada se lava la membrana controlando los filtros con contador Geiger. Finalmente, se realiza la detección de la señal mediante la exposición a placas radiográficas (Kodak X- Omat) o bien se registra la marca presente empleando un fosforimager Storm 820 (Pharmacia-Biotech).

## **TÉCNICAS CON BACTERIAS**

### ***Preparación de bacterias competentes***

La preparación de bacterias competentes de *E. coli* de las cepas DH5α y BL21 se realizó según el protocolo de Hanahan (Hanahan, 1983) con algunas modificaciones:

1. A partir de una placa fresca se picó una colonia aislada, se inoculó a 5 ml de LB y se creció con agitación a 37 °C durante toda la noche.
2. Se inoculó 1 ml de este cultivo a 100 ml de LB en erlenmeyer de 500 o 1000 ml. Se creció con agitación a 37 °C hasta una  $DO_{600nm} = 0,5$  y luego se colocó en hielo por 10 min.
3. Se centrifugó a 3000 xg por 5 min a 4 °C. Se descartó el sobrenadante. El pellet se resuspendió cuidadosamente en 40 ml de solución TBF I fría y se dejó en hielo 5 min.
4. Luego se centrifugó a 3000 xg por 5 min a 4 °C y se descartó el sobrenadante. El pellet se resuspendió cuidadosamente y siempre en hielo con 4 ml de TBF II preenfriado. Se incubó en hielo por 15 min.

5. Finalmente las células se alicuotaron en eppendorf estériles en volúmenes de 50 ó 100  $\mu$ l, se congelaron inmediatamente en nitrógeno líquido y se guardaron a -70 °C hasta el momento de usar. Por transformación se utilizaron 50  $\mu$ l.

Para la obtención de bacterias que pueden ser transformadas con vectores plasmídicos con mayor eficiencia se utilizó el siguiente protocolo:

1. A partir de una placa fresca se picó una colonia aislada, se inoculó a 25 ml de medio SOB en un erlenmeyer de 250 ml y se creció con agitación a 37 °C durante 8 horas.
2. Se utilizaron 10 ml, 4 ml y 2 ml del cultivo anterior para inocular tres erlenmeyers de 1 L conteniendo 250 ml de SOB fresco. Se crecieron los cultivos a 18-22 °C con agitación suave durante 18 horas.
3. Se midió la  $DO_{600nm}$  de los tres cultivos hasta que uno de ellos alcance un valor de 0,55.
4. Se transfirió ese cultivo a un baño de hielo y se incubó 10 min.
5. Se colectaron las células por centrifugación a 2.000 xg 10 min a 4 °C, se descartó el sobrenadante y se resuspendieron las células en 80 ml de Buffer Inoue frío.
6. Se volvieron a colectar las células por centrifugación a 2.000 xg 10 min a 4 °C, se descartó el sobrenadante y se resuspendieron las células en 20 ml de Buffer Inoue frío.
7. Se agregaron 1,5 ml de DMSO, se mezcló por inversión y se dejó en hielo 10 min.
8. Finalmente las células se alicuotaron en *eppendorf* estériles en volúmenes de 50 ó 100  $\mu$ l, se congelaron inmediatamente en nitrógeno líquido y se guardaron a -70 °C hasta el momento de usar. Por transformación se utilizaron 50  $\mu$ l.

### ***Transformación de bacterias competentes***

Para la transformación de las bacterias competentes obtenidas como se describió en el punto anterior se llevó a cabo el siguiente protocolo: 50  $\mu$ l de bacterias competentes se pusieron en contacto con el ADN a transformar durante 30 min. (en hielo). Posteriormente se las sometió a un golpe de calor mediante su incubación durante 90 seg a 42 °C. A continuación se enfriaron las bacterias en hielo, se les adicionó 1

ml de LB estéril y se incubaron a 37 °C durante 30 min. Finalmente las bacterias se plaquearon en LB agar conteniendo el antibiótico específico y se incubaron a 37 °C durante 18 horas.

## ***TÉCNICAS UTILIZADAS EN ENSAYOS CON PARÁSITOS***

### ***Determinación de densidad celular***

El cultivo de *T. brucei* fue homogeneizado sacudiendo la botella de cultivo. 10 µl fueron puestos bajo cubreobjetos sobre uncámara de Neubauer. Las células de 2 cuadrantes de 16 campos cuadrados fueron contados, y el promedio fue multiplicado por  $1 \times 10^4$ , lo que da el número de células en 1 ml de cultivo. Se hicieron diluciones para mantener los cultivos por debajo de  $1 \times 10^6$  y  $1-2 \times 10^7$  parásitos/ml para estadio sanguíneo y procíclico, respectivamente.

### ***Cultivos de T. brucei***

Células procíclicas de la cepa 29-13 [116] fueron crecidas a 28°C en medio SDM-79 suplementada con 10% suero fetal bovino. Células estadio sanguíneo de la cepa 90-13 [116] fueron crecidos a 37°C suplementado con 5%  $\text{CO}_2$  en medio HMI-9 con 10% de suero fetal bovino y 10% de suero plus (SAFC Bioscience Inc., KS). Para mantener las construcciones génicas de T7 RNA polimerasa y el represor de Tetraciclina dentro de las células, 15 µg/ml G418 (GIBCO) y 50 µg/ml hygromycina B (Invitrogen) fueron agregados al medio SDM-79 para la línea celular 29-13, mientras que 2.5 µg/ml G418 and 5 µg/ml hygromycin B fueron agregados al medio HMI-9 para la cepa 90-13. Las células se diluyen con medio fresco cuando la densidad alcanza  $5 \times 10^6$  células/ml.

### ***Transfección de parásitos***

***Células cepa 90-13 (estadio sanguíneo):*** se utilizó el electroporador AMAXA Nucleofector® II con el programa X-001 y la solución Human T-cell Nucleofector. Se crecieron las células hasta una densidad de  $0.8-1 \times 10^6$  células/ml.

1. Se preparan 90 ml de medio HMI-9 con las drogas apropiadas para el crecimiento de la cepa parental. Se distribuye el medio en tres falcons: 30 ml en tubo A, 27 en tubo B y C.

2. Se centrifugan 30 millones de células por centrifugación a 1500 rpm por 10min.
3. Resuspender en 100  $\mu$ l de Amaxa Human T-cell solution a 4°C.
4. Aregar 10  $\mu$ g de ADN a la cuveta e inmediatamente agregar 100  $\mu$ l de células. Poner la tapa de la cubeta y transfectar.
5. Transferir la mezcla ADN-células al tubo A, conteniendo 30 ml de medio preparado. Invertir varias veces para mezclar bien.
6. Transferir 3 ml de células del tubo A al tubo B. Invertir varias veces para mezclar bien. Repetir el procedimiento para el tubo C.
7. Luego de 6 horas o O.N. preparar 75ml de HMI-9 con las drogas al doble de la concentración normal. Alicuotar 1 ml a cada posillo de una placa de 24 posillos.
8. Las células transformadas se observan a partir del día 5 o 6.

**Células cepa 29-13 (estadio procíclico):** Se crecieron las células hasta fase logarítmica ( $3-8 \times 10^6$  células/ml).  $2 \times 10^7$  células fueron lavadas una vez con 10 ml de buffer ZPFM (Zimmerman post-fusion medium). El pellet fue resuspendido en 0.5 ml en ZPFM y transferido a cuveta de 1ml (BTX) en hielo. 10  $\mu$ g de plásmido linealizado fue agregado y mezclado con pipeta. Se electroporan las células mediante un pulso de 1,6 kV y 25  $\mu$ F. Las células son transferidas a 10 ml de medio SDM-79 con las drogas apropiadas de acuerdo al *background* celular a 28 °C. Al día siguiente, se agrega el antibiótico de selección y se distribuyen 1.5 ml a cada pocillos de una placa de 24 pocillos. 500  $\mu$ l de medio condicionado (medio obtenido de un cultivo previo en fase logarítmica, centrifugado y filtrado) con los antibióticos apropiados, fue agregado en los pocillos. Las células fueron distribuidas verticalmente siguiendo el principio de dilución: 0.5 ml del cultivo en el primer pocillo de la primera fila fue transferido al segundo pocillo. La dilución fue hecha consecutivamente para el tercer y cuarto pocillo, siempre del posillo inmediatamente superior. Clones estables fueron obtenidos aproximadamente luego de 3 a 4 semanas.

### **ARN de interferencia y Sobreexpresiones**

Luego de la obtención de clones estables para cada construcción, se indujo el ARNi por el agregado de 1  $\mu$ g/ml de tetraciclina (en etanol 95%) al medio cada día. Las células fueron mantenidas entre  $1 \times 10^6$  y  $1 \times 10^7$  parasitos/ml. De a misma manera, las proteínas fueron sobreexpresadas por el agregado de 1  $\mu$ g/ml tetraciclina al medio.

La sobreexpresión de las mismas fue determinada por extracción de proteínas de parásitos inducidos o no inducidos, las muestras fueron separadas por SDS-PAGE y electrotransferidas y analizadas por Western blot con los anticuerpos anti-HA (SIGMA), dilución 1:1000 en 3%BSA/PBS-T o anti-GFP (Santa Cruz-SC-9996), dilución 1:1000 en 3%BSA/PBS-T

### ***FACS (fluorescence activated cell sorting) para análisis de ciclo celular***

*Fijación:* Se tomaron como mínimo  $1 \times 10^6$  células (estadio procíclico) o  $1 \times 10^5$  células (estadio sanguíneo) y luego de ser centrifugadas y lavadas con PBS + 2mM EDTA (dos veces), se resuspendieron en 200  $\mu$ l de PBS + EDTA. Se fijaron por el agregado de 1 ml de ETOH 70% mientras se van vortexeando. Se guardan a 4°C como mínimo toda la noche.

*Marcación:* Se centrifugan las células 10 min. a 1500 rpm a 4°C. El pellet se resuspende en 0.5 ml de solución de tinción. Se incuban a 37°C por 30 minutos. Se procede al análisis en citómetro.

*Sc. de tinción (por ml):* 950  $\mu$ l PBS + 2 mM de EDTA, 20  $\mu$ l RNAsa A 10 mg/ml, 50 $\mu$ l Ioduro de propidio (1mg/ml) (INVITROGEN).

### ***Sincronización de parásitos***

Se siguió el procedimiento descrito por [77]. Se incubaron 10 ml de cultivo ( $2.5 \times 10^6$  células/ml) en medio conteniendo 0.2 mM de Hidroxiurea (HU) por 12 horas a 28°C. Luego se removió la HU por centrifugación (1200g, 10 min.), seguido de dos lavados de las células con medio de cultivo (10 min. a 4°C). Luego se continuó el cultivo sin HU. Para evaluar la sincronía de las células, se fijaron las células cada 2 horas, se tiñeron con Ioduro de propidio y se analizaron por FACS .

### ***Obtención de extractos proteicos.***

Los extractos de proteínas de los diferentes estadios fueron obtenidos mediante la ruptura por 3-5 ciclos de congelamiento y descongelamiento en buffer de lisis en

presencia de inhibidores de proteasas: 0,5 mM tosil-lisil-clorometil cetona (TLCK), 0,1 mM E64, 1mM fenilmetil-sulfonil fluoruro (PMSF), 10  $\mu\text{g ml}^{-1}$  leupeptina y 25 U  $\text{ml}^{-1}$  aprotinina. Las muestras fueron centrifugadas a 14.000 rpm por 10 min. a 4°C y se tomó el sobrenadante. La concentración de proteínas se determinó por el método de Bradford (Bio-Rad Protein Assay).

### ***Inmunofluorescencia indirecta (IFI)***

Las inmunofluorescencias indirectas se llevaron a cabo de acuerdo al siguiente protocolo: sobre cubre-objetos se coloca una gota de una solución 0,10  $\text{mg.ml}^{-1}$  de poli-L-lisina (Sigma). Una vez seca, se colocan 200  $\mu\text{l}$  de una suspensión de parásitos previamente fijados y lavados. Para esto,  $2,5 \times 10^6 \text{ ml}^{-1}$  son tratados durante 20 min con una solución de paraformaldehído al 4 %, lavando posteriormente los parásitos con PBS. Una vez que los parásitos se han adherido al vidrio se los permeabiliza con 0,1% Tritón X-100 por 5 min. Los bloqueos se realizan con una solución 3% de BSA y 50mM  $\text{NH}_4\text{Cl}$  por 30 min. Luego de realizar la incubación con los anticuerpos correspondientes purificados durante 2 h se incuba con el anticuerpo secundario (1/5.000) apropiado conjugado a Alexa Fluor 488 o Alexa Fluor 546 (Molecular Probes) durante 1 h a temperatura ambiente. Por último, se efectúa un lavado exhaustivo de los preparados con PBS, y finalmente se los monta sobre portaobjetos con 15  $\mu\text{l}$  de Mowiol. Para la marcación de núcleo y kinetoplasto se utilizó 100  $\text{ng}/\mu\text{l}$  de DAPI (Molecular Probes) o una solución de Ioduro de Propidio en una concentración final de 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ . Las imágenes fueron adquiridas en un microscopio Olympus Eclipse E600, mediante una cámara digital Spot RT Slider Modelo N° 2.3.1 (Diagnostic Instruments Inc; USA).

### ***Controles importantes:***

Incubar sólo con 2do anticuerpo (FITC), suero preinmune, primer anticuerpo solo.

## ***Infecciones en ratones***

Grupos de 5 ratones de un mes de edad (C3H/He y Balb/c) fueron inoculados con  $1 \times 10^6$  parásitos de la cepa 90-13 de *T. brucei* por inyección intraperitoneal. Los ratones Balb/c no alcanzaron una parasitemia significativa, por lo que se eligieron los ratones C3H/he para los estudios. Grupos de 5 ratones C3H/He fueron inoculados con  $1 \times 10^6$  parásitos de la línea de ARNi de TbCdc34 90-13 o la cepa parental 90-13 y se realizaron diferentes tratamientos con la droga Doxiciclina (SIGMA). Un grupo recibió una concentración de 1 mg/ml de doxiciclina en 2,5% de glucosa en el agua bebibible al comienzo de la infección, oralmente o ad libitum. Otro experimento constó en darle a un grupo de 5 ratones 1 mg/ml de doxiciclina en el agua luego de 48 horas de producida la infección, cuando estos mostraron una parasitemia apreciable ( $\sim 1,5 \times 10^7$  parásitos/ml), para inducir el ARNi de TbCdc34. El grupo control recibió agua con 2,5% de glucosa. El curso de la infección fue evaluada cada día por conteo de parasitemia en sangre periférica obtenida del sangrado de colas y sobrevida de los ratones. Los experimentos fueron repetidos 3 veces. Todos los procedimientos que involucraron protocolos experimentales en animales fueron realizados de acuerdo con las legislaciones éticas establecidas en Argentina y siguiendo las guías internacionales.

## ***TÉCNICAS CON PROTEÍNAS***

### ***Expresión de proteínas recombinantes***

Todas las enzimas estudiadas fueron expresadas en *E. coli* de la cepa BL21/Lys de acuerdo al siguiente protocolo:

1. Se preparó un precultivo a partir de una única colonia de dichas bacterias transformadas con los vectores de expresión correspondientes en medio LB conteniendo 50  $\mu\text{g/ml}$  de ampicilina y 10  $\mu\text{g/ml}$  de cloranfenicol, el cual se creció a 37 °C durante toda la noche.

2. Se realizó una dilución 1:20 de dicho precultivo en el mismo medio conteniendo los antibióticos antes mencionados y se creció a 37 °C hasta una DO<sub>600nm</sub>= 0,6-1.
3. Luego se agregó isopropil-D-tiogalactopiranosido (IPTG) 0,5 mM (concentración final) y se induce la expresión de la proteína recombinante a 28 °C durante 2-3 hs.
4. El cultivo bacteriano se centrifugó y el pellet se resuspendió en solución de lisis de bacterias mas antiproteásicos (extracto total).
5. Una vez efectuada la lisis bacteriana, las células se lisaron usando el sonicador Heat System Ultrasonic con 5 ciclos de: 30 segundos de sonicación en el punto 5 y 60 segundos en hielo.
6. Las bacterias lisadas se separaron en pellet y sobrenadante por centrifugación a 13000 rpm y 4 °C por 10 minutos (todos estos procedimientos se llevaron a cabo a 4 °C).

La eficiencia en la expresión de las proteínas recombinantes se analizó mediante la comparación de actividades específicas y patrón de proteínas en geles de poliacrilamida entre extractos totales (libres de células) de bacterias transformadas con el vector de expresión conteniendo el inserto a las cuales se les agregó IPTG para inducir la expresión de la proteína recombinante, y los extractos obtenidos a partir de cultivos controles.

Usualmente se realizaron dos tipos de controles: 1) inducidos, provenientes de bacterias transformadas con el vector de expresión sin inserto a las cuales se les agregó IPTG ; y 2) no inducidos, provenientes de bacterias transformadas con el vector de expresión conteniendo el inserto, pero a las cuales no se les agregó IPTG.

### ***Purificación por columnas de Ni-NTA agarosa***

La purificación de las proteínas recombinantes en condiciones nativas se llevó a cabo por medio de columnas de Ni-NTA agarosa (Qiagen) través del motivo de seis

histidinas presentes en las proteínas recombinantes utilizando del siguiente protocolo:

1. Se equilibró la columna de Ni-NTA con 10 volúmenes de buffer nativo y luego se incubó con el sobrenadante de la lisis celular durante 1 hora a 4 °C en agitación.
2. Se sembró la columna y se colectó el percolado.
3. Las proteínas unidas de manera inespecífica a la matriz se eliminaron mediante sucesivos lavados con 5 volúmenes de buffer nativo más imidazol 10-20 mM.
4. Finalmente se eluyeron las proteínas mediante el pasaje a través de la columna del mismo buffer conteniendo concentraciones crecientes de imidazol de 40 a 500 mM.
5. Todos los pasos de purificación se llevaron a cabo a 4 °C y la pureza de las proteínas obtenidas se analizó mediante geles de poliacrilamida teñidos con Coomassie.

### ***Determinación de la concentración proteica***

La determinación de la concentración de proteínas de los distintos tipos de muestras analizados se llevó a cabo por el método de Bradford (Bradford, 1976). A 10 µl de cada muestra se le agregó 190 µl de reactivo de Bradford y se hicieron las lecturas de absorbancia a 620 nm en placas de poliestireno de 96 pocillos. Se realizaron como mínimo dos duplicados para cada muestra. Se utilizaron patrones de seroalbúmina bovina (BSA) para la construcción de una curva de calibración y sobre la base de la misma se determinó la concentración proteica de las muestras.

### ***SDS-PAGE***

Los geles de poliacrilamida se realizaron rutinariamente en condiciones desnaturantes de acuerdo a la técnica descrita por Harlow y Lane, 1988. Las muestras son desnaturadas antes de su siembra mediante el agregado de buffer de muestra y su posterior calentamiento a 100°C durante 5 min. Los geles fueron teñidos con Coomassie Blue G-250.

### ***Electrotransferencia de proteínas y Western blot.***

Las proteínas separadas por SDS-PAGE se transfirieron a filtros de nitrocelulosa Hybond ECL (Amersham Biosciences) utilizando la técnica de electrotransferencia húmeda durante 1 h a 80 mA en buffer de transferencia. Una vez finalizada la transferencia, la eficiencia del proceso se verifica mediante la tinción de las membranas con una solución de Rojo Ponceau al 0,5%. Los filtros se bloquearon 1-3 h a temperatura ambiente con leche descremada 3% en TBS-T (TBS-Tween 20 al 0,1%) y luego se incubaron con los anticuerpos purificados en la dilución adecuada por 2h a temperatura ambiente, o alternativamente 16 h a 4°C. Los lavados se realizaron en TBS-T. Luego se incubó con un segundo anticuerpo acoplado a peroxidasa en una dilución 1/5.000 y se reveló por quimioluminiscencia detectada por autorradiografía, utilizando el sustrato SuperSignal (SuperSignal Chemiluminescent Substrate, PIERCE).

### ***Ensayo de intermediario tioéster de la enzima E2***

La formación de la unión tioéster entre la ubiquitina y una enzima E2 puede visualizarse por electroforesis en gel SDS [117]. Para este ensayo se utilizó la proteína recombinante purificada TbCdc34 con un tracto de seis histidinas en su extremo N-terminal, o la enzima ScCdc34 con un tracto de seis histidinas en su extremo C-terminal. La enzima E1 y la ubiquitina de humanos fueron obtenidos del *Ubiquitin Activating Kit* (Enzo life Sciences). 100nM de enzima E1 y 2.5µM de enzima E2 fueron incubados por 15, 30 o 60 minutos en presencia de 2.5µM de Ubiquitina en buffer de ubiquitinación (25mM Tris-HCl, pH 7.5, 50mM NaCl, 5mM MgCl<sub>2</sub>, 4mM ATP y 0.25mM DTT en un volumen total de 50µl. Para la enzima de *T. brucei*, el tiempo óptimo fue de 1 hora, mientras que para la enzima de levaduras el tiempo óptimo de incubación fue de 30 minutos. La reacción se detuvo por el agregado de 50µL 2X buffer de siembra no-reductor (sin DTT) y se incubó 5 minutos a 95°C, previo al análisis en un SDS-PAGE 10% y posterior Western blot con anticuerpo anti-ubiquitina (UG9510-Enzo Life Science), dilución 1:1000 en BSA/PBS-Tween.

### ***Matriz de retención de proteínas ubiquitinadas***

Para confirmar que TbCdc34 es capaz de unir ubiquitina a través de su sitio activo, se utilizó una matriz que retiene proteínas mono o poli-ubiquitinadas, independientemente del tipo de unión de ubiquitinas (K48/K63) (*UbiQapture™-Q matrix*, Biomol). Se extrajeron proteínas de parásitos que sobreexpresan TbCdc34 wt o la doble mutante con un tracto de 6 Hemaglutininas en sus extremos C-terminales. Al buffer de extracción se le adicionó 5mM de N-etilmaleimida (NEM) para inhibir la actividad de las enzimas deubiquitinantes.

- 10 µg de proteínas totales de cada una de las muestras fueron diluidas en PBS para alcanzar un volumen final de 100 µl.
- Se agregó a dos eppendorf 40 µl de la suspensión de la matriz UbiQapture y 200 µl de PBS. Se centrifugaron los tubos 5 seg. a 5000g y se removió el buffer
- A la matriz recién lavada, se le agregó cada una de las muestras de proteínas (100 µl).
- Se incubaron las muestras con la matriz por 2 horas a 4°C en un rotor horizontal
- Se centrifugaron las muestras 20 seg. a 5000g para juntar la matriz. El sobrenadante de este paso se lo denominó: *Flowthrough*
- Se lavó la matriz con 200 µl buffer de lavado (9 volúmenes de PBS+1 volumen de buffer de lisis). Se centrifugó como en el paso anterior. El sobrenadante fue separado y rotulado como; *Lavado1*. Este paso se repitió 3 veces.
- Los conjugados ubiquitina-proteína fueron eluidos por el agregado de 80 µl de PBS y 25 µl buffer de siembra SDS-PAGE 5X. Luego se calentaron a 95°C por 5 min. A esta fracción se la denominó: *Eluido*
- Las muestras fueron resueltas en un gel SDS-PAGE 10%, electrotransferidas y analizadas por Western blot mediante el anticuerpo anti-HA.

### ***Sistema Ettan DIGE (Amersham Biosciences)***

El trabajo de DIGE fue realizado bajo la supervisión de Richard Burchmore en su laboratorio en Sir Henry Wellcome Functional Genomics Facility en el Instituto Biomedical and Life Sciences (IBLS) de la Universidad de Glasgow, Escocia.

El sistema Ettan™ DIGE está basado en la técnica de Electroforesis bidimensional diferencial en gel (2-D DIGE). En este enfoque las muestras proteicas son marcadas con hasta tres colorantes espectralmente diferentes, pero de masa y carga idéntica (Cy2, Cy3, y Cy5). Las proteínas marcadas son mezcladas y resueltas simultáneamente en el mismo gel 2D. La electroforesis bidimensional es una técnica de alta resolución cuyo objetivo es la separación de mezclas complejas de proteínas. La base de su elevado poder de resolución estriba precisamente en su carácter bidimensional, es decir que las proteínas son separadas secuencialmente por dos criterios físicos. En primer lugar las proteínas son separadas en un gel con gradiente de pH en condiciones desnaturizantes de acuerdo con su punto isoeléctrico (isoelectroenfoco). Tras esta separación basada en la carga, las proteínas son separadas de acuerdo con su masa molecular por electroforesis discontinua en gel de poliacrilamida en presencia de dodecil sulfato sódico (SDS). Tras la tinción del gel, las proteínas aparecen formando manchas circulares (*spots*). Los mapas de *spots* pueden ser superpuestos y comparados directamente entre las muestras resueltas en el mismo gel. Esto supone un claro avance en el análisis comparativo de la expresión diferencial de proteínas, ya que minimiza la variabilidad de los geles, disminuye el tiempo de análisis, y permite una cuantificación muy precisa del perfil de expresión. El siguiente protocolo fue optimizado para la preparación de las muestras de *T. brucei*. Para una descripción más detallada del sistema se puede consultar el manual del sistema Ettan DIGE 18-1173-17 Edición AA (Amersham bioscience).

### **1. Preparación proteica para DIGE**

Para cada muestra se colectaron  $\sim 2 \times 10^8$  células a 2000 rpm a 4°C por 10 minutos, y se lavaron 2 veces con PBS frío. El pellet de parásitos procíclicos fue lisado en 10 ml de buffer de lisis (8 M urea, 2 M tiourea, 4% p/v CHAPS, 0.02% p/v azul de bromofenol, 10 mg of DTT, 5 mL de buffer IPG) y centrifugado 2 veces a 13.000 rpm a 4°C por 10 minutos. Un volumen de 20% TCA frío fue agregado y se incubó toda la noche a -20°C. Se centrifugó la muestra a 13.000 rpm a 4°C por 10 minutos. Se descartó el sobrenadante y el pellet fue lavado 3 veces con acetona fría. Luego del secado del mismo a temperatura ambiente por 10 minutos, el pellet fue disuelto en buffer de lisis a una concentración aprox. de 5mg/ml. La preparación de las mues-

tras de parásitos sanguíneos fue la misma, excepto que el buffer de extracción utilizado fue el siguiente: 4% NP-40, 9M Urea, 2M tiourea, inhibidores de proteasas.

## **2. Marcación de las muestras con colorantes (Dyes)**

400 pmoles de CyDye fueron agregados a 10 µl de agua con la muestra (50 µg), mezclada con pipeta e incubada en hielo por 30 min en oscuridad. Se agregó un microlitro de 10 mM de lisina para frenar la reacción. Las proteínas marcadas con Cy3 o Cy5 fueron mezcladas con 200 µg de proteína no marcada.

## **3. Corrida de la primera dimensión (isoelectroenfoque)**

Se agregaron 370 µl de buffer de rehidratación (8 M urea, 2 M tiourea, 4% p/v CHAPS, 0.02% p/v azul de bromofenol, 10 mg of DTT, 5 mL de buffer IPG) a la mezcla de proteínas marcadas y no marcadas, con buffer IPG (anfolitos) correspondiente a las tiras de pH utilizadas. Las tiras inmóviles (*Drystrips*) fueron rehidratadas en presencia de la muestra. Luego se enfocaron las muestras utilizando la unidad Ettan IPGphor IEF con el siguiente configuración:

<b>TIRA INMOBIL</b>		<b>REHIDRATACIÓN</b>		
Largo	Rango de ph	Paso y modo de voltaje	Voltaje	Duración del paso (H:m)
24 cm	3-10	1 Step and Hold	30	12:00
	4-7	2 Step and Hold	300	1:00
		3 Gradient	1000	1:00
			8000	2:00
		4 Step and Hold	8000	8:00 (isoelectroenfoque)
		5 Step and Hold	1000	24:00

La configuración para las muestras del estadio sanguíneo fueron las siguientes:

500 V – 1 hora

1000V – 1 hora

8000V – 1 hora (Gradient)

8000V – 12.30 horas (Step & Hold)

#### **4. Equilibrio de tiras y corrida en segunda dimensión**

Luego del isoelectroenfoque las tiras IPG fueron puestas en tubos individuales y equilibradas 15 min en 10 ml de solución de equilibrio (75 mM Tris-HCl (pH 8.8), 6 M urea, 30% p/v glicerol, 2% p/v SDS, 0.01% p/v azul de bromofenol) con SDS y 10 mg DTT y luego 15 min del mismo buffer sin DTT, pero con 250 mg de iodoacetamida con agitación suave. La tira fue puesta en la parte superior de un gel 12.5% SDS (20x20 cm) cubierto de buffer de electroforesis (25 mM Tris-HCl, pH 8.3, 192 mM glicina, 0.2% p/v SDS) y corrida a 15 W por gel (a 25°C) hasta que el azul de bromofenol alcanzó la parte inferior del gel.

#### **5. Escaneo y adquisición de imágenes**

El gel fue escaneado con los canales Cy3 y Cy5 a una resolución de 100 micrones utilizando un Typhoon Imaging scanner 9400 (Amersham Biosciences). Los spots representativos fueron tomados para normalizar con los dos canales utilizando el programa Typhoon Scanner Control, versión 3.0 y el programa ImageQuant Tools.

#### **6. Análisis diferencial por programa Decyder**

El programa DeCyder Differential Analysis es un programa automatizado de análisis de imágenes para la detección, cuantificación, posicionamiento y análisis de abundancia de proteínas diferencial. La descripción de forma de trabajo y algoritmos excede la extensión de esta tesis. Básicamente, una vez identificados por el programa los *spots* resueltos en el gel, se procede al análisis de los volúmenes de cada spot de ambas muestras. El usuario puede determinar que grado de cambio desea detectar (p.ej. 2 veces el volumen de un spot de una y otra muestra); una vez encontrados los *spots* con esas diferencias, se seleccionan en el programa y se genera un mapa de coordenadas para indicarle luego a una estación robotica que corte la región en donde se encuentra ese spot. Luego ese pedacito de gel será digerido y enviado a su identificación por MALDI-TOF. El lector puede referirse al manual de usuario del DeCyder Differential Analysis, 18-1173-16 Edition AA.

#### **7. Análisis por Espectroscopia de Masa (MS)**

Las muestras de péptidos fueron analizadas por ESI-MS en un equipo QSTAR® XL Hybrid LC/MS/MS System. El análisis fue realizado usando un ciclo de 3 segundos

de escaneo de reconocimiento MS, seguido de cuatro análisis MS/MS de los péticos más abundantes (3 seg. por pico) [118].

Los datos generados por el espectrómetro híbrido QSTAR XL fueron analizados por el programa Applied Biosystems Analyst QS (v1.1) y la matriz automatizada Matrix Science MASCOT Daemon server (v2.1.06). Las identificaciones fueron asignadas con el motor de búsqueda MASCOT, que da una probabilidad a cada proteína según el puntaje MOWSE, utilizando una base de datos local del genoma de *T. brucei*. Solo las proteínas identificadas con un puntaje significativo ( $p \leq 0.05$ ) fueron incluidas. Cuando se identificaron varias proteínas, solo se incluyó las de mayor puntaje en los resultados.

# *ANEXO*

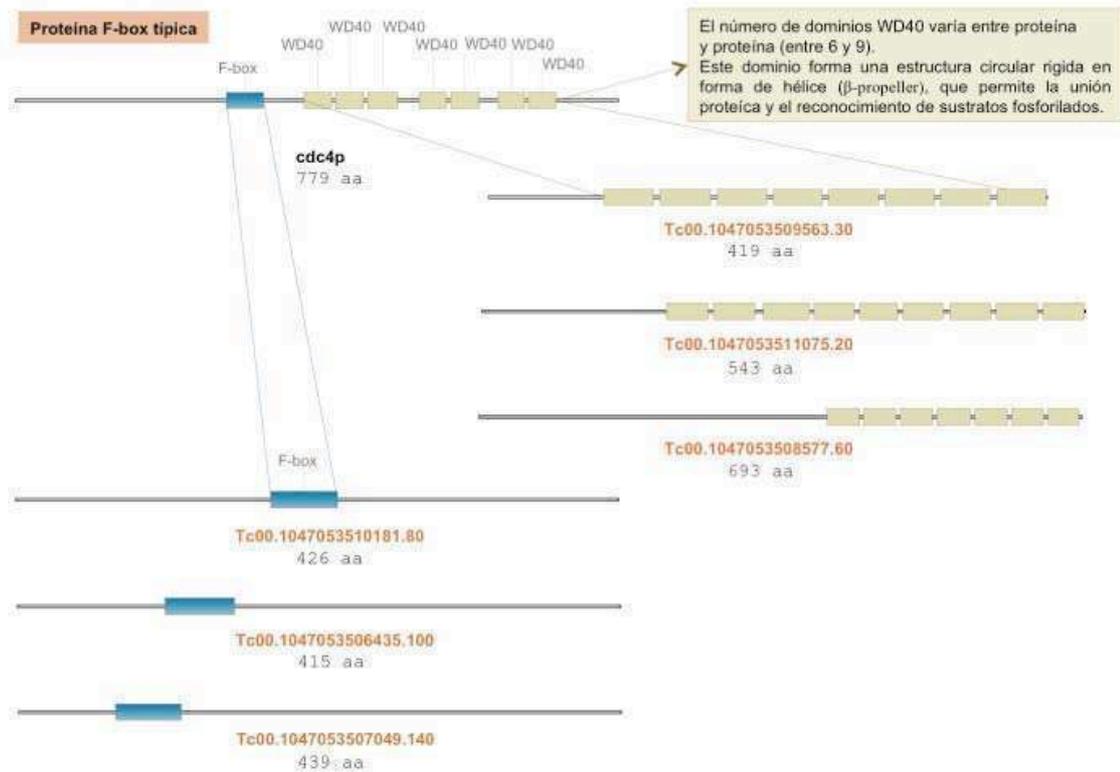
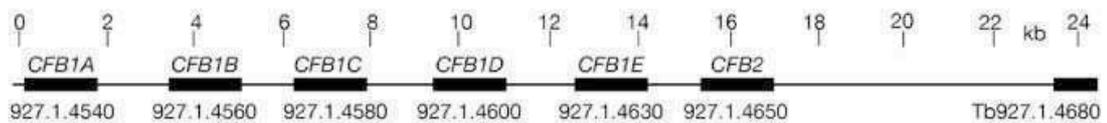
**A****B**

Figura 1 Anexo | **Identificación de proteínas homólogas a F-box.** A) Se realizó una búsqueda bioinformática de proteínas F-box en *T. cruzi* utilizando la proteína F-box Cdc4 de levaduras. Se pudo determinar que en el genoma del parásito los dominios F-box y WD-40 característicos de estas proteínas no se encuentran codificados en el mismo gen, sino en marcos abiertos de lectura diferentes. Se indican los genes identificados con sus números de acceso, y los dominios que ellos codifican. B) En *T. brucei* los genes que codifican para proteínas con el dominio F-box se encuentran agrupados en el cromosoma 1. Se representa el locus del cromosoma 1 donde estos se encuentran agrupados, con sus números de acceso. Esta última gráfica fue tomada de [103].

# ***BIBLIOGRAFÍA***

1. McKean PG (2003) Coordination of cell cycle and cytokinesis in *Trypanosoma brucei*. *Curr Opin Microbiol* 6: 600-607.
2. Stuart K, Brun R, Croft S, Fairlamb A, Gürtler R, et al. (2008) Kinetoplastids: related protozoan pathogens, different diseases. *J Clin Invest* 118: 1301-1310.
3. Fenn K, Matthews KR (2007) The cell biology of *Trypanosoma brucei* differentiation. *Curr Opin Microbiol* 10: 539-546.
4. Overath P, Engstler M (2004) Endocytosis, membrane recycling and sorting of GPI-anchored proteins: *Trypanosoma brucei* as a model system. *Mol Microbiol* 53: 735-744.
5. Bastin P, Sherwin T, Gull K (1998) Paraflagellar rod is vital for trypanosome motility. *Nature* 391: 548.
6. Matthews KR (2005) The developmental cell biology of *Trypanosoma brucei*. *J Cell Sci* 118: 283-290.
7. Madison-Antenucci S, Grams J, Hajduk SL (2002) Editing machines: the complexities of trypanosome RNA editing. *Cell* 108: 435-438.
8. Mair G, Shi H, Li H, Djikeng A, Aviles HO, et al. (2000) A new twist in trypanosome RNA metabolism: cis-splicing of pre-mRNA. *RNA* 6: 163-169.
9. Castro JA, de Mecca MM, Bartel LC (2006) Toxic side effects of drugs used to treat Chagas' disease (American trypanosomiasis). *Hum Exp Toxicol* 25: 471-479.
10. Turner CM, Barry JD, Maudlin I, Vickerman K (1988) An estimate of the size of the metacyclic variable antigen repertoire of *Trypanosoma brucei rhodesiense*. *Parasitology* 97 ( Pt 2): 269-276.
11. Gull K (2002) The cell biology of parasitism in *Trypanosoma brucei*: insights and drug targets from genomic approaches? *Curr Pharm Des* 8: 241-256.
12. Kennedy PG (2004) Human African trypanosomiasis of the CNS: current issues and challenges. *J Clin Invest* 113: 496-504.
13. Moser BA, Russell P (2000) Cell cycle regulation in *Schizosaccharomyces pombe*. *Curr Opin Microbiol* 3: 631-636.
14. Morgan DO (1997) Cyclin-dependent kinases: engines, clocks, and microprocessors. *Annu Rev Cell Dev Biol* 13: 261-291.
15. Vaughan S, Gull K (2008) The structural mechanics of cell division in *Trypanosoma brucei*. *Biochem Soc Trans* 36: 421-424.
16. Hammarton TC, Mottram JC, Doerig C (2003) The cell cycle of parasitic protozoa: potential for chemotherapeutic exploitation. *Prog Cell Cycle Res* 5: 91-101.

17. Parsons M, Worthey EA, Ward PN, Mottram JC (2005) Comparative analysis of the kinomes of three pathogenic trypanosomatids: *Leishmania major*, *Trypanosoma brucei* and *Trypanosoma cruzi*. *BMC Genomics* 6: 127.
18. Hammarton TC, Clark J, Douglas F, Boshart M, Mottram JC (2003) Stage-specific differences in cell cycle control in *Trypanosoma brucei* revealed by RNA interference of a mitotic cyclin. *J Biol Chem* 278: 22877-22886.
19. Muñoz MJ, Santori MI, Rojas F, Gómez EB, Téllez-Iñón MT (2006) *Trypanosoma cruzi* Tcp12CKS1 interacts with parasite CRKs and rescues the p13SUC1 fission yeast mutant. *Molecular and Biochemical Parasitology* 147: 154-162.
20. Hammarton TC (2007) Cell cycle regulation in *Trypanosoma brucei*. *Molecular and Biochemical Parasitology* 153: 1-8.
21. Hammarton TC, Engstler M, Mottram JC (2004) The *Trypanosoma brucei* cyclin, CYC2, is required for cell cycle progression through G1 phase and for maintenance of procyclic form cell morphology. *J Biol Chem* 279: 24757-24764.
22. Tu X, Wang CC (2005) Pairwise knockdowns of cdc2-related kinases (CRKs) in *Trypanosoma brucei* identified the CRKs for G1/S and G2/M transitions and demonstrated distinctive cytokinetic regulations between two developmental stages of the organism. *Eukaryotic Cell* 4: 755-764.
23. Santori MI, Laría S, Gómez EB, Espinosa I, Galanti N, et al. (2002) Evidence for CRK3 participation in the cell division cycle of *Trypanosoma cruzi*. *Molecular and Biochemical Parasitology* 121: 225-232.
24. Kerscher O, Felberbaum R, Hochstrasser M (2006) Modification of proteins by ubiquitin and ubiquitin-like proteins. *Annu Rev Cell Dev Biol* 22: 159-180.
25. Thrower JS, Hoffman L, Rechsteiner M, Pickart CM (2000) Recognition of the polyubiquitin proteolytic signal. *EMBO J* 19: 94-102.
26. Chan NL, Hill CP (2001) Defining polyubiquitin chain topology. *Nat Struct Biol* 8: 650-652.
27. Haglund K, Dikic I (2005) Ubiquitylation and cell signaling. *EMBO J* 24: 3353-3359.
28. Kirkpatrick DS, Denison C, Gygi S (2005) Weighing in on ubiquitin: the expanding role of mass-spectrometry-based proteomics. *Nat Cell Biol* 7: 750-757.
29. Bylebyl GR, Belichenko I, Johnson ES (2003) The SUMO isopeptidase Ulp2 prevents accumulation of SUMO chains in yeast. *J Biol Chem* 278: 44113-44120.
30. Schulman B, Wade Harper J (2009) Ubiquitin-like protein activation by E1 enzymes: the apex for downstream signalling pathways. *Nat Rev Mol Cell Biol* 10: 319-331.

31. van Wijk SJ, Marc Timmers HT (2009) The family of ubiquitin-conjugating enzymes (E2s): deciding between life and death of proteins. *FASEB J*.
32. Huang DT, Hunt HW, Zhuang M, Ohi MD, Holton JM, et al. (2007) Basis for a ubiquitin-like protein thioester switch toggling E1-E2 affinity. *Nature* 445: 394-398.
33. Ye Y, Rape M (2009) Building ubiquitin chains: E2 enzymes at work. *Nat Rev Mol Cell Biol* 10: 755-764.
34. Skowyra D, Craig KL, Tyers M, Elledge SJ, Harper JW (1997) F-box proteins are receptors that recruit phosphorylated substrates to the SCF ubiquitin-ligase complex. *Cell* 91: 209-219.
35. Rape M, Kirschner M (2004) Autonomous regulation of the anaphase-promoting complex couples mitosis to S-phase entry. *Nature* 432: 588-595.
36. Williamson A, Wickliffe KE, Mellone BG, Song L, Karpen GH, et al. (2009) Identification of a physiological E2 module for the human anaphase-promoting complex. *Proc Natl Acad Sci USA* 106: 18213-18218.
37. Rodrigobrenni M, Morgan D (2007) Sequential E2s Drive Polyubiquitin Chain Assembly on APC Targets. *Cell* 130: 127-139.
38. Deshaies RJ, Joazeiro CA (2009) RING domain E3 ubiquitin ligases. *Annu Rev Biochem* 78: 399-434.
39. Weissman AM (2001) Themes and variations on ubiquitylation. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2: 169-178.
40. Jin J, Cardozo T, Lovering RC, Elledge SJ, Pagano M, et al. (2004) Systematic analysis and nomenclature of mammalian F-box proteins. *Genes Dev* 18: 2573-2580.
41. Margottin-Goguet F, Hsu JY, Loktev A, Hsieh HM, Reimann JD, et al. (2003) Prophase destruction of Emi1 by the SCF(betaTrCP/Slimb) ubiquitin ligase activates the anaphase promoting complex to allow progression beyond pro-metaphase. *Dev Cell* 4: 813-826.
42. Wei W, Ayad NG, Wan Y, Zhang GJ, Kirschner M, et al. (2004) Degradation of the SCF component Skp2 in cell-cycle phase G1 by the anaphase-promoting complex. *Nature* 428: 194-198.
43. Wickliffe K, Williamson A, Jin L, Rape M (2009) The multiple layers of ubiquitin-dependent cell cycle control. *Chem Rev* 109: 1537-1548.
44. Sclafani RA, Holzen TM (2007) Cell cycle regulation of DNA replication. *Annu Rev Genet* 41: 237-280.

45. Swindle J, Ajioka J, Eisen H, Sanwal B, Jacquemot C, et al. (1988) The genomic organization and transcription of the ubiquitin genes of *Trypanosoma cruzi*. *EMBO J* 7: 1121-1127.
46. Kirchhoff LV, Kim KS, Engman DM, Donelson JE (1988) Ubiquitin genes in trypanosomatidae. *J Biol Chem* 263: 12698-12704.
47. Pearce MJ, Mintseris J, Ferreyra J, Gygi S, Darwin KH (2008) Ubiquitin-like protein involved in the proteasome pathway of *Mycobacterium tuberculosis*. *Science* 322: 1104-1107.
48. Lowrie DJ, Giffin BF, Ventullo RM (1993) The ubiquitin-ligase system in *Trypanosoma brucei brucei*. *Am J Trop Med Hyg* 49: 545-551.
49. Yao Y, Huang L, Krutchinsky A, Wong ML, Standing KG, et al. (1999) Structural and functional characterizations of the proteasome-activating protein PA26 from *Trypanosoma brucei*. *J Biol Chem* 274: 33921-33930.
50. de Diego JL, Katz JM, Marshall P, Gutiérrez B, Manning JE, et al. (2001) The ubiquitin-proteasome pathway plays an essential role in proteolysis during *Trypanosoma cruzi* remodeling. *Biochemistry* 40: 1053-1062.
51. Li Y, Li Z, Wang CC (2003) Differentiation of *Trypanosoma brucei* may be stage non-specific and does not require progression of cell cycle. *Mol Microbiol* 49: 251-265.
52. Cardoso J, Soares M, Menna-Barreto R, Bloas R, Sotomaior V, et al. (2008) Inhibition of proteasome activity blocks *Trypanosoma cruzi* growth and metacyclogenesis. *Parasitol Res* 103: 941-951.
53. Chung W, Leung K, Carrington M, Field M (2008) Ubiquitylation is required for degradation of transmembrane surface proteins in trypanosomes. *Traffic* 9: 1681-1697.
54. Shang Q, Xu C, Zhang J, Zhang X, Tu X (2009) Solution structure of SUMO from *Trypanosoma brucei* and its interaction with Ubc9. *Proteins* 76: 266-269.
55. Kumar P, Wang CC (2005) Depletion of anaphase-promoting complex or cyclosome (APC/C) subunit homolog APC1 or CDC27 of *Trypanosoma brucei* arrests the procyclic form in metaphase but the bloodstream form in anaphase. *J Biol Chem* 280: 31783-31791.
56. Gazdoui S, Yamoah K, Wu K, Pan ZQ (2007) Human Cdc34 employs distinct sites to coordinate attachment of ubiquitin to a substrate and assembly of polyubiquitin chains. *Mol Cell Biol* 27: 7041-7052.
57. Liu Y, Mathias N, Steussy CN, Goebel MG (1995) Intragenic suppression among CDC34 (UBC3) mutations defines a class of ubiquitin-conjugating catalytic domains. *Mol Cell Biol* 15: 5635-5644.

58. Wu K, Chen A, Tan P, Pan ZQ (2002) The Nedd8-conjugated ROC1-CUL1 core ubiquitin ligase utilizes Nedd8 charged surface residues for efficient polyubiquitin chain assembly catalyzed by Cdc34. *J Biol Chem* 277: 516-527.
59. Sadowski M, Mawson A, Baker R, Sarcevic B (2007) Cdc34 C-terminal tail phosphorylation regulates Skp1/cullin/F-box (SCF)-mediated ubiquitination and cell cycle progression. *Biochem J* 405: 569.
60. Patton EE, Willems AR, Sa D, Kuras L, Thomas D, et al. (1998) Cdc53 is a scaffold protein for multiple Cdc34/Skp1/F-box protein complexes that regulate cell division and methionine biosynthesis in yeast. *Genes Dev* 12: 692-705.
61. Osaka F, Saeki M, Katayama S, Aida N, Toh-E A, et al. (2000) Covalent modifier NEDD8 is essential for SCF ubiquitin-ligase in fission yeast. *EMBO J* 19: 3475-3484.
62. Petroski MD, Deshaies RJ (2005) Function and regulation of cullin-RING ubiquitin ligases. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6: 9-20.
63. Ngô H, Tschudi C, Gull K, Ullu E (1998) Double-stranded RNA induces mRNA degradation in *Trypanosoma brucei*. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 14687-14692.
64. Alsford S, Horn D (2008) Single-locus targeting constructs for reliable regulated RNAi and transgene expression in *Trypanosoma brucei*. *Molecular and Biochemical Parasitology* 161: 76-79.
65. Subramaniam C, Veazey P, Redmond S, Hayes-Sinclair J, Chambers E, et al. (2006) Chromosome-wide analysis of gene function by RNA interference in the african trypanosome. *Eukaryotic Cell* 5: 1539-1549.
66. Redmond S, Vadivelu J, Field MC (2003) RNAit: an automated web-based tool for the selection of RNAi targets in *Trypanosoma brucei*. *Mol Biochem Parasitol* 128: 115-118.
67. Wang Z, Morris JC, Drew ME, Englund PT (2000) Inhibition of *Trypanosoma brucei* gene expression by RNA interference using an integratable vector with opposing T7 promoters. *J Biol Chem* 275: 40174-40179.
68. Hammarton TC, Lillico SG, Welburn SC, Mottram JC (2005) *Trypanosoma brucei* MOB1 is required for accurate and efficient cytokinesis but not for exit from mitosis. *Mol Microbiol* 56: 104-116.
69. Hammarton TC, Kramer S, Tetley L, Boshart M, Mottram JC (2007) *Trypanosoma brucei* Polo-like kinase is essential for basal body duplication, kDNA segregation and cytokinesis. *Mol Microbiol* 65: 1229-1248.
70. Bai C, Sen P, Hofmann K, Ma L, Goebel M, et al. (1996) SKP1 connects cell cycle regulators to the ubiquitin proteolysis machinery through a novel motif, the F-box. *Cell* 86: 263-274.

71. Krek W (1998) Proteolysis and the G1-S transition: the SCF connection. *Curr Opin Genet Dev* 8: 36-42.
72. Kelly S, Reed J, Kramer S, Ellis L, Webb H, et al. (2007) Functional genomics in *Trypanosoma brucei*: a collection of vectors for the expression of tagged proteins from endogenous and ectopic gene loci. *Molecular and Biochemical Parasitology* 154: 103-109.
73. Banerjee A, Deshaies RJ, Chau V (1995) Characterization of a dominant negative mutant of the cell cycle ubiquitin-conjugating enzyme Cdc34. *J Biol Chem* 270: 26209-26215.
74. Hauser P, Hofmann F (2005) High-throughput assay to monitor formation of the E2-ubiquitin thioester intermediate. *Meth Enzymol* 398: 87-100.
75. (2007) *Methods in Enzymology Vol 398 Ubiquitin and Protein Degradation, Part A* 2005. 655.
76. Ralston KS, Kabututu ZP, Melehani JH, Oberholzer M, Hill KL (2009) The *Trypanosoma brucei* Flagellum: Moving Parasites in New Directions. *Annu Rev Microbiol*.
77. Chowdhury AR, Zhao Z, Englund PT (2008) Effect of hydroxyurea on procyclic *Trypanosoma brucei*: an unconventional mechanism for achieving synchronous growth. *Eukaryotic Cell* 7: 425-428.
78. Mathias N, Steussy CN, Goebel MG (1998) An essential domain within Cdc34p is required for binding to a complex containing Cdc4p and Cdc53p in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 273: 4040-4045.
79. Ravid T, Hochstrasser M (2007) Autoregulation of an E2 enzyme by ubiquitin-chain assembly on its catalytic residue. *Nat Cell Biol* 9: 422-427.
80. Rothberg KG, Burdette DL, Pfannstiel J, Jetton N, Singh R, et al. (2006) The RACK1 homologue from *Trypanosoma brucei* is required for the onset and progression of cytokinesis. *J Biol Chem* 281: 9781-9790.
81. Shearer K, Vaughan S, Minchin J, Hughes K, Gull K, et al. (2005) Variant surface glycoprotein RNA interference triggers a precytokinesis cell cycle arrest in African trypanosomes. *Proc Natl Acad Sci USA* 102: 8716-8721.
82. Griffiths S, Portman N, Taylor P, Gordon S, Ginger M, et al. (2007) RNA Interference Mutant Induction In Vivo Demonstrates the Essential Nature of Trypanosome Flagellar Function during Mammalian Infection. *Eukaryotic Cell* 6: 1248-1250.
83. Westermeier R, Naven T (2002) *Proteomics in Practice-A Laboratory Manual of Proteome Analysis*. Wiley-VCH, Weinheim.

84. Inoue M, Nakamura Y, Yasuda K, Yasaka N, Hara T, et al. (2005) The 14-3-3 proteins of *Trypanosoma brucei* function in motility, cytokinesis, and cell cycle. *J Biol Chem* 280: 14085-14096.
85. van Deursen FJ, Thornton DJ, Matthews KR (2003) A reproducible protocol for analysis of the proteome of *Trypanosoma brucei* by 2-dimensional gel electrophoresis. *Molecular and Biochemical Parasitology* 128: 107-110.
86. Acestor N, Masina S, Walker J, Saravia NG, Fasel N, et al. (2002) Establishing two-dimensional gels for the analysis of *Leishmania* proteomes. *Proteomics* 2: 877-879.
87. de Graffenried CL, Ho HH, Warren G (2008) Polo-like kinase is required for Golgi and bilobe biogenesis in *Trypanosoma brucei*. *J Cell Biol* 181: 431-438.
88. Umeyama T, Wang CC (2008) Polo-like kinase is expressed in S/G2/M phase and associated with the flagellum attachment zone in both procyclic and bloodstream forms of *Trypanosoma brucei*. *Eukaryotic Cell* 7: 1582-1590.
89. O'Connell MJ, Krien MJE, Hunter T (2003) Never say never. The NIMA-related protein kinases in mitotic control. *Trends Cell Biol* 13: 221-228.
90. Mahjoub MR, Mahjoub MR, Rasi MQ, Rasi MQ, Quarmby LM, et al. (2004) A NIMA-related Kinase, Fa2p, Localizes to a Novel Site in the Proximal Cilia of *Chlamydomonas* and Mouse Kidney Cells. *Mol Biol Cell* 15: 5172.
91. Grant KM (2008) Targeting the cell cycle in the pursuit of novel chemotherapies against parasitic protozoa. *Curr Pharm Des* 14: 917-924.
92. Zhimin L, Tony H (2009) Degradation of activated protein kinases by ubiquitination. *Annu Rev Biochem* 78: 435-475.
93. Kamura T, Conrad MN, Yan Q, Conaway RC, Conaway JW (1999) The Rbx1 subunit of SCF and VHL E3 ubiquitin ligase activates Rub1 modification of cullins Cdc53 and Cul2. *Genes Dev* 13: 2928-2933.
94. Swaroop M, Wang Y, Miller P, Duan H, Jatkoje T, et al. (2000) Yeast homolog of human SAG/ROC2/Rbx2/Hrt2 is essential for cell growth, but not for germination: chip profiling implicates its role in cell cycle regulation. *Oncogene* 19: 2855-2866.
95. Chandler J, Vadoros AV, Mozeleski B, Klingbeil MM (2008) Stem-loop silencing reveals that a third mitochondrial DNA polymerase, POLID, is required for kinetoplast DNA replication in trypanosomes. *Eukaryotic Cell* 7: 2141-2146.
96. Sasagawa Y, Urano T, Kohara Y, Takahashi H, Higashitani A (2003) *Caenorhabditis elegans* RBX1 is essential for meiosis, mitotic chromosomal condensation and segregation, and cytokinesis. *Genes Cells* 8: 857-872.

97. Kipreos ET, Lander LE, Wing JP, He WW, Hedgecock EM (1996) *cul-1* is required for cell cycle exit in *C. elegans* and identifies a novel gene family. *Cell* 85: 829-839.
98. Willems AR, Lanker S, Patton EE, Craig KL, Nason TF, et al. (1996) Cdc53 targets phosphorylated G1 cyclins for degradation by the ubiquitin proteolytic pathway. *Cell* 86: 453-463.
99. Nakayama KI, Nakayama K (2006) Ubiquitin ligases: cell-cycle control and cancer. *Nat Rev Cancer* 6: 369-381.
100. Seol JH, Feldman RM, Zachariae W, Correll CC, Lyapina S, et al. (1999) Cdc53/cullin and the essential Hrt1 RING-H2 subunit of SCF define a ubiquitin ligase module that activates the E2 enzyme Cdc34. *Genes Dev* 13: 1614-1626.
101. Benmaamar R, Pagano M (2005) Involvement of the SCF complex in the control of Cdh1 degradation in S-phase. *Cell Cycle* 4: 1230-1232.
102. Cardozo T, Pagano M (2004) The SCF ubiquitin ligase: insights into a molecular machine. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5: 739-751.
103. Benz C, Clayton CE (2007) The F-box protein CFB2 is required for cytokinesis of bloodstream-form *Trypanosoma brucei*. *Molecular and Biochemical Parasitology* 156: 217-224.
104. Patton EE, Willems AR, Tyers M (1998) Combinatorial control in ubiquitin-dependent proteolysis: don't Skp the F-box hypothesis. *Trends Genet* 14: 236-243.
105. Kumar P, Wang CC (2006) Dissociation of cytokinesis initiation from mitotic control in a eukaryote. *Eukaryotic Cell* 5: 92-102.
106. Reymond F, Wirbelauer C, Krek W (2000) Association of human ubiquitin-conjugating enzyme CDC34 with the mitotic spindle in anaphase. *J Cell Sci* 113 (Pt 10): 1687-1694.
107. He CY, Pypaert M, Warren G (2005) Golgi duplication in *Trypanosoma brucei* requires Centrin2. *Science* 310: 1196-1198.
108. Varelas X, Ptak C, Ellison MJ (2003) Cdc34 self-association is facilitated by ubiquitin thiolester formation and is required for its catalytic activity. *Mol Cell Biol* 23: 5388-5400.
109. Cardozo T, Pagano M (2007) Wrenches in the works: drug discovery targeting the SCF ubiquitin ligase and APC/C complexes. *BMC Biochem* 8 Suppl 1: S9.
110. Guédat P, Colland F (2007) Patented small molecule inhibitors in the ubiquitin proteasome system. *BMC Biochem* 8 Suppl 1: S14.
111. Jetton N, Rothberg KG, Hubbard J, Wise J, Li Y, et al. (2009) The cell cycle as a therapeutic target against *Trypanosoma brucei*: Hesperadin inhibits Aurora ki-

- nase-1 and blocks mitotic progression in bloodstream forms. *Mol Microbiol*: 17.
112. Portman N, Lacomble S, Thomas B, Mckean P, Gull K (2008) Combining RNA Interference Mutants and Comparative Proteomics to Identify Protein Components and Dependences in a Eukaryotic Flagellum. *Journal of Biological Chemistry* 284: 5610-5619.
113. Van Hellemond JJ, Mottram JC (2000) The CYC3 gene of trypanosoma brucei encodes a cyclin with a short half-life. *Molecular and Biochemical Parasitology* 111: 275-282.
114. Muñoz MJ, Bejarano ER, Daga RR, Jimenez J (1999) The identification of Wos2, a p23 homologue that interacts with Wee1 and Cdc2 in the mitotic control of fission yeasts. *Genetics* 153: 1561-1572.
115. Nett I, Martin D, Miranda-Saavedra D, Lamont D, Barber J, et al. (2009) The Phosphoproteome of Bloodstream Form Trypanosoma brucei, Causative Agent of African Sleeping Sickness. *Molecular & Cellular Proteomics* 8: 1527-1538.
116. Wirtz E, Leal S, Ochatt C, Cross GA (1999) A tightly regulated inducible expression system for conditional gene knock-outs and dominant-negative genetics in Trypanosoma brucei. *Molecular and Biochemical Parasitology* 99: 89-101.
117. Scheffner M, Nuber U, Huibregtse JM (1995) Protein ubiquitination involving an E1-E2-E3 enzyme ubiquitin thioester cascade. *Nature* 373: 81-83.
118. Bridges DJ, Pitt AR, Hanrahan O, Brennan K, Voorheis HP, et al. (2008) Characterisation of the plasma membrane subproteome of bloodstream form Trypanosoma brucei. *Proteomics* 8: 83-99.
119. Willems AR, Schwab M, Tyers M (2004) A hitchhiker's guide to the cullin ubiquitin ligases: SCF and its kin. *Biochim Biophys Acta* 1695: 133-170.
120. Cuervo P, Domont GB, Jesus JBD (2010) Proteomics of trypanosomatids of human medical importance. *Journal of Proteomics*: 1-23.
121. Nakayama KI, Nakayama K (2005) Regulation of the cell cycle by SCF-type ubiquitin ligases. *Semin Cell Dev Biol* 16: 323-333.
122. Harper JW, Burton JL, Solomon MJ (2002) The anaphase-promoting complex: it's not just for mitosis any more. *Genes Dev* 16: 2179-2206.
123. Wäsch R, Engelbert D (2005) Anaphase-promoting complex-dependent proteolysis of cell cycle regulators and genomic instability of cancer cells. *Oncogene* 24: 1-10.