

**PAPEL DE LA DESOXIURIDINA TRIFOSFATO NUCLEÓTIDO
HIDROLASA EN LA VIABILIDAD CELULAR Y LA INTEGRIDAD
GENÉTICA EN *Trypanosoma brucei***



**Instituto de Parasitología y Biomedicina “López- Neyra”.
Consejo Superior Investigaciones Científicas (C.S.I.C.)
Granada**

VÍCTOR MANUEL CASTILLO ACOSTA

Tesis Doctoral

Mayo 2007

**PAPEL DE LA DESOXIURIDINA TRIFOSFATO NUCLEÓTIDO
HIDROLASA EN LA VIABILIDAD CELULAR Y LA INTEGRIDAD
GENÉTICA EN *Trypanosoma brucei***

Memoria presentada por el Licenciado
V́ctor Manuel Castillo Acosta para optar
al grado de Doctor en Ciencias Qúmicas.

Granada, Mayo de 2007

V́ctor Manuel Castillo Acosta

Esta tesis ha sido realizada en el Instituto de Parasitología y Biomedicina “López-Neyra” (C.S.I.C.) bajo la dirección de los Doctores Dolores González Pacanowska y Luis Miguel Ruiz Pérez, Investigador Científico y Científico Titular respectivamente del Consejo Superior de Investigaciones Científicas.

Dolores González Pacanowska

Investigadora Científica

Luis Miguel Ruiz Pérez

Científico Titular

Agradecimientos

Quisiera expresar mi más sincero agradecimiento a los doctores Dolores González Pacanowska y Luis Miguel Ruiz Pérez por haberme dado la oportunidad de realizar esta tesis en su laboratorio, y por la ayuda y el apoyo tan sincero que me han prestado en todo momento.

A la Junta de Andalucía por haberme subvencionado esta tesis.

A mis compañeros del laboratorio.

A mi familia por su apoyo y ayuda prestada a lo largo del desarrollo de esta tesis.

Agradecer muy especialmente a Ana por su ayuda, apoyo y comprensión durante los años dedicados a la realización de esta tesis

**A mis padres, Antonio y María;
hermanos, Antonio y Belén;
abuela, Francisca;
y muy especialmente a Ana.**

A mis compañeros de laboratorio.

INDICE

A. INTRODUCCIÓN	1
A.I. INTRODUCCIÓN	1
A.II. CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LA ESPECIE <i>Trypanosoma brucei</i>	4
A.II.1. Taxonomía y ciclo de vida	6
A.II.2. Biología molecular <i>Trypanosoma brucei</i>	4
A.II.3. Bioquímica de los tripanosomátidos	11
A.III. LA DESOXIURIDINA TRIFOSFATO NUCLEÓTIDO HIDROLASA Y SU IMPORTANCIA BIOLÓGICA	14
A.III.1. Síntesis de novo de nucleótidos pirimidínicos	14
A.III.2. Ruta de recuperación y catabolismo de nucleótidos pirimidínicos	17
A.III.3. Implicaciones de la presencia de uracilo en el DNA	19
A.III.4. Mecanismo de escisión-reparación de bases	20
A.III.5. Función biológica de la dUTPasa	23
A.III.6. Enzimas “house-cleaning”	24
A.IV. CARACTERÍSTICAS PRINCIPALES DE LA dUTPasa	27
A.IV.1. La dUTPasa, una enzima ubicua y conservada	27
A.IV.1.1. Distribución filogenética y evolución de las diferentes dUTPasas	27
A.IV.1.2. Estructura tridimensional de las dUTPasas diméricas	31
A.IV.1.3. Estructura tridimensional de las dUTPasas triméricas y características de la especificidad de sustrato	39
A.IV.1.4. Estructura tridimensional de las dUTPasas monoméricas y características de la especificidad de sustrato	42
A.IV.2. Propiedades cinéticas de las dUTPasas	43
A.IV.3. Mecanismos de regulación de las dUTPasas	45
A.IV.4. Localización intracelular de las dUTPasas	48
A.V. LA dUTPasa ES UNA ENZIMA ESENCIAL PARA LA VIABILIDAD CELULAR	50
A.VI. LA dUTPasa DIMÉRICA, UNA DIANA TERAPEÚTICA FRENTE A ENFERMEDADES PROTOZOARIAS	52

B. MATERIAL Y MÉTODOS	54
B.I. MATERIAL	54
B.I.1. LÍNEAS CELULARES	54
B.I.1.1. Parásitos	54
B.I.1.2. BACTERIAS	55
B.I.2. MEDIOS DE CULTIVO	55
B.I.2.1. Para parásitos	55
B.I.2.1.1. Compuestos adicionados a los medios de cultivo	58
B.I.3. TAMPONES Y SOLUCIONES	61
B.I.4. MATERIAL PARA BIOLOGÍA MOLECULAR	62
B.I.4.1. Vectores	62
B.I.4.2. Oligonucleótidos	63
B.I.5. SOFTWARE	65
B.II. MÉTODOS	66
B.II.1. CULTIVO Y MANIPULACIÓN DE CÉLULAS	66
B.II.1.1. Parásitos	66
B.II.1.1.1. Cultivo de <i>Trypanosoma brucei</i>	66
B.II.1.1.2. Criopreservación y descongelación de <i>Trypanosoma brucei</i>	67
B.II.1.1.3. Determinación de la Dosis Inhibitoria 50 de crecimiento (IC50)	68
B.II.1.1.4. Transfección estable por electroporación	68
B.II.1.1.5. Obtención de extractos totales de parásitos	70
B.II.1.2. Bacterias	71
B.II.2. TÉCNICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR	71
B.II.3. TÉCNICAS PARA EL ESTUDIO DE LA PROTEÍNA	71
B.II.3.1. Aislamiento y clonado del gen <i>TbdUTen</i> pET 11c	71
B.II.3.2. Obtención de extractos de <i>E. coli</i> que sobreexpresan la <i>TbdUTPasa</i>	72
B.II.3.2.1. Inducción de la proteína recombinante <i>TbdUTPasa</i> con IPTG	72
B.II.3.2.2. Preparación de extractos solubles de bacterias	72
B.II.3.3. Purificación de la <i>TbdUTPasa</i> recombinante	73
B.II.3.3.1. Cromatografía de adsorción en columna de hidroxapatito	73
B.II.3.3.2. Cromatografía de intercambio iónico	74
B.II.3.4. Caracterización cinética de la proteína dUTPasa de <i>Trypanosoma brucei</i>	74
B.II.3.4.1. Determinación espectrofotométrica de la actividad dUTPasa	74

B.II.4. TÉCNICAS INMUNOLÓGICAS _____	77
B.II.4.1. Obtención de anticuerpos policlonales frente a la dUTPasa de <i>T. brucei</i> ____	77
B.II.4.1.1. Inmunizaciones _____	77
B.II.4.1.2. Obtención de suero _____	77
B.II.4.1.3. Purificación del anticuerpo anti- <i>TbdUTPasa</i> _____	78
B.II.4.2. Transferencia de proteínas, western blot _____	78
B.II.4.3. Inmunodetección _____	79
B.II.4.4. Deshibridación de membranas para detección de proteínas _____	79
B.II.5. ESTUDIO DE LA LOCALIZACIÓN INTRACELULAR DE LA dUTPasa DE <i>T. brucei</i> _____	80
B.II.5.1. Inmunocitoquímica y observación por microscopía electrónica de transmisión	80
B.II.5.1.1. Preparación de inclusiones de parásitos. Procesamiento para inmunocitoquímica (LRWhite) _____	80
B.II.5.1.2. Inmunomicroscopía electrónica _____	81
B.II.5.2. Inmunofluorescencia _____	82
B.II.6. SILENCIAMIENTO MEDIANTE RNAi DE LA EXPRESIÓN DE LA dUTPasa EN <i>Trypanosoma brucei</i> _____	82
B.II.6.1. Construcción de plásmidos para el silenciamiento génico mediante RNAi ____	83
B.II.6.2. Estudio del efecto del RNAi sobre el crecimiento celular _____	84
B.II.6.3. Cuantificación de los niveles intracelulares de los nucleótidos de uracilo y timina _____	84
B.II.6.4. Determinación del efecto combinado del RNAi de la dUTPasa y la inhibición por metotrexato en el crecimiento celular _____	85
B.II.6.5. Efecto de la timidina y timina sobre el RNAi de la dUTPasa _____	86
B.II.6.6. Análisis mediante FACS del ciclo celular de <i>Trypanosoma brucei</i> _____	86
B.II.6.7. Medida de las actividades enzimáticas uracil DNA glicosilasa y AP endonucleasa _____	87
B.II.6.8. Estudio del efecto de un doble silenciamiento de los genes de la dUTPasa y de la UNG en <i>Trypanosoma brucei</i> _____	88
B.II.6.8.1. Construcción de plásmidos para el silenciamiento génico mediante RNAi _	88
B.II.6.8.2. Estudio del efecto del RNAi de la UNG sobre el crecimiento celular ____	89
B.II.6.8.3. Estudio del efecto del doble RNAi de la dUTPasa y UNG sobre el crecimiento celular _____	89

C. OBJETIVOS	90
D. RESULTADOS	92
D.I. AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DEL GEN DE LA DESOXIURIDINA 5'-TRIFOSFATO NUCLEÓTIDO HIDROLASA DE <i>Trypanosoma brucei</i>	92
D.I.1. Aislamiento del gen <i>TbdUT</i>	92
D.II. EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA RECOMBINANTE dUTPasa DE <i>Trypanosoma brucei</i> EN EL SISTEMA HETERÓLOGO <i>E. coli</i>	93
D.II.1. Construcción del sistema de expresión	93
D.III. PURIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN CINÉTICA DE LA dUTPasa DE <i>Trypanosoma brucei</i>	95
D.III.1. Purificación de la proteína recombinante <i>TbdUTPasa</i>	95
D.III.2. Determinación cuantitativa de la actividad <i>TbdUTPasa</i>	96
D.III.3. Determinación de la masa molecular de la proteína nativa	97
D.III.4. Determinación de K_m y V_{max} para el dUTP y dUDP. Inhibición por producto: K_i para el dUMP	98
D.III.5. Efecto del ión divalente: requerimiento de magnesio	102
D.III.6. Estudio de la especificidad de sustrato	103
D.IV. LOCALIZACIÓN INTRACELULAR DE LA dUTPasa DE <i>Trypanosoma brucei</i>	105
D.IV.1. Obtención de anticuerpos policlonales frente a la dUTPasa de <i>T. brucei</i>	105
D.IV.1.1. Estudio de la especificidad del anticuerpo anti- <i>TbdUTPasa</i> mediante <i>western blot</i>	105
D.IV.1.2. Inmunofluorescencia	106
D.IV.1.3. Inmunocitoquímica y observación mediante microscopía electrónica de transmisión	108
D.V. PAPEL DE LA dUTPasa DE <i>Trypanosoma brucei</i> EN PROLIFERACIÓN Y EL CICLO CELULAR	111
D.V.1. Construcción de plásmidos para el silenciamiento génico mediante RNAi	111
D.V.2. Transfección de <i>T. brucei</i>	112

D.V.3. Estudio del efecto del RNAi sobre el crecimiento celular y análisis de los niveles de proteína _____	113
D.V.3.1. Efecto sobre tripomastigotes de la forma sanguínea _____	113
D.V.3.2. Efecto sobre tripomastigotes de la forma procíclica _____	115
D.V.4. Efecto del RNAi de la dUTPasa sobre los niveles intracelulares de los nucleótidos de uracilo y timina _____	118
D.V.5. Determinación del efecto combinado del RNAi de la dUTPasa y la inhibición por metotrexato en el crecimiento celular _____	120
D.V.6. Efecto de la timidina y timina sobre el fenotipo de pérdida de viabilidad mediado por la depleción de la dUTPasa _____	123
D.V.7. Efecto del RNAi de la dUTPasa sobre el ciclo celular de <i>T. brucei</i> _____	124
D.V.8. Efecto del RNAi de la dUTPasa sobre la actividades enzimáticas uracil DNA glicosilasa y AP endonucleasa _____	128
D.V.9. Efecto del doble silenciamiento mediante RNAi de los genes de la dUTPasa y UNG de <i>T. brucei</i> _____	132
D.V.9.1. Construcción de plásmidos para el silenciamiento génico mediante RNAi de la UNG _____	133
D.V.9.2. Transfección de <i>T. brucei</i> _____	134
D.V.9.3. Estudio del efecto del RNAi de la UNG y del doble RNAi de la dUTPasa y UNG sobre el crecimiento celular y análisis de los niveles de proteína _____	135
D.V.9.4. Silenciamiento del gen de la UNG _____	135
D.V.9.5. Silenciamiento de los genes de la dUTPasa y UNG _____	136
D. V.9.6. Efecto del doble RNAi de los genes <i>DUT</i> y <i>UNG</i> sobre el ciclo celular _____	137
E. DISCUSIÓN _____	140
E.I. LA dUTPasa DE <i>Trypanosoma brucei</i> ES UNA ENZIMA DIMÉRICA QUE PERTENECE A LA FAMILIA DE TODO-α NUCLEÓTIDO HIDROLASAS _	141
E.II. CARACTERIZACIÓN CINÉTICA DE LA dUTPasa DE <i>Trypanosoma brucei</i>	144
E.II.1. Requerimiento de iones divalentes _____	146
E.II.2. El dUDP, un sustrato de la dUTPasa de <i>T. brucei</i> _____	147
E.II.3. Especificidad de sustrato de la dUTPasa de <i>T. brucei</i> _____	149

E.III. LOCALIZACIÓN INTRACELULAR DE LA dUTPasa DE <i>Trypanosoma brucei</i>	151
E.IV. LA dUTPasa DE <i>Trypanosoma brucei</i> ES NECESARIA PARA LA PROLIFERACIÓN CELULAR	153
E.V. LA dUTPasa CONTROLA LOS NIVELES INTRACELULARES DE dUTP	157
E.VI. LA DEPLECIÓN DE LA dUTPasa GENERA DEFECTOS EN EL CICLO CELULAR	159
E.VII. LA DISMINUCIÓN DE LA ACTIVIDAD dUTPasa ACTIVA LOS MECANISMOS DE REPARACIÓN POR ESCISIÓN DE BASES	163
E.VIII. UNA DISMINUCIÓN EN LOS NIVELES DE URACIL DNA GLICOSILASA NO AFECTA A LA PROLIFERACIÓN CELULAR NI MODIFICA EL FENOTIPO DE LAS CÉLULAS RNAi-DUT	165
F. CONCLUSIONES	168
G. BIBLIOGRAFÍA	170

ABREVIATURAS

- A.** Absorbancia.
- Ae.** Actividad específica.
- Amp.** Ampicilina.
- AMP.** Adenosina monofosfato.
- AP.** Abásico.
- ATP.** Adenosina trifosfato.
- BSA.** Albúmina sérica bovina.
- BLA.** Blastidina.
- BLE.** Bleomicina.
- BHV.** Virus del herpes bovino.
- °C.** Grados centígrados.
- CAEV.** Virus de la artritis encefalitis caprina.
- cDNA.** DNA complementario.
- Ci.** Curio.
- CDP.** Citidina difosfato.
- cm.** Centímetro.
- CMP.** Citidina monofosfato.
- col.** Colaboradores.
- c.p.m.** Cuentas por minuto.
- CTP.** Citidina trifosfato.
- CTS.** Citidina trifosfato sintasa.
- Da.** Dalton.
- DAPI.** diclorhidrato de 4',6-diamidino-2-fenilindol.
- dATP.** Desoxiadenosina trifosfato.
- dCDP.** Desoxicitidina difosfato.
- dCMP.** Desoxicitidina monofosfato.
- dCTP.** Desoxicitidina trifosfato.
- DEPC.** Dietilpirocarbonato.
- dGTP.** Desoxiguanosina trifosfato.
- DHF.** Dihidrofolato.
- DHFR.** Dihidrofolato reductasa.
- DHOD.** Dihidrorotato oxidasa.

DIC. Contraste interdiferencial.

dITP. Desoxiinosina trifosfato.

DNA. Ácido desoxirribonucleico.

DNAsa I. Desoxirribonucleasa I.

dNTP. Desoxinucleósido 5'- trifosfato.

D.O. Densidad óptica.

DOX. Doxiciclina.

DTT. Ditioneitol.

dTDP. Desoxitimidina difosfato.

dTMP. Desoxitimidina monofosfato.

dTTP. Desoxitimidina trifosfato.

dUDP. Desoxiuridina difosfato.

dUMP. Desoxiuridina monofosfato.

dUTP. Desoxiuridina trifosfato.

dUTPasa. Desoxiuridina 5' trifosfato hidrolasa.

dUMP. Desoxiuridina monofosfato.

dXTP. Desoxixantosina trifosfato.

EBV. Virus de Epstein-Barr.

EDTA. Ácido etilén diamino tetraacético.

EIAV. Virus de la anemia infecciosa equina.

fmoles. Fentomoles.

FITC. Fluoresceína.

FIV. Virus de la inmunodeficiencia felina

h. Hora.

HYG. Higromicina.

HIV. Virus de la inmunodeficiencia humana.

HSV. Virus del herpes simple.

IC50. Dosis inhibitoria de crecimiento 50.

IgG. Inmunoglobulina G.

IMP. Inosina monofosfato.

ITP. Inosina trifosfato.

IPTG. Isopropil- β -D-tiogalactopiranósido.

kb. Kilobase.

kDa. Kilodalton.

- k_{cat}***. Constante catalítica.
- K_{ip}***. Constante de inhibición por producto.
- K_m***. Constante de Michaelis.
- kV**. Kilovoltio.
- M**. Molar.
- Mb**. Megabases.
- mg**. Miligramo.
- MHV**. Virus del herpes de ratón.
- min**. Minuto.
- mL**. Mililitro.
- mM**. Milimolar.
- MMTV**. Virus del tumor mamario de ratón.
- MOPS**. Ácido 3-[N-morfolino]-propano sulfónico.
- mRNA**. Ácido ribonucleico mensajero.
- MTX**. Metotrexato.
- μCi**. Microcurio.
- μL**. Microlitro.
- μM**. Micromolar.
- NADPH**. Nicotiamida adenina dinucleótido fosfato.
- ng**. Nanogramo.
- nM**. Nanomolar.
- ODC**. Orotidina monofosfato descarboxilasa.
- OPT**. Orotato fosforribosil transferasa.
- PBS**. Tampón fosfato salino.
- PCR**. Reacción en cadena de la DNA polimerasa.
- pb**. Pares de bases.
- pI**. Punto Isoeléctrico.
- pmol**. Picomol.
- PMSF**. Fenil metil sulfonil fluoruro.
- PPi**. Pirofosfato.
- Pol δ**. DNA Polimerasa δ.
- Pol ε**. DNA Polimerasa ε.
- PRPP**. Fosforribosil pirofosfato.

PrV. Virus de la pseudorrabia.

RNA. Ácido ribonucleico.

RNAi. RNA de interferencia.

RNR. Ribonucleótido reductasa.

s. Segundo

SBF. Suero bovino fetal.

SBFd. Suero bovino fetal dializado.

SDS. Dodecil sulfato sódico.

SDS-PAGE. Electroforesis desnaturalizante en gel de poliacrilamida.

SHMT. Serina hidroximetil transferasa.

TEMED. N,N,N',N'- Tetrametil-etilenodiamino.

Tet. Tetraciclina.

THF. Tetrahidrofolato.

TK. Timidina kinasa.

Tris. Tris(hidroximetil)-amino metano.

TS. Timidilato sintasa.

UNG. Uracil DNA glicosilasa.

UPRT. Uridina fosforribosil transferasa.

UDP. Uridina difosfato.

UMP. Uridina monofosfato.

UTP. Uridina trifosfato.

V. Voltio.

V_{max} . Velocidad máxima.

VSG. Glicoproteína variante de superficie.

Xgal. 5-bromo-4-chloro-3-indolil- β D-galactosido.

XTP. Xantosina trifosfato.

INTRODUCCIÓN

A. INTRODUCCIÓN

A.I. INTRODUCCIÓN

Las enfermedades causadas por protozoos parásitos constituyen un serio problema para la salud pública debido al gran número de personas que las padecen y que habitan en las zonas de riesgo. Entre la amplia variedad de parásitos protozoos que producen enfermedades de gran impacto se incluyen los pertenecientes al género *Plasmodium* que causan la malaria, parásitos del género *Leishmania* que causan diferentes tipos de leishmaniasis dependiendo de la manifestación clínica y los pertenecientes al género *Trypanosoma*, donde podemos diferenciar entre *Trypanosoma cruzi* que produce la enfermedad de Chagas o tripanosomiasis americana y subespecies de la especie *Trypanosoma brucei*, agentes etiológicos responsables de la tripanosomiasis africana o enfermedad del sueño.

En el caso de la tripanosomiasis africana existen tres subespecies capaces de producir la enfermedad. Las tres son morfológicamente idénticas pero difieren en su capacidad para infectar distintos huéspedes.

Trypanosoma brucei gambiense es el responsable de más del 90 % de los casos conocidos y se encuentra extendido por el oeste y centro de África. Es el causante de una infección crónica de tal manera que pueden pasar meses o incluso años desde que una persona es infectada hasta que aparecen manifestaciones clínicas de la enfermedad. Es cuando el paciente suele encontrarse ya en una etapa avanzada y está afectado el sistema nervioso central.

Los casos de enfermedad del sueño producidos por *Trypanosoma brucei rhodesiense* se encuentran diseminados por el este y el sur de África. Esta forma representa menos del 10 % de los casos y produce una infección aguda donde los primeros síntomas se pueden observar después de semanas o pocos meses postinfección y rápidamente la enfermedad se desarrolla e invade el sistema nervioso central.

Trypanosoma brucei brucei causa la enfermedad en muchas especies de animales tanto domésticos como salvajes y cuando el afectado es el ganado, se conoce como *Nagana*. Hay que destacar que estos animales pueden servir de huéspedes para las especies patógenas en humanos, especialmente *T.b. rhodesiense*, de tal manera que suponen un importante reservorio de este parásito. La especie *T.b. gambiense* también

puede infectar animales pero el papel epidemiológico de este reservorio no se conoce hasta la fecha.

Los parásitos son transmitidos por la picadura de la mosca tsetse (género *Glossina*) la cual adquiere la infección bien de un humano o de un animal infectado con los parásitos patogénicos humanos. La enfermedad se extiende a lo largo de 36 países del África sub-sahariana en los que se ha estimado que existen 60 millones de personas en situación de riesgo de ser infectados (Figura A.I.1). La incidencia ha pasado por diferentes etapas a lo largo del último siglo; de una epidemia a principios de siglo a casi desaparecer a mediados de los años 1960 debido a un férreo control de la población. Sin embargo, a partir de estos años la vigilancia disminuyó por lo que los casos de contagio aumentaron hasta llegar a unos 40000 por año a finales del siglo 20 aunque estos datos no reflejaban la realidad y se estimó que existía entre 300000 y 500000 casos que permanecían sin diagnosticar. Desde 2005, la vigilancia se ha reforzado y parece que la tendencia al alza se ha invertido estimándose que existen entre 50000 y 70000 casos por año.

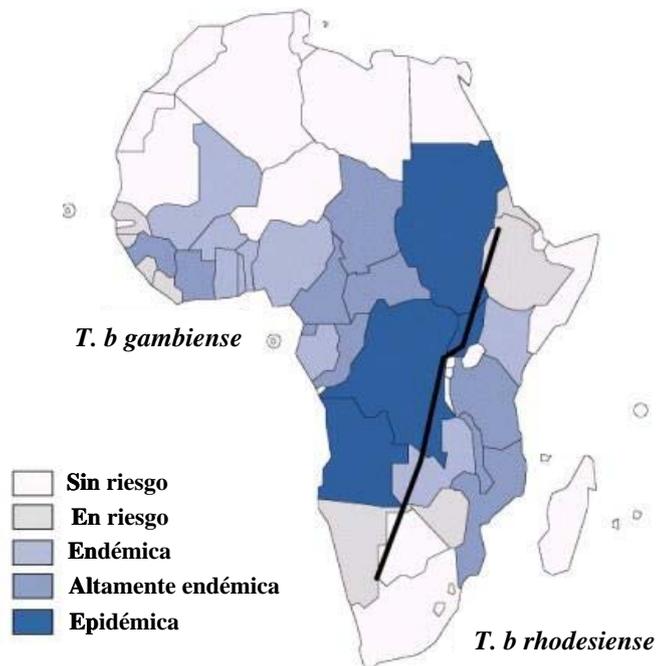


Figura A.I.1. Distribución de la tripanosomiasis africana causada por los parásitos protozoos *Trypanosoma brucei gambiense* y *rhodesiense*. (World Health Organization, WHO).

Tras la infección por *T. brucei*, en primer lugar los parásitos se multiplican en tejidos subcutáneos, sangre y linfa. Posteriormente, cruzan la barrera hematoencefálica

para infectar el sistema nervioso central. La primera etapa de la enfermedad, conocida como fase hemolinfática, implica un periodo de fiebre, dolor de cabeza, dolor de las articulaciones y picazón. La segunda etapa, conocida como fase neurológica, comienza cuando el parásito cruza la barrera hematoencefálica e invade el sistema nervioso central. En general, es en este momento cuando los síntomas de la enfermedad aparecen: confusión, perturbaciones sensoriales y una baja coordinación. Una importante característica de esta etapa es la alteración del ciclo de sueño, síntoma por lo que se conoce la enfermedad. En el caso de que a una persona infectada no se le administre un tratamiento efectivo, se produce la muerte del paciente.

La quimioterapia utilizada depende del tipo de fase de la enfermedad en la que se encuentre el paciente. Los fármacos usados en la primera fase son menos tóxicos, más fáciles de administrar y más efectivos por lo que un diagnóstico temprano proporciona una mayor posibilidad de cura. El éxito de los tratamientos dirigidos contra la segunda fase dependen de que el fármaco pueda cruzar la barrera hematoencefálica. En este caso los fármacos disponibles son bastantes tóxicos y difíciles de administrar. En la actualidad sólo existen cuatro fármacos libres de cargo registrados para el tratamiento de la enfermedad del sueño gracias a una asociación privada entre la Organización Mundial de la Salud (OMS) y sanofi-aventis (pentamidina, melarsoprol y eflornitina) y Bayer AG (suramin).

En la primera fase de la enfermedad son utilizados:

- La **pentamidina** fue descubierta en 1941, se usa para el tratamiento de la tripanosomiasis africana causada por *T. b. gambiense*. Suele ser bien tolerada por el paciente a pesar de algunos efectos secundarios.
- La **suramina** fue descubierta en 1921 y se usa cuando la enfermedad esté causada por *T. b. rhodesiense*. Este fármaco puede provocar en el paciente efectos secundarios en el tracto urinario así como reacciones alérgicas.

En la segunda etapa el tratamiento aplicado es:

- El **melarsoprol** se descubrió en 1949 y se usa en ambas formas de infección. Es un derivado del arsénico por lo que presenta muchos efectos secundarios entre los que se encuentra el síndrome encefalopático, el cual puede ocasionar la muerte entre un 3 % y un 10 % de los casos. A este problema se le une que últimamente en ciertas zonas del centro de África están surgiendo resistencias al fármaco.

- La **eflornitina** se registró en el año 1990 y presenta la ventaja respecto al anterior de su menor toxicidad. Un inconveniente es el hecho de que sólo es efectiva frente a *T. b. gambiense* y que el tratamiento es estricto y difícil de aplicar.

La tripanosomiasis africana no sólo supone un grave problema de salud pública debido al gran número de muertes que produce cada año, sino que también constituye un serio problema para los países africanos que la padecen impidiendo su desarrollo económico. La necesidad de encontrar nuevos tratamientos para combatir la enfermedad es crucial para el resurgimiento socioeconómico de estos países puesto que los fármacos disponibles actualmente son escasos, hay casos de resistencias y existen problemas de toxicidad que limitan su administración.

A.II. CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LA ESPECIE *Trypanosoma brucei*

A.II.1. Taxonomía y ciclo de vida

Los tripanosomas son protozoos parásitos hemoflagelados pertenecientes a la clase Zoomastigophora, orden Kinetoplastida, familia Trypanosomatidae, género *Trypanosoma*, subgénero *Trypanozoon*. La enfermedad del sueño en humanos es una enfermedad causada por dos subespecies morfológicamente indistinguibles, de la especie *Trypanosoma brucei*: *Trypanosoma brucei gambiense* y *Trypanosoma brucei rhodesiense*. Otra subespecie, *Trypanosoma brucei brucei*, es el agente causante de la enfermedad en animales.

Trypanosoma brucei presenta un ciclo de vida digenético que transcurre entre un hospedador invertebrado que sirve como vector y un hospedador vertebrado. La introducción de la forma infectiva del parásito al hospedador vertebrado tiene lugar mediante la picadura de una mosca tsetse perteneciente al género *Glossina*. Como el insecto secreta saliva dentro de la dermis de su víctima para dilatar los vasos sanguíneos y prevenir la coagulación de la sangre, simultáneamente inocula tripanomastigotes metacíclicos que es la forma infectiva del parásito. La morfología y fisiología de la mitocondria diferencia la forma tripomastigote metacíclica de la mayoría de las otras formas del ciclo de vida que ocurren en el insecto vector. La mitocondria presenta pocas crestas y no contiene intermediarios del transporte de electrones. Además, esta forma presenta una forma achatada con un flagelo corto. Una vez en el torrente sanguíneo, los

tripomastigotes se propagan rápidamente dentro del huésped y finalmente migran al fluido cerebroespinal. En el torrente sanguíneo, los tripomastigotes se diferencian en tres formas: una forma alargada y delgada con un flagelo que se extiende por la membrana ondulante (“slender”); una forma corta y rechoncha que no presenta un flagelo prominente (“stumpy”); y una forma intermedia entre las dos formas. Para que el ciclo de vida se complete y la mosca tsetse vector transmita la enfermedad, el insecto ingiere del mamífero infectado la forma tripomastigote “stumpy”, la cual está fisiológicamente adaptada para la existencia dentro del insecto vector. La presencia de una mitocondria con prominentes crestas y un sistema funcional de transporte de electrones permite que esta forma sobreviva en la parte media del tracto intestinal del insecto donde los nutrientes pueden ser más escasos que en el torrente sanguíneo del hospedador vertebrado. Una vez que los parásitos son ingeridos por el insecto, esta forma se alarga, pierde su glicoproteína variante de superficie (VSG), la cual protege al parásito de la respuesta inmune cuando éste se encuentra en el torrente sanguíneo y la sustituye por una proteína invariante de superficie, denominándose a esta forma tripomastigote procíclico. En este momento la proliferación de los parásitos tiene lugar por fisión longitudinal binaria e invaden el espacio extraperitrófico. Debido a que el número de parásitos se va incrementando, se produce una migración y aproximadamente en el décimo día después de la ingestión, los parásitos entran en los proventrículos. Durante la migración hacia la parte anterior del tracto intestinal del insecto se produce una metamorfosis apareciendo las formas epimastigotes, que es la forma predominante en el esófago y cavidad bucal de la mosca. En el veintavo día los epimastigotes entran en los conductos de las glándulas salivares, se anclan al epitelio por sus flagelos y se multiplican. Al final de la tercera semana, los parásitos se transforman en tripomastigotes metacíclicos y se despegan quedando libres en el lumen de la glándula. De esta manera los parásitos están disponibles para una nueva infección de otro mamífero mediante la picadura de la mosca tsetse infectada (Figura.A.II.1).

Generalmente las formas que se encuentran en el hospedador mamífero se suelen unificar en una forma conocida como forma sanguínea y las que se encuentran en el insecto vector en una forma procíclica y en una forma metacíclica.

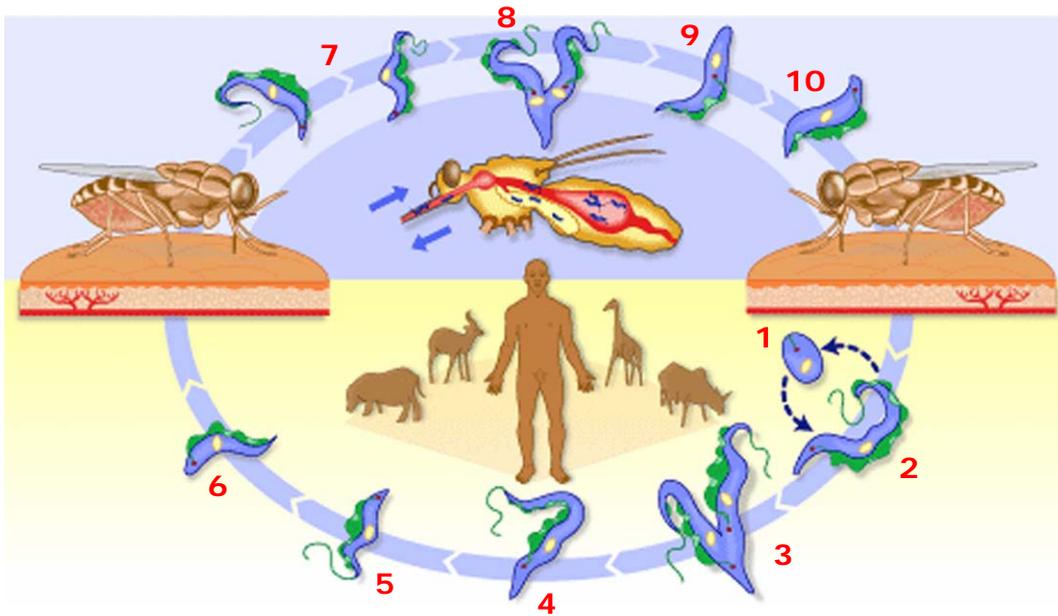


Figura A.II.1. Ciclo de vida de *Trypanosoma brucei*. (1) Las formas tripanomastigotes metacíclicos infectivos son introducidos en el huésped vertebrado mediante la picadura de la mosca tsetse. (2) Una vez en el torrente sanguíneo se transforman en las formas tripomastigotes sanguíneos de la forma "slender" propagándose a diferentes lugares del hospedador, y comenzando a proliferar mediante fisión binaria (3). En este momento tiene lugar una diferenciación de la forma "slender" (4), pasando por una forma intermedia (5), a la forma "stumpy" (6) la cual se encuentra fisiológicamente adaptada para la vida en el insecto vector. Mediante una nueva picadura de una mosca tsetse, los parásitos son incorporados a la parte media del tracto intestinal del insecto donde tiene lugar una transformación a la forma procíclica (7) y comenzando una proliferación mediante fisión binaria (8). A continuación, los parásitos migran hacia la parte anterior del tracto intestinal sufriendo una metamorfosis, apareciendo la forma epimastigote (9). Dicha forma epimastigote entra en los conductos de las glándulas salivales donde tiene lugar una nueva proliferación. Finalmente, las células sufren una transformación a las formas metacíclicas (10), disponibles para una nueva infección de un hospedador y cerrando de esta manera el ciclo de vida (TDR/Wellcome Trust).

A.II.2. Biología molecular *Trypanosoma brucei*

En lo referente a la biología molecular de *Trypanosoma brucei*, al igual que otras especies pertenecientes a la familia Trypanosomatidae y a la orden Kinetoplastida, se pueden destacar ciertas peculiaridades moleculares que hacen a estos parásitos diferentes al resto de los organismos eucariotas.

- Presentan un DNA mitocondrial que difiere del resto conocido en la naturaleza y que da nombre al orden. Este DNA aparece agrupado formando una red llamada kinetoplasto, compuesta por miles de círculos concatenados que constituyen el 10-15 % del DNA total del parásito. Estos círculos de DNA se pueden dividir en maxicírculos, de los cuales existen varias docenas y su tamaño varía entre 20 y 40 kb en la mayoría de las especies, y minicírculos, de los cuales existen varios miles y su tamaño oscila entre 0.5 y 2.5 kb aunque en algunas especies pueden ser mayores. Los maxicírculos codifican RNAs ribosomales y transferentes, así como proteínas que son necesarias para procesos bioenergéticos mitocondriales como es el caso de los citocromos. En los minicírculos se codifican moléculas de RNA guías que actúan en la edición de los transcritos de RNA mensajeros de los maxicírculos (Chern *et al.*, 1969; Simpson *et al.*, 1985; Shapiro y Englund, 1995).
- Los genes que codifican proteínas se disponen en grupos de genes direccionales en tándem, los cuales son transcritos de manera policistrónica al igual que en organismos procariotas (Tschudi y Ullu, 1988). Debido a esta característica, se generan grandes RNAs inmaduros que contienen más de un gen y que tienen que ser procesados en RNAs mensajeros maduros. La diferencia con los procariotas es que estos RNAs mensajeros inmaduros sufren un proceso de maduración denominado “trans-splicing”. Durante este proceso se adiciona una secuencia de 39 a 41 nucleótidos denominada miniexón o *spliced leader (SL)* al extremo 5' de los RNAs codificantes y una cola de poliadenilación al extremo 3', de tal manera que la poliadenilación se encuentra acoplado al proceso de trans-empalme del siguiente gen. La adición del miniexón cumple la función, junto con la poliadenilación, de convertir un transcrito policistrónico en una unidad de traducción monocistrónica, así como de proteger el RNA mensajero de la acción de enzimas que lo degraden, como es el caso de nucleasas, prolongando su duración y asegurando la traducción a proteína (Agabian, 1990). En tripanosomátidos no se han encontrado sitios específicos de iniciación de la transcripción para la RNA polimerasa II en genes que codifican proteínas sugiriendo que estos parásitos reclutan la RNA polimerasa II al DNA por un nuevo mecanismo que es independiente de los factores de transcripción generales. En la región intergénica se puede encontrar un dinucleótido AG en el sitio 3' de empalme que actúa como aceptor del *SL*. Este sitio AG junto con la secuencia de polipirimidinas asociada que se encuentra corriente arriba son las secuencias que actúan *in cis* más importantes y altamente conservadas que se encuentran en los pre-mRNA que sirven como sustrato para el “trans-splicing”. Son

varias las evidencias que demuestran la importancia de estas secuencias como es el caso de la secuencia de polipirimidinas en *T. brucei* que ha sido identificada como el principal determinante para que se lleve a cabo un correcto “trans-splicing” (Matthews *et al.*, 1994), así como el sitio 3’ de empalme AG en *Leishmania*, el cual es el mínimo requerimiento para un eficiente “trans-splicing” (Curotto de Lafaille *et al.*, 1992). La fuente del *SL* es un pequeño capped RNA denominado SL RNA (Milhausen *et al.*, 1984), con una estructura secundaria similar a la de otros organismos que llevan a cabo el proceso de trans-splicing compuesta por tres estructuras tallo-lazo. A continuación de la secuencia SL hay una secuencia de longitud variable que puede plegarse en dos estructuras tallo-lazo separadas entre sí por una región de cadena simple. Esta región denominada sitio de unión Sm (Sm-like site) es análoga a la región de snRNAs, la cual es donde se unen las proteínas que van llevar a cabo el proceso de “trans-splicing”, aunque en tripanosomátidos esta región difiere de la secuencia de unión Sm canónica (Bruzik *et al.*, 1988). Un rasgo característico del SL RNA es la presencia de una estructura cap hipermodificada conocida como cap4, cuyo nombre hace referencia a los 4 nucleótidos modificados que se encuentran después de la 7-metilguanosa (Perry *et al.*, 1987). A diferencia de los genes que codifican proteínas, los genes de SL RNA son transcritos de forma monocistrónica a partir de un sitio de inicio de la transcripción concreto por la RNA polimerasa II. Existe un promotor *SLRNA* conservado en tripanosomátidos, el cual está compuesto por un elemento de secuencia corriente arriba denominado USE y un elemento iniciador. Que este tipo de genes sean transcritos de forma diferente a los genes que codifican proteínas pone de manifiesto el papel crucial que tiene el SL en la maduración de cada RNA mensajero en estos parásitos (Schimanski *et al.*, 2006).

- La mayoría de los RNA mensajeros mitocondriales precisan que tenga lugar un proceso denominado **edición de RNA mitocondrial o RNA editing**. El *RNA editing* es un procesamiento post-transcripcional mediante el cual se producen inserciones y eliminaciones de nucleótidos de uracilo. Los precursores de RNA mensajero pueden ser remodelados por la inserción de centenas y la eliminación de decenas de uridilatos para crear codones de iniciación y terminación, por lo que las secuencias que codifican proteínas pueden ser traducidas (Stuart *et al.*, 2005). Los pre-RNA mensajeros son codificados en los maxicírculos del kinetoplasto mientras que en los minicírculos codifican los RNAs guía que especifican la edición de los RNA mensajeros. En *T. brucei* se conocen aproximadamente 50 maxicírculos idénticos de 22 kb y del orden de 10000

minicírculos heterogéneos de 1 kb, donde cada uno codifica tres o cuatro RNAs guía por lo que existen más de 1200 RNAs guía diferentes. En este proceso está implicado además de los RNAs guía un complejo multiproteico denominado editosoma el cual cataliza los diferentes pasos que componen el mecanismo de edición (Stuart *et al.*, 2005).

- Los tripanosomátidos presentan unos orgánulos denominados glicosomas donde se concentran varios sistemas metabólicos importantes. Estos orgánulos se incluyen dentro de la familia de los peroxisomas junto con los microcuerpos en levaduras, los glioxisomas en plantas y ciertos microorganismos y los propiamente dichos peroxisomas aunque al principio existiera alguna duda por la ausencia de catalasa en los tripanosomátidos patógenos de mamíferos. Estos orgánulos están unidos por una membrana bicapa simple de fosfolípidos, presentan una matriz electrodensa de proteínas y no contienen DNA. En ellos se encuentran principalmente enzimas de la ruta de la glucolisis que catalizan la fermentación aeróbica de glucosa a succinato, como es el caso de la forma sanguínea de *T. brucei* donde estas enzimas suponen el 90 % del contenido total de proteínas en el glicosoma. Además se pueden encontrar enzimas implicadas en la ruta de la pentosa fosfato, en la β -oxidación de ácidos grasos, en el salvamento de purinas, en la ruta de síntesis de pirimidinas así como en la biosíntesis de éter-lípidos y escualeno. Como se puede apreciar, los glicosomas de los kinetoplástidos comparten funciones metabólicas con los peroxisomas de otros organismos, pero tienen la peculiaridad de concentrar la ruta glucolítica así como de algunas reacciones del metabolismo de carbohidratos. Esta organización subcelular del metabolismo parece tener importantes consecuencias para estos organismos. En el caso de que los tripanosomas se encuentren en un medio rico en glucosa es esencial una correcta biogénesis del glicosoma así como una adecuada localización de las enzimas glucolíticas, probablemente porque una incompleta o incorrecta compartimentación afecta a la regulación de la glucolisis. Esta compartimentación también permite a estos organismos superar cortos periodos de anaerobiosis aunque no los capacita para la síntesis de una cantidad suficiente de ATP para mantener la proliferación. Como se ha mencionado, en el caso de la forma sanguínea de *T. brucei* las enzimas glucolíticas suponen el 90 % del contenido del glicosoma, pero curiosamente este contenido puede variar notablemente dependiendo de la etapa del ciclo de vida en la que se encuentre el parásito. Posiblemente, la concentración de las rutas del metabolismo de carbohidratos en los glicosomas permite a los parásitos adaptarse rápidamente a una nuevas

condiciones nutricionales durante la diferenciación de una forma a la siguiente del ciclo de vida. Esto tiene lugar mediante la degradación de un número de glicosomas a través de la autofagia, a la vez que se sintetizan nuevos orgánulos con un diferente contenido enzimático. Esta capacidad dependiente de glicosomas para sufrir una rápida y eficiente adaptación metabólica pudo jugar un importante papel en la capacidad adaptativa a una gran cantidad de hospedadores diferentes (Michels *et al.*, 2006).

- En *Trypanosoma brucei* una característica muy importante es la capacidad de evasión del sistema inmune del hospedador mamífero mediante una sofisticada variación antigénica. Los parásitos en su forma sanguínea presentan una cubierta de proteínas pertenecientes a una gran familia de glicoproteínas variantes de superficie conocidas como VSG de las cuales existen más de 1000 genes y pseudogenes. Esta evasión se lleva a cabo mediante la expresión monoalélica de una única proteína de la familia de las VSGs a partir de uno de los aproximadamente 20 sitios de expresión subteloméricos (ESs) (Navarro y Gull, 2001). En la forma sanguínea los sitios de expresión de las VSG son transcritos en unidades de transcripción policistrónica conteniendo miembros de las 12 familias diferentes de genes asociados a sitios de expresión (*ESAGs*) además de las VSG teloméricas. Por el contrario los sitios de expresión de VSG metacíclicos presentes en la forma infectiva metacíclica sólo contiene la VSG telomérica. Estos últimos están activos en el huésped justo después de la infección pero son silenciados para la activación exclusiva de uno de los sitios de expresión de VSG de la forma sanguínea. Esta transcripción se mantiene durante la proliferación y únicamente se para en la forma inactiva de tripanosomas sanguíneos, los cuales aparecen cuando existe una alta parasitemia (Amiguet-Vercher *et al.*, 2004). La expresión de un determinado gen de VSG en un momento dado viene determinada por la activación del sitio de expresión de ese gen de VSG. La activación de otro sitio de expresión de genes VSG puede darse por el cambio *in situ* de un sitio de expresión por otro. La expresión de otros genes de VSG pueden tener lugar, además de por un cambio *in situ*, por una reorganización del DNA que implica la conversión de genes o el intercambio telomérico por lo que un gen de los muchos que se encuentran silenciados puede ser introducido en un sitio de expresión de genes VSG activo (Taylor y Rudenko, 2006). La secuenciación del genoma de *T. brucei* ha revelado la existencia de al menos 1250 a 1500 genes VSG, de los cuales la gran mayoría se encuentran en varias agrupaciones en tándem localizadas en regiones subteloméricas. Otro grupo de genes VSG silenciados (aproximadamente entre 100 y 200) se encuentran en los telómeros de minicromosomas mitóticamente estables de 50-

100 kb (Wickstead *et al.*, 2003). Estos minicromosomas están compuestos por una selección de repeticiones de 177 pares de bases ordenadas en una gran secuencia palindrómica. Es probable que la abundancia de esta clase de cromosomas en *T. brucei* tenga la función de incrementar el número de *VSGs* teloméricos. Los genes *VSG* activados rápidamente en una infección mediante reorganizaciones del DNA parece estar frecuentemente localizados en telómeros y a menudo en minicromosomas (Aitcheson *et al.*, 2005). Los cambios transcripcionales se deben a un grupo limitado de aproximadamente 20 genes *VSG* localizados en sitios de expresión. Los intercambios de telómero se deben a un grupo de 150-250 genes de *VSG* localizados en los extremos de varios cromosomas. Indudablemente, la conversión de genes es el principal mecanismo de cambio en una infección crónica, ya que en teoría hace posible el movimiento de un gen *VSG* silenciado a un sitio de expresión *VSG* activo (Robinson *et al.*, 1999).

A.II.3. Bioquímica de los tripanosomátidos

Los tripanosomátidos dependen de las fuentes de carbono presentes en el huésped para su metabolismo energético. En el caso de la forma tripomastigote de *T. brucei* y *T. cruzi* usan la glucosa extracelular del hospedador vertebrado. Los parásitos en las formas presentes en el insecto vector utilizan el catabolismo de aminoácidos con una preferencia por la L-prolina, aunque *T. cruzi* puede utilizar también D-prolina y L-histidina. Los promastigotes de las especies de *Leishmania* expresan diferentes enzimas para metabolizar disacáridos, presumiblemente como una adaptación para aprovechar los nutrientes encontrados en el insecto vector. La forma sanguínea alargada de *T. brucei* exhibe el metabolismo energético más simple, el cual se basa en el metabolismo de la glucosa de la sangre del mamífero. La glucólisis está organizada de tal manera que las siete primeras enzimas de la ruta están compartimentadas en los glicosomas mientras que las tres últimas enzimas se encuentran en el citosol. La forma procíclica de *T. brucei* muestra tres principales diferencias con la forma sanguínea alargada: la fosfoglicerato quinasa se localiza en el citosol; los glicosomas contienen dos quinatas adicionales convirtiendo el fosfoenolpiruvato en malato o piruvato; y por último este piruvato se localiza en un punto de ramificación metabólico produciendo varios productos finales excretados, como acetato, L-alanina, etanol y L-lactato. Como se ha mencionado anteriormente, las formas del insecto vector usan aminoácidos presentes en su huésped para producir energía, pero sorprendentemente en el caso de tanto *T. brucei* como *T.*

cruzi, consumen preferiblemente glucosa cuando tanto glucosa como los aminoácidos están accesibles en el medio (Bringaud *et al.*, 2006).

Los parásitos pertenecientes al género *Trypanosoma* y *Leishmania* presentan algunas diferencias en el metabolismo de aminoácidos. Los transportadores de aminoácidos constituyen uno de las más grandes familias de permeasas en estos parásitos, siendo su número en *Leishmania*, *T. brucei* y *T. cruzi* de 29 , 38 y 42 miembros respectivamente. Esto es consistente con la falta en estos parásitos de rutas biosintéticas de aminoácidos esenciales en humanos por lo que precisan de una fuente exógena de prolina como fuente de energía (excepto en la forma sanguínea de *T. brucei*), de glutamina para varias rutas biosintéticas, de cisteína como una fuente adicional de azufre, y de tirosina para la síntesis de proteínas. La mayoría de las enzimas de la clásica ruta de oxidación de aminoácidos aromáticos están ausentes, aunque genes para la transaminación y reducción al derivado aromático de lactato correspondiente han sido identificados en todas las especies, pero la función de esta ruta aún no se conoce (Berriman *et al.*, 2005). En la infección causada por *T. brucei*, la secreción de estos ácidos aromáticos (El Sawalhy *et al.*, 1998) y su presencia en el sistema nervioso central producen alteraciones neurológicas asociadas con la enfermedad del sueño en humanos (Gazit *et al.*, 2003). El catabolismo de la histidina parece que no está presente en *T. brucei*, sin embargo en *T. cruzi* existe una ruta que es típicamente eucariota excepto para la última enzima, la glutamato formimino aminotransferasa que sólo se encuentra en *T. cruzi* y en *Tetrahymena*. En *Leishmania* encontramos ovotiol, un antioxidante generado a partir de histidina, el cual puede ayudar a proteger el parásito del peróxido de hidrógeno y óxido nítrico en la invasión del macrófago. Aunque un ciclo funcional de la urea no esté presente en los tres organismos, la enzima carbamil fosfato sintasa si se encuentra ya que esta enzima es esencial para la síntesis de pirimidinas. La arginina quinasa presente en *T. brucei* y en *T. cruzi* ha sido propuesta como una posible diana terapéutica (Pereira *et al.*, 2002). La fosfoarginina podría ser utilizada como fuente transitoria de energía para la renovación de ATP al igual que ocurre con la fosfocreatina en vertebrados.

La mayoría de los organismos contienen concentraciones milimolares de poliaminas implicadas en crecimiento celular y diferenciación y de glutatión implicado en la defensa frente a estrés oxidativo además de otros papeles esenciales para la célula. Sin embargo, los tripanosomátidos contienen tripanotión en vez de glutatión, sintetizado a partir de espermidina y glutatión, que junto con la tripanotión reductasa y el sistema

peroxidasa dependiente de tripanotión tienen un papel importante en la defensa frente estrés oxidativo, el mantenimiento de un adecuado balance redox intracelular, la síntesis de desoxirribonucleótidos y en la resistencia a compuestos antimoniales trivalentes. La biosíntesis de poliaminas ha sido propuesta como una buena diana para tratamientos quimioterapéuticos frente a enfermedades proliferativas entre las que se encuentra la tripanosomiasis africana. En este último caso, se utiliza el fármaco difluorometilornitina el cual tiene como diana la ornitina descarboxilasa que cataliza el primer paso de la ruta. Al caracer los tripanosomátidos de catalasa y peroxidases dependientes de selenio, dependen excepcionalmente de las peroxidases dependientes de tripanotión para la eliminación de los peróxidos. Así que estas proteínas junto con las triparedoxinas, homólogas de la tioredoxinas, son consideradas como dianas de fármacos.

A diferencia de células de mamífero donde el principal esteroide es el colesterol, el ergosterol y los 24-alquil esteroides son los principales componentes de las membranas celulares de hongos, plantas y de los parásitos protozoos de *Leishmania spp.* y *Trypanosoma cruzi*. En el caso de *Trypanosoma brucei*, la forma procíclica del parásito sintetiza ergosterol y otros 24-alquil esteroides, mientras que la forma sanguínea utiliza el colesterol del huésped mediante su introducción por los receptores LDL. Estas importantes diferencias en el metabolismo de esteroides entre parásitos y células del mamífero podrían ser explotadas en el diseño de agentes antiparasitarios (Gros *et al.*, 2006).

Otra característica destacable es la incapacidad que presentan los tripanosomátidos para llevar a cabo la síntesis *de novo* de purinas, por lo que dependen absolutamente de la incorporación de purinas preformadas presentes en sus hospedadores mediante una ruta de recuperación de purinas. Esta observación viene reforzada por el hecho de que nueve de los diez genes requeridos para sintetizar inosina monofosfato (IMP) a partir de fosforribosil pirofosfato (PRPP) no están presentes en el genoma. El único gen que se ha encontrado es el que codifica la adenilsuccinato liasa, la cual convierte IMP en AMP en la ruta de recuperación de purinas. Los nucleósidos o nucleobases purínicos presentes en el hospedador son utilizados como fuente de purinas por el parásito. Esta incorporación es mediada por transportadores de nucleósidos o nucleobases localizados en la membrana plasmática del parásito, los cuales proporcionan rutas de penetración específicas de sustrato. En cambio, estos parásitos protozoos obtienen la fuente de pirimidinas mediante la síntesis *de novo*. En esta ruta, donde están implicadas varias enzimas, existen múltiples puntos que divergen de los encontrados en

células de mamífero, característica que podría ser explotada en el diseño de nuevos fármacos antiprotozoarios.

A.III. LA DESOXIURIDINA TRIFOSFATO NUCLEÓTIDO HIDROLASA Y SU IMPORTANCIA BIOLÓGICA

En la mayoría de los sistemas biológicos, el uracilo no es un componente usual del DNA. Puede presentarse sin embargo como resultado de la desaminación de la citosina. En un número elevado de organismos esta situación se resuelve a través de los mecanismos de reparación que actúan específicamente eliminando residuos de uracilo, mecanismo iniciado por la actuación de la enzima uracil DNA glicosilasa.

Al margen de la desaminación de la citosina, el uracilo también puede incorporarse al DNA como resultado de la utilización de dUTP por parte de la DNA polimerasa. Si se da la circunstancia de que la cantidad de dUTP aumenta por encima de determinados niveles, se facilita la incorporación masiva de uracilo al DNA celular activándose consecuentemente el mecanismo de escisión y reparación lo que conlleva la fragmentación del DNA y la muerte celular. Este proceso destructivo ocurre con una baja frecuencia en condiciones normales debido a que la enzima desoxiuridina 5'-trifosfato nucleótido hidrolasa (dUTPasa)(EC 3.6.1.23) degrada el dUTP dando lugar a dUMP y PPi.

El papel primordial de la dUTPasa unido a que existen una serie de diferencias fundamentales entre las enzimas de tripanosomátidos y de mamíferos convierten a la dUTPasa en un atractivo potencial blanco de acción de fármacos para combatir las enfermedades causadas por tripanosomátidos.

A.III.1. Síntesis *de novo* de nucleótidos pirimidínicos

Como se ha comentado anteriormente, en *T.brucei* la principal fuente de nucleótidos pirimidínicos es la síntesis *de novo*, a diferencia de lo que ocurre con las purinas que precisan ser incorporadas del hospedador por una ruta conocida como vía de recuperación de purinas. En general, podemos decir que *T. brucei* sintetiza sus nucleótidos pirimidínicos mediante la misma ruta que está descrita en organismos eucariotas (Berens *et al.*, 1981; Berens *et al.*, 1995). La síntesis de pirimidinas empieza

en una reacción donde el CO_2 y glutamina junto con el consumo de dos moléculas de ATP producen carbamil fosfato, el cual reacciona con el ácido aspártico. A continuación tienen lugar una serie de reacciones para dar lugar al anillo pirimidínico en forma de orotato. Posteriormente tiene lugar una transferencia de un azúcar en forma de ribosa fosfato, seguido por una descarboxilación para dar lugar a la uridina monofosfato (UMP). La localización de estas enzimas en tripanosomátidos supone una peculiaridad. Las enzimas que catalizan las cuatro primeras reacciones se encuentran libres en el citosol, siendo esta localización diferente en el caso de la dihidroorotato oxidasa (DHOD), la cual se encuentra asociada a la mitocondria en células de mamífero. En lo que se refiere a las dos últimas enzimas, la orotato fosforribosil transferasa (OPT) y la orotidina monofosfato descarboxilasa (ODC), se encuentran en la superficie externa del glicosoma y no libres en el citoplasma como ocurre en células de mamífero (Hammond *et al.*, 1981).

El producto final de esta primera parte de la síntesis *de novo* de pirimidinas, el UMP, sirve como precursor del resto de nucleótidos pirimidínicos mediante una serie de rutas que se encuentran relacionadas entre sí (Figura A.III.1). En estas rutas existen una serie de quinasas y fosfatasas de especificidad variable que originan diferentes estados de fosforilación de los distintos nucleótidos.

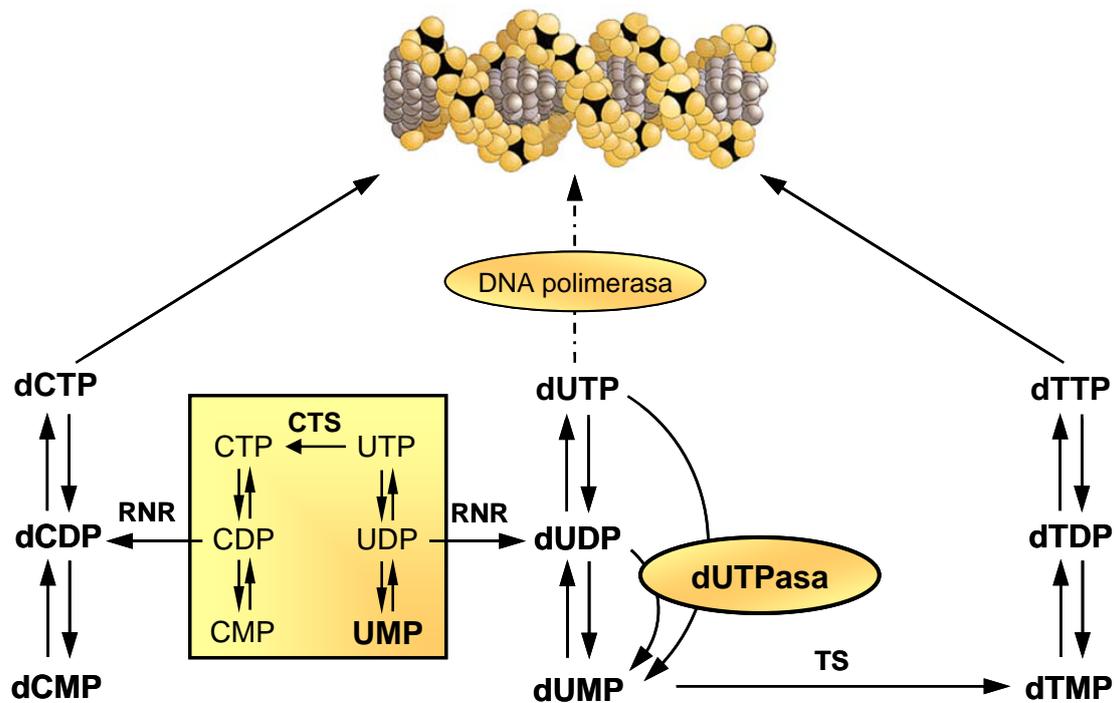


Figura A.III.1. Biosíntesis de nucleótidos de pirimidina a partir de UMP y utilización de los desoxirribonucleótidos trifosfato en la síntesis de DNA. CTS, citidina trifosfato sintasa; RNR, ribonucleótido reductasa; TS, timidilato sintasa; dUTPasa, desoxiuridina trifosfato nucleótido hidrolasa.

En *T. brucei*, al igual que en los otros tripanosomátidos, cabe destacar que la actividad timidilato sintasa se localiza en el extremo carboxilo de una proteína bifuncional de 58.8 kDa, en la cual también está presente la actividad dihidrofolato reductasa (DHFR), mientras que en células de mamífero estas dos actividades se encuentran en dos proteínas diferentes. La actividad dihidrofolato reductasa es la encargada de catalizar la reducción del dihidrofolato (H_2F) mediante NADPH produciendo el tetrahidrofolato (H_4F), el cual es el encargado de la transferencia de unidades monocarbonadas. Ambas proteínas son importantes dianas para el tratamiento de varias patologías (infecciones bacterianas, malaria y cáncer) aunque la utilidad clínica está limitada por la aparición de resistencias.

La integridad del genoma y la viabilidad celular dependen de que la secuencia de DNA contenga la información correcta, por lo que la síntesis del DNA es un proceso primordial durante la replicación. Para una adecuada replicación no sólo es necesario una correcta síntesis de los distintos desoxirribonucleósidos trifosfato (dNTPs), sino que también es de vital importancia que las concentraciones intracelulares estén en equilibrio para prevenir que la DNA polimerasa incorpore erróneamente bases en el DNA durante el proceso de replicación generando mutaciones (Meuth, 1989; Kunz *et al.*, 1994). Cabe destacar tres enzimas alostéricas, cuya regulación está mediada por nucleósidos trifosfato, implicadas en el mantenimiento de un correcto equilibrio entre los diferentes dNTPs (Reichard, 1988). En primer lugar, la ribonucleótido reductasa es la encargada de sintetizar los desoxirribonucleótidos mediante la reducción de los correspondientes ribonucleótidos difosfato, regulando de una manera compleja su actividad sobre cada sustrato. En segundo lugar, la citidina trifosfato sintasa es la encargada de sintetizar CTP a partir de UTP, manteniendo los niveles entre ambos nucleótidos equilibrados. Por último en eucariotas, la desoxicitidina monofosfato desaminasa convierte el dCMP en dUMP, el cual es el sustrato de la timidilato sintasa en la síntesis de dTTP. Una diferencia de los procariontes, es que la desaminación de desoxicitidina a desoxiuridina tiene lugar a nivel del nucleósido trifosfato mediante la dCTP desaminasa, aunque la regulación del proceso es similar a la de organismos eucariotas (Beck *et al.*, 1975). En tripanosomátidos no existen enzimas que catalicen la desaminación de la desocitidina ni en su forma monofosfato ni trifosfato. Por lo tanto, la única fuente de dUMP mediante la síntesis *de novo* de pirimidinas sería mediante la conversión de UDP a dUDP por la ribonucleótido reductasa. Este hecho reforzaría la importancia de la dUTPasa en la síntesis de timidilato en estos organismos. Lo que si se ha identificado es un homólogo

de la citidina desaminasa humana, la cual cataliza la desaminación tanto del nucleósido como de la base de citosina a uracilo, y está implicada en la ruta de recuperación de pirimidinas. También se ha identificado una uridilato quinasa que fosforila específicamente el nucleótido de uracilo.

A.III.2. Ruta de recuperación y catabolismo de nucleótidos pirimidínicos

T. brucei no posee la capacidad de sintetizar *de novo* purinas por lo que obtiene estos nucleótidos de la incorporación de purinas preformadas del hospedador. En el caso de las pirimidinas, el proceso de recuperación no es tan eficiente y tampoco ha sido muy estudiado. Lo que si se sabe es que algunos de los transportadores de purinas pueden ser inhibidos competitivamente por algunas pirimidinas como es el caso del transportador de adenosina T1 de amastigotes de *Leishmania donovani*, el cual es inhibido por uridina, timidina y citidina. El primer transportador exclusivo de pirimidinas que fue sido identificado en kinetoplastos es el TbU1 encontrado en *T. brucei* (de Koning y Jarvis, 1998), que recientemente también ha sido identificado en promastigotes de *L. major* (Papageorgiou *et al.*, 2005), el cual muestra un alto nivel de selectividad por el uracilo, siendo el transporte de la nucleobase del orden de 40 veces más eficiente que el del nucleósido. Interesantemente, un inhibidor competitivo de este transportador de uracilo, el fármaco 5-fluorouracil utilizado en la terapia contra el cáncer, presenta una prometedora actividad leishmanicida por lo que la caracterización de procesos de incorporación de pirimidinas podría proporcionar información para el diseño de nuevos fármacos. En la actualidad, se conoce un segundo transportador de uridina en la forma procíclica de *T. brucei* denominado TbU2, que aunque presenta una afinidad por este nucleósido moderadamente alta, la eficiencia de transporte es muy baja. No se ha podido determinar si estos bajos niveles de transporte son debidos a unos bajos niveles de expresión del transportador como resultado de las condiciones de cultivo celular o son propiedades inherentes del transportador, aunque se cree que la contribución de U2 a la tasa de incorporación de uracilo es menor que la de U1. El transportador U2 muestra afinidad por la timidina y la citidina pero no se ha detectado incorporación por lo que probablemente estos nucleósidos estén actuando como inhibidores. También se conoce un transportador de citosina, TbC1, aunque al igual que para U2, presenta una eficiencia de transporte extremadamente baja. TbC1 es inhibido por citidina y uracilo con una alta afinidad pero tampoco se detecta la incorporación de citidina en la forma procíclica en

cultivo. En conclusión podemos decir que *T. brucei* poseen transportadores de pirimidinas pero parecen ser mucho menos eficientes que los transportadores de purinas, y que tanto la timidina, la timina y la citidina no son recuperadas eficientemente por las formas procíclicas. Por lo tanto, el principal aporte es dependiente de la síntesis a partir del UMP, y de la fosforribosilación de uracilo por la uracil fosforribosiltransferasa (UPRT). Para la recuperación de uridina en primer lugar podría ser necesario convertirla en uracilo por medio de una uridina ribohidrolasa ya que los kinetopláستidos carecen de actividad uridina quinasa. Estas evidencias ponen de manifiesto el papel central que ocupa el UMP en el metabolismo de pirimidinas en tripanosomátidos (Gudin *et al.*, 2006).

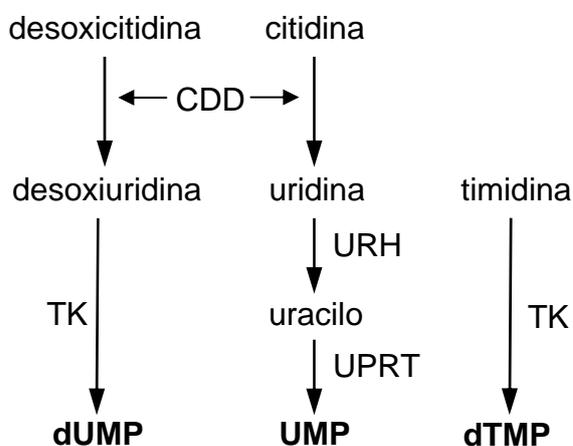


Figura A.III.2. Ruta de recuperación de nucleótidos pirimidínicos en *T. brucei*. CDD, citidina desaminasa (E.C 3.5.4.5); TK, timidina quinasa (E.C 2.7.1.21); URH, uridina ribohidrolasa (E.C 3.2.2.3); UPRT, uridina fosforribosiltransferasa (E.C 2.4.2.9).

Hay que destacar también la presencia de una timidina quinasa que es muy eficiente en la recuperación de la timidina para la célula. A altas concentraciones intracelulares de este nucleósido, el proceso de recuperación que lleva a cabo supone la principal fuente de nucleótidos de timina para la célula (Kunz *et al.*, 1994). También es de destacar la enzima desoxicitidina quinasa, aunque también actúa sobre desoxirribonucleótidos púricos.

En algunos tripanosomátidos se ha descrito una actividad inosin-uridina nucleósido hidrolasa, la cual cataliza la hidrólisis de estos sustratos a la correspondiente base más ribosa. Su función es aportar el sustrato para la transferencia de ribosa-fosfato a las bases libres generadas, produciéndose una recuperación para la célula (Gopaul *et al.*, 1996). Con el genoma de *T. brucei* totalmente secuenciado se ha identificado una

orotidina-5-fosfato descarboxilasa/orotato fosforribosiltransferasa putativa (OMPDCasa-OPRTasa) cuya función aún no está clara.

En lo que se refiere al catabolismo de pirimidinas, este proceso tiene lugar mediante la hidrólisis de nucleósidos con una posterior excreción de bases libres o una rotura del anillo pirimidínico produciendo como productos finales el amoniaco, dióxido de carbono y β -aminoácidos.

A.III.3. Implicaciones de la presencia de uracilo en el DNA

Los nucleótidos que forman las cadenas de DNA pueden sufrir modificaciones espontáneas en sus estructuras covalentes. Este tipo de alteraciones presentan implicaciones fisiológicas importantes debido a que la integridad genética es de vital importancia para la célula.

La presencia de uracilo en el DNA ocurre con relativa frecuencia en células de mamífero. El proceso de desaminación espontánea de la citosina da lugar a la presencia de un nucleótido de uracilo en el DNA, teniendo lugar con mayor frecuencia en cadenas simples de DNA o en cadenas de DNA donde la citosina se encuentre mal apareada con la base de la otra hebra de DNA, que en cadenas de doble hebra donde el apareamiento de la citosina sea correcto (Frederico *et al.*, 1993). La desaminación de la citosina es un hecho potencialmente mutagénico ya que genera un apareamiento erróneo U:G muy estable, el cual perdura en el genoma en las posteriores etapas de replicación. Sin embargo este hecho tiene una enorme trascendencia biológica ya que estudios recientes, han revelado que el mal apareamiento U:G es un paso intermediario clave en la modulación de genes Ig durante los procesos de hipermutación somática (SHM) y recombinación de cambio de clase (CSR), los cuales son responsables de la maduración de la afinidad de anticuerpos y de generar una variabilidad de anticuerpos con diferentes funciones efectoras, respectivamente (Kavli *et al.*, 2007). Por lo tanto, la citosina presente en el DNA es el resultado tanto de la desaminación química espontánea, como de un proceso de desaminación enzimático específico de genes y parte de una respuesta regulada. En relación con esto último parece ser que, la desaminación enzimática de citosina para generar uracilo en la primera cadena de cDNA retroviral puede ser una importante mecanismo de defensa frente a una infección por virus. Las diferentes enzimas que llevan a cabo este proceso de desaminación controlado pertenecen a la familia de las citidina desaminasas APOBEC/AID (Kavli *et al.*, 2007). Por ejemplo, las

enzimas APOBEC3G y APOBEC3F tienen una función en la defensa frente a la infección causada por el virus HIV-1 al producir la desaminación del cDNA retroviral después de la retrotranscripción del RNA retroviral (Pham *et al.*, 2005). Ante esta situación el virus responde reclutando la enzima uracil DNA glicosilasa UNG2 e introduciéndola en las partículas virales junto un dominio integrasa codificado por el propio virus HIV-1, siendo un proceso totalmente esencial para el ciclo de vida (Priest *et al.*, 2005).

Además del proceso de desaminación, el uracilo puede aparecer en el DNA por la incorporación de dUMP por la DNA polimerasa durante la replicación, hecho que tiene lugar con una frecuencia de aproximadamente 100 residuos de uracilo por día en células de mamíferos. En este caso el apareamiento es U:A, el cual no es directamente mutagénico pero que puede ser bastante citotóxico. En bacterias, una incorporación masiva de uracilo puede ser tolerada al menos una generación mientras la enzima uracil DNA glicosilasa no genere sitios abásicos y consecuentemente la fragmentación del DNA (el-Hajj *et al.*, 1992). En levaduras, el uracilo incorporado en la replicación es la principal fuente de uracilo en el DNA y probablemente la principal causa de formación espontánea de sitios abásicos y por lo tanto de daño espontáneo en el DNA (Guillet y Boiteux, 2003). Estudios recientes en levaduras han demostrado que el uracilo es tóxico en el DNA por dos procesos: en primer lugar, se produce una fragmentación causada por un aumento en los sitios abásicos generados por la uracil DNA glicosilasa y en segundo lugar, cuando existe unos niveles muy elevados de uracilo en el DNA, pueden interferir en la unión de proteínas específicas de unión al DNA requeridas para la transcripción de genes esenciales (Guillet *et al.*, 2006).

Como el mantenimiento de la información genética es primordial, en la célula existen mecanismos de reparación que reconocen el uracilo como una base extraña, la eliminan e incorporan la base correcta.

A.III.4. Mecanismo de escisión-reparación de bases

El mecanismo de escisión-reparación de bases es la principal ruta responsable de evitar los efectos tanto mutagénicos como citotóxicos causados por un daño en el DNA que tienen lugar por procesos hidrolíticos espontáneos, oxidativos y por la alquilación no enzimática. En particular, esta ruta reconoce y repara por la acción de varias enzimas bases modificadas tales como el uracilo y la 8-hidroxiguanina (Wilson y Bohr, 2007).

Existen dos vías por las que transcurre este proceso de reparación, una conocida como “short patch”, en la cual se sustituye sólo el nucleótido erróneo, y una segunda vía conocida como “long patch”, donde tiene lugar la sustitución de varios nucleótidos. En *T. cruzi* se ha puesto de manifiesto que el mecanismo de escisión-reparación de bases desencadenado por la presencia de uracilo en el DNA se lleva a cabo exclusivamente por la vía “short patch”, aunque la polimerasa implicada siga un patrón de pol δ y no de pol β (Pena-Díaz *et al.*, 2004).

El mecanismo general por el que se repara el daño en el DNA ocasionado por la incorporación de uracilo implica un reconocimiento y una escisión de dicha base, presente en el DNA, por medio de la enzima uracil-DNA glicosilasa. Esta enzima cataliza la hidrólisis del enlace N-glucosídico, generando un sitio abásico. A continuación, la enzima AP endonucleasa rompe el enlace fosfodiéster que permanecía intacto generando un extremo 3' hidroxilo libre y un extremo 5' desoxirribosa fosfato. En este punto se bifurca el proceso dependiendo de cuantos nucleótidos sean incorporados en la reparación del daño producido. En tripanosomátidos han sido identificadas todas las enzimas implicadas en el mecanismo de reparación por escisión de bases independientemente del proceso seguido. En el caso de que sea un nucleótido lo que se repare (“short-patch”), la incorporación del nucleótido con la base correcta tiene lugar por medio de la DNA polimerasa β (Tb927.5.2790), la cual presenta también actividad desoxirribosofosfodiesterasa que produce una eliminación del residuo desoxirribosa fosfato del extremo 5'. Por último, la enzima DNA ligasa sella la cadena quedando reparado el DNA (Wilson y Bohr, 2007). En el caso de que sean varios los nucleótidos incorporados (“long-patch”), en primer lugar se produce un desplazamiento de la hebra que presenta el sitio abásico en al menos dos nucleótidos. Las polimerasas implicadas en esta síntesis no están totalmente claras, aunque se sugiere que la DNA polimerasa β (Pol β) podría ser la responsable del inicio de la síntesis de la hebra que reemplazará a la que contiene el daño en combinación con las DNA polimerasas δ (Pol δ) (Tb927.2.1800) y ϵ (Pol ϵ) (Tb09.211.1820). A continuación tiene lugar una escisión de la cadena de nucleótidos desplazados por la endonucleasa FEN1 (Tb927.3.830) y finalmente la cadena de DNA se sella por medio de la DNA Ligasa I (Tb927.6.4780). Tanto en la reacción de polimerización de la nueva cadena de DNA como en la escisión de la vieja cadena por la actividad nucleasa se produce interacciones entre las enzimas y

PCNA (antígeno nuclear de proliferación celular) (Tb09.160.3710) (Sung y Demple, 2006) (Figura A.III.3).

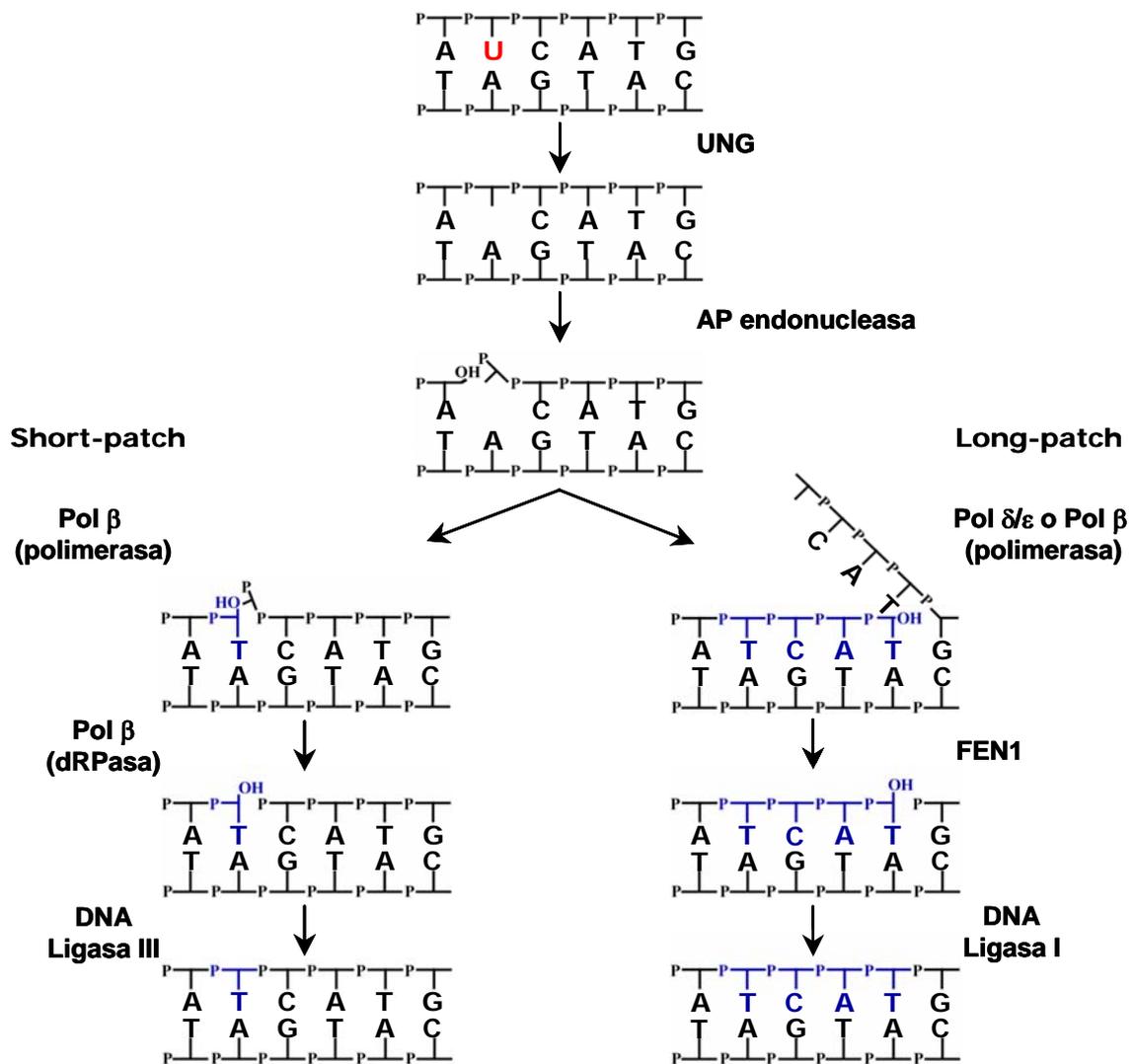


Figura A.III.3. Mecanismo de escisión-reparación de bases. Esquema del proceso de reparación desencadenado por la incorporación de uracilo al DNA, tanto la ruta “short-patch” como la “long-patch”. Las enzimas implicadas son: UNG, uracil DNA glicosilasa; AP endonucleasa; Pol β, DNA polimerasa β actividad polimerasa; Pol β, DNA polimerasa β actividad desoxirribosfodiesterasa; DNA ligasa III; Polδ/ε, DNA polimerasa δ/ε; FEN1, “flap” endonucleasa 1; DNA ligasa I.

A.III.5. Función biológica de la dUTPasa

La dUTPasa (E.C 3.6.1.23) cataliza la hidrólisis de dUTP produciendo como productos dUMP y pirofosfato. De la acción de esta enzima resultan dos consecuencias muy importantes para la célula. En primer lugar, se produce el aporte del sustrato para la síntesis de dTMP por parte de la timidilato sintasa, y por lo tanto la síntesis del nucleótido de timina que posteriormente será incorporado al DNA. En organismos procariotas, la dUTPasa supone un paso obligado en la síntesis *de novo* de timidilato a partir de citosina, ya que la desaminación de desoxicitosina a desoxiuridina ocurre en la forma trifosfato. En organismos eucariotas este paso se lleva a cabo a través de la forma monofosfato por lo que la vía de la dUTPasa no supone la única fuente del sustrato de la timidilato sintasa. En segundo lugar, la dUTPasa es la encargada de mantener unos niveles de dUTP muy bajos, impidiendo la incorporación errónea de este nucleótido al DNA. Este hecho ocurre por la incapacidad de la DNA polimerasa para distinguir entre dUTP y dTTP, por lo que en la célula es necesario que la relación entre estos dos nucleótidos se mantenga lo suficientemente baja (del orden de $1:10^5$) para que el sustrato mayoritario sea el dTTP, evitándose la incorporación de uracilo al DNA (Goulian *et al.*, 1980).

Si por determinadas causas, la célula sufre una alteración significativa en la relación dTTP/dUTP, se produce una incorporación masiva de nucleótidos de uracilo al DNA. Esta circunstancia desencadena el proceso de escisión-reparación de bases para resolver el problema de dicha incorporación. Una mayor disponibilidad de dUTP con respecto a dTTP conllevaría una elevada incorporación de uracilo y la actuación continuada de las enzimas uracil DNA glicosilasa y AP endonucleasa, por lo que aparecerían múltiples incisiones en el DNA. La presencia de estas incisiones, además de generar mutaciones, promueven procesos de reparación más drásticos que conducen a una fragmentación del DNA, recombinación y finalmente a una muerte celular (Ingraham *et al.*, 1986; Kunz *et al.*, 1994). Estas consecuencias son las que han sido descritas en el caso del uso de inhibidores de la síntesis de dTMP (Goulian *et al.*, 1980; Sedwick *et al.*, 1981; Curtin *et al.*, 1991), o en el proceso conocido como muerte celular por falta de timina desencadenado por una deficiencia de actividad timidilato sintasa (Tamanoi y Okazaki, 1978; Ayusawa *et al.*, 1983).

A.III.6. Enzimas “house-cleaning”

Recientemente se han descrito una serie de enzimas denominadas “house-cleaning”, las cuales se encargan de eliminar mediante hidrólisis compuestos tóxicos que se generan en el metabolismo celular, transformándolos en metabolitos celulares normales. Una serie muy importante de contaminantes para la célula que surgen a partir de la oxidación, desaminación, u otras modificaciones de nucleótidos canónicos, son los nucleósidos trifosfato (NTPs) no canónicos cuya incorporación en el DNA que se está sintetizando conduce a un incremento en la mutagénesis y daño en el DNA. Las enzimas que impiden esta incorporación por la DNA polimerasa actúan en paralelo con las enzimas de reparación del DNA que subsanan las lesiones producidas por nucleótidos modificados. Las enzimas “house-cleaning” NTP pirofosfatasa que tienen como sustratos NTPs no canónicos incluyen al menos cuatro superfamilias estructurales: todo- α NTP pirofosfatasa (dUTPasas diméricas, MazG, HisE, RS21-C6); dUTPasas (triméricas, monoméricas); hidrolasas de la familia NUDIX (relacionadas con la proteína bacteriana MutT); ITPasas (Maf/HAM1). Una característica general de estas enzimas es su alta afinidad por sus sustratos (dUTP, dITP, dXTP, 8-oxo-dGTP, 2-oxo-dATP, 8-oxo-dATP) (Figura A.III.4) con K_m en el rango micromolar, lo que les permite seleccionar dichos sustratos de una mezcla que puede contener NTPs canónicos en un exceso del orden de 10^3 veces (Galperin *et al.*, 2006).

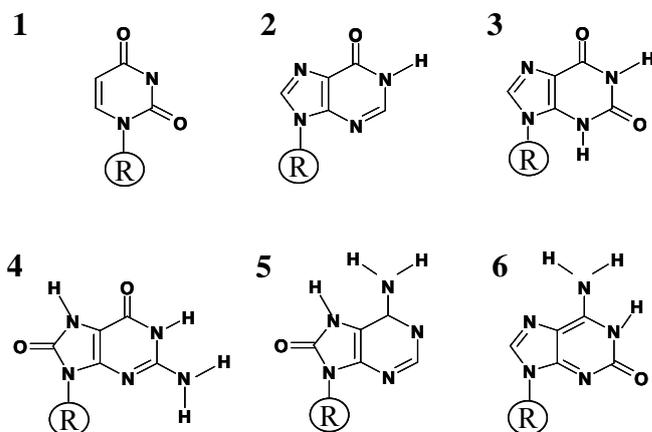


Figura A.III.4. Estructura de los diferentes nucleótidos no canónicos. 1) dUTP; 2) dITP; 3) dXTP; 4) 8-oxo-dGTP; 5) 2-oxo-dATP; 6) 8-oxo-dATP. R denota un grupo desoxirribosa trifosfato.

1. La superfamilia de las todo- α NTP pirofosfatasa se caracterizan por adoptar una estructura tridimensional compuesta exclusivamente por hélices α . Esta superfamilia se puede dividir en tres subfamilias: dUTPasas diméricas, proteínas relacionadas con la enzima MazG, HisE y RS21-C6.

- Las dUTPasas diméricas se encuentran en una variedad de organismos tales como bacterias y eucariotas, entre los que se incluyen importantes patógenos como *C. jejuni*, *S. aureus* y tripanosomátidos. Los sustratos naturales de esta enzima son el dUTP y el dUDP, a diferencia de su homóloga dCTP-dUTPasa en los fagos T4 y T2, en los que además de los anteriores pueden hidrolizar el dCTP y el dCDP. El dUTP es el NTP no canónico más común de todos los presentes en la célula, y como se ha dicho anteriormente, es un intermediario en la biosíntesis de nucleótidos de timina.
- Las proteínas relacionadas con la enzima MazG forman una gran familia representadas en toda la escala filogenética. Inicialmente se caracterizó a partir de *E. coli* y *Thermotoga maritima* como enzimas que hidrolizaban NTPs canónicos con una K_m de ~ 1 mM. Sin embargo la similitud de la estructura con la de las dUTPasas diméricas y estudios de modelización proponen que su sustrato natural es el 2-oxo-(d)ATP (isoGTP), el cual es un derivado mutagénico del ATP.
- HisE es una fosforribosil ATP pirofosfatasa que cataliza el tercer paso de la biosíntesis de la histidina y a menudo se fusiona con el dominio N-terminal de la fosforribosil AMP ciclohidrolasa (HisI) formando una enzima bifuncional HisIE. En levaduras, adicionalmente, contiene un dominio C-terminal histidinol deshidrogenasa. La estructura de la proteína HisE de *Mycobacterium tuberculosis* es todo- α y similar a las dUTPasas diméricas (Moroz *et al.*, 2005).
- La proteína RS21-C6 de ratón muestra una gran similitud de secuencia con las dUTPasas diméricas indicando que puede tener una potencial actividad dNTPasa. El sustrato propuesto para esta enzima es el m5dCTP. Una comparación de secuencia con la dUTPasa de *C. jejuni* y la MazG de *S. solfataricus* ha demostrado la existencia de los residuos implicados en la actividad pirofosfatasa e interacción con el magnesio por lo que se ha sugerido que el mecanismo de reacción podría ser similar al de las dUTPasas diméricas. La estructura tridimensional de la enzima RS21-C6 se ha obtenido tanto en forma nativa como formando un complejo con el m5dCTP demostrando que dicho sustrato establece una serie de interacciones similares a las establecidas en el caso de las dUTPasas diméricas (Wu *et al.*, 2007).

2. La superfamilia de las dUTPasas triméricas y monoméricas se diferencian de las diméricas en que presentan una estructura terciaria totalmente diferente, compuesta por hélices α y láminas β , y que su único sustrato es el dUTP y no el dUDP. Aunque esta clase de dUTPasas parecen ser los únicos componentes de esta superfamilia, recientemente se ha incluido también a la dCTP desaminasa (Johansson *et al.*, 2005).

3. La superfamilia NUDIX, a las que pertenece la enzima de *E. coli* MutT y proteínas relacionadas, se describieron como pirofosfatasas que presentan una baja especificidad para la hidrólisis del dGTP y otros NTPs canónicos con valores de K_m del rango milimolar (Bhatnagar y Bessman, 1988; Akiyama *et al.*, 1989). Posteriormente se caracterizó el 8-oxo-dGTP con K_m del rango nanomolar y K_D de 52 nM como su sustrato (Maki y Sekiguchi, 1992; Saraswat *et al.*, 2002). Una proteína relacionada con MutT es la MTH1 humana, la cual también puede hidrolizar eficientemente 2-oxo-dATP y 8-oxo-dATP. En general las enzimas NUDIX hidrolizan dinucleósidos polifosfatos, nucleótidos-azúcar, RNA con la estructura “cap” y dinucleótidos (Mildvan *et al.*, 2005). Además de eliminar NTPs no canónicos de la mezcla de nucleótidos, existen enzimas de esta familia que llevan a cabo un proceso de saneamiento retirando varios productos finales del metabolismo celular (Bessman *et al.*, 1996).

4. Por último, la superfamilia de las ITPasas engloban a las ITP pirofosfatasas, y proteínas relacionadas con Yjjx y Maf.

- La ITP pirofosfatasa fue descubierta en eritrocitos humanos en 1964 (Liakopoulou y Alivisatos, 1964) y caracterizada cinco años después (Chern *et al.*, 1969). La estructura tridimensional de la proteína MJ0226 de *Methanococcus janaschii* reveló una inusual enzima de unión a nucleótidos que específicamente hidrolizaba ITP y XTP (Hwang *et al.*, 1999). Existe un homólogo en humanos (Lin y col., 2001) y los homólogos de *E coli* (Ec197/YggV/RdgB) y levaduras (Hamp1) presentan un efecto protector frente a la mutagénesis y toxicidad causado por el análogo 6-N-hidroamilaminopurina (Noskov *et al.*, 1996; Burgis *et al.*, 2003).

- YjjX y Maf, son dos familias de proteínas que difieren en secuencia con la ITPasa pero muestran el plegamiento de esta última y son especialmente semejantes con respecto al supuesto sitio de unión de los grupos trifosfatos. En el caso de YjjX de *E. coli* la expresión de esta enzima confiere resistencia a dos análogos de 4-amino-2-metil-5-hidroximetilpirimidina (HMP), bacimetrin y CF₃-HMP, sin embargo no es efectiva frente a tiamina pirofosfato ni HMP-PP (Lawhorn *et al.*, 2004). Esto hace pensar que esta enzima reconoce específicamente derivados trifluoro y metoxi de la HMP.

Recientemente se ha identificado una proteína denominada YjjG que protege a la célula de derivados fluorados de pirimidina como el fluoro-2'-deoxiuridina (5-FdUridina), 5-fluorouridina, ácido 5-fluoroorotico (5-FOA), 5-fluorouracilo, y 5-aza-2'-deoxicitidina,. Previene la incorporación de 5-bromo-2'-deoxiuridina (BrdU), además de presentar actividad enzimática frente 5-fluoro-2'-deoxiuridina monofosfato (5-FdUMP). Esta proteína se ha clasificado como una hidrolasa de la familia de las haloácidos deshalogenasas (Titz *et al.*, 2007). En el caso de la enzima Maf, existen evidencias de que es una proteína de unión a nucleótidos o ácidos nucleicos, con la característica de que los sustratos presenten un grupo fosfato terminal (Minasov *et al.*, 2000). A partir del conocimiento de la estructura de ambas proteínas se ha sugerido que tanto las enzimas de la familia YjjX como de la Maf son NTP pirofosfatasas, aunque de especificidad todavía incierta (Galperin *et al.*, 2006).

A.IV. CARACTERÍSTICAS PRINCIPALES DE LA dUTPasa

Las dUTPasas de distintos organismos presentan una serie de características específicas en relación a su distribución filogenética, el papel que desempeñan en la célula, su conformación terciaria y sus propiedades físico-químicas. La existencia de estas diferencias constituyen una base para el desarrollo de inhibidores específicos que podrían ser utilizados en el desarrollo de nuevos fármacos.

A.IV.1. La dUTPasa, una enzima ubicua y conservada

A.IV.1.1. Distribución filogenética y evolución de las diferentes dUTPasas

Un análisis de la distribución de la dUTPasa en bacterias, arqueobacterias, eucariotas y virus muestra una gran variedad de enzimas codificadas en cada uno de los principales grupos filogenéticos, demostrando su carácter ubicuo. En la actualidad se establecen dos grandes familias de dUTPasas, las dUTPasas todo- β y las todo- α , las cuales se pueden dividir en cuatro variantes de dUTPasas dependiendo de la conformación estructural adoptada: dUTPasas triméricas, monoméricas y DCD-DUTasas (dCTP desaminasas-dUTPasa) pertenecientes a la primera familia; y dUTPasas diméricas pertenecientes a la segunda familia (Tabla A.IV.1).

Las dUTPasas de arqueobacterias parecen ser el grupo más uniforme, con una o dos enzimas relacionadas, las dUTPasas y las DCD-DUTasas que son codificadas en todos los genomas conocidos además de en virus de arqueobacterias. En eucariotas y sus virus, las dUTPasas monoméricas/triméricas son con diferencia las más abundantes, siendo las diméricas una rara excepción y por lo tanto un candidato potencial para el diseño de fármacos. En bacterias, la clásica dUTPasa trimérica puede ser codificada junto con (*Bacillus anthracis*, *Fusobacterium nucleatum* subsp. *vincentii*, *Lactobacillus plantarum*) o reemplazada por (*Bacillus cereus*, *Campylobacter jejuni*, *Mycoplasma pulmonis*) la dUTPasa dimérica. Destacar que la coexistencia de varias enzimas análogas es común en microorganismos con genomas relativamente grandes pero es extraño en parásitos que tienen genomas generalmente pequeños.

Es importante mencionar que ciertos microorganismos no presentan ninguna de las distintas dUTPasas conocidas. Para algunos microbios patógenos como *Mycoplasma genitalium* y *Borellia burgdorferi* puede explicarse por su estilo de vida parasítico, y presumiblemente confían la hidrólisis del dUTP al organismo huésped. Sin embargo la ausencia de dUTPasas en microorganismos de vida libre como *Vibrio cholerae* y *Thermotoga maritima* o como *Deinococcus radiodurans*, el cual es altamente resistente a radiación ionizante, es difícil de explicar. Estos organismos tampoco codifican una dCTP desaminasa, la principal enzima que produce dUTP.

Esta distribución desigual de las variantes de dUTPasas entre organismos que representan los principales grupos filogenéticos podría explicarse por una masiva transferencia horizontal de genes debido a la importante función de la dUTPasa en la replicación viral. Esta observación se hizo en primer lugar en las dUTPasas triméricas/monoméricas y actualmente se puede extender a las dUTPasas diméricas. En realidad, muchos virus codifican enzimas monoméricas o triméricas en su genoma. Una dUTPasa estrechamente relacionada con la dUTPasa de arqueobacterias es codificada en *Sulfolobus* spp. por el virus SIRV, permitiendo la transferencia del correspondiente gen entre diferentes especies de arqueobacterias.

Especies	dUTPasas			
	Todo β			Todo α
	Triméricas	Monoméricas	DCD-DUT	Diméricas
Bacterias				
ϵ-Proteobacterias				
<i>Campylobacter jejuni</i>	-	-	-	√
<i>Helicobacter pylori</i>	√	-	-	-
γ-Proteobacterias				
<i>Escherichia coli</i>	√	-	-	-
<i>Haemophilus influenzae</i>	√	-	-	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	√	-	-	-
<i>Vibrio cholerae</i>	-	-	-	-
Firmicutes				
<i>Bacillus subtilis</i>	√	-	-	-
<i>Bacillus anthracis</i>	√	-	-	√
<i>Bacillus cereus</i>	-	-	-	√
<i>Bacillus halodurans</i>	-	-	-	√
<i>Clostridium acetobutylicum</i>	√	-	-	√
<i>Lactobacillus plantarum</i>	√	-	-	√
<i>Mycoplasma genitalium</i>	-	-	-	-
<i>Mycoplasma penetrans</i>	√	-	-	-
<i>Mycoplasma pulmonis</i>	-	-	-	√
<i>Staphylococcus aureus</i>	-	-	-	√
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	√	-	-	-
Espiroqueta				
<i>Borellia burgdorferi</i>	-	-	-	-
<i>Treponema pallidum</i>	√	-	-	-
Otras phyla de bacterias				
<i>Aquifex aeolicus</i>	√	-	-	-
<i>Chlamydia trachomatis</i>	√	-	-	-
<i>Deinococcus radiodurans</i>	-	-	-	-
<i>Fusobacterium nucleatum</i> subsp. <i>nucleatum</i>	√	-	-	-
<i>Fusobacterium nucleatum</i> subsp. <i>vincentii</i>	√	-	-	√
<i>Thermotoga maritima</i>	-	-	-	-
Arqueobacterias				
<i>Methanococcus jannaschii</i>	√	-	√	-
<i>Pyrococcus furiosus</i>	√	-	-	-
<i>Aeropyrum pernix</i>	√	-	√	-
Eucariotas				
<i>Leishmania major</i>	-	-	-	√
<i>Trypanosoma cruzi</i>	-	-	-	√
<i>Trypanosoma brucei</i>	-	-	-	√
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	√	-	-	-
<i>Arabidopsis thaliana</i>	√	-	-	-
<i>Homo sapiens</i>	√	-	-	-
Virus				
Poxvirus, retrovirus	√	-	-	-
Herpesvirus	-	√	-	-
Fagos 77, phi11, phi12 de <i>S. aureus</i>	√	-	-	-
Fagos phiETA, phiPV83 de <i>S. aureus</i>	-	-	-	√
Fagos T2, T4, RB15, RB49	-	-	-	√
Virus SIRV de arqueobacterias	√	-	-	-

Tabla A.IV.1. Distribución filogenética de las diferentes familias de dUTPasas. Presencia o ausencia de cada una de las diferentes dUTPasas en el genoma completo de cada organismo en la base de datos COG y verificado mediante una búsqueda de homología (BLAST) frente a una base de datos de proteínas no redundantes a partir de las secuencias de *E.coli*, *C. jejuni*, y *M. jannaschii*. DCD-DUT denota a la proteína bifuncional dCTP desaminasa-dUTPasa (Homólogos de MJ0430) (Moroz *et al.*, 2004).

Mientras muchos bacteriófagos codifican dUTPasas diméricas, algunos fagos contienen un gen de dUTPasa trimérica. Por ejemplo, *Staphylococcus aureus* puede ser infectado por fagos que codifican las dos clases de dUTPasas. Entre especies de *Bacillus* existe una distribución de dUTPasas altamente inusual, probablemente debido al hecho de que la dUTPasa trimérica de *B. anthracis* y una de las dos enzimas en *B. subtilis* son codificadas en los profagos LambdaBa02 por el gen BA4112 y SPBc2 por el gen *yosS*, respectivamente. De la misma manera, la presencia de genes para ambos tipos de dUTPasas, diméricas y triméricas, en el genoma de *Lactobacillus plantarum* puede explicarse por la adquisición de la última del fago phi31 o Tuc2009.

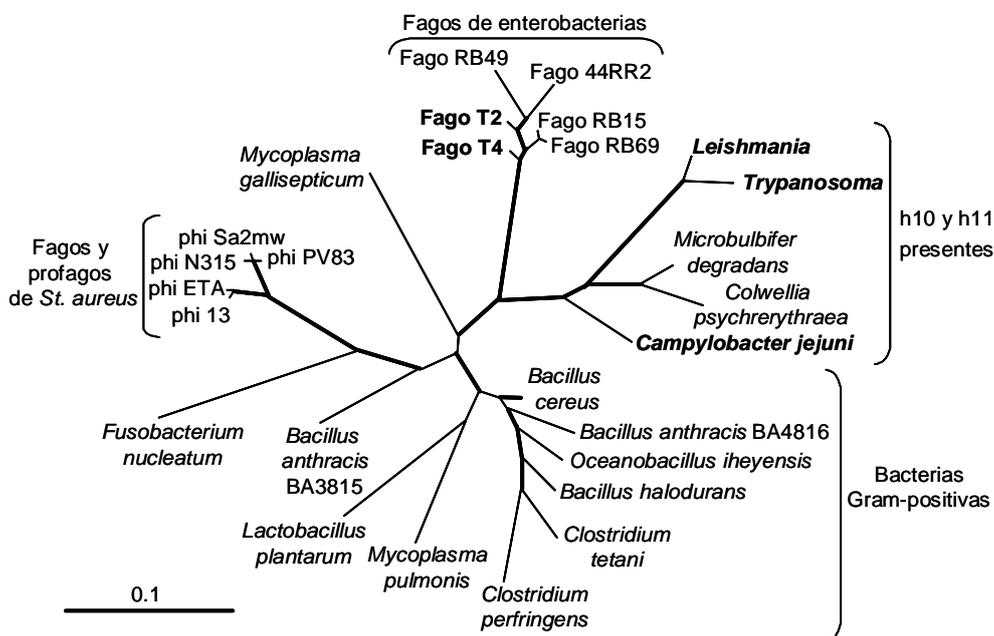


Figura A.IV.1. Árbol filogenético de las dUTPasas diméricas. Los organismos en los que ha sido caracterizada experimentalmente las enzimas se muestran en negrita. Las ramas que mostraron tanto un máximo de probabilidad como árboles de unión vecinos de > 85 % se indican en líneas gruesas. Además, fueron analizadas una serie de proteínas: fago 44RR2 (número de acceso del GenBank BACQ81345); fago RB15 (AAQ81345); fago RB69 (AAP75930); *B. cereus* (AAP11479); *O. iheyensi* (BAC14100); *B. halodurans* (BAB06852); *C. acetobutylicum* (AAK81467); *C. perfringens* (BAB82314); fago phi13 (AAL82354); fago phiN135 (BAB57038); fago phi Sa2mw (BAB95280) (Moroz *et al.*, 2004).

A partir de un estudio de la distribución de la dUTPasa dimérica se puede realizar un árbol filogenético (Figura A.IV.1), en el cual se muestra tres ramas claramente separadas: en primer lugar las enzimas de tripanosomátidos, *C. jejuni*, *M. degradans* y *C. psychreerythraea*; en segundo lugar las enzimas predichas en varias bacterias Gram-

positivas y sus fagos; y por último, las dCTP-dUTPasas en fagos enterobacterianos como el fago T4. Una característica del primer grupo de enzimas es la presencia de dos hélices α en el extremo C-terminal (h10 y h11), que no están presentes en ninguna de los otros dos grupos. El segundo grupo está compuesto por dos bloques que unen enzimas de *Clostridia* (1^{er} grupo), y enzimas de fagos de *S. aureus*, *F. nucleatum*, y posiblemente las proteínas BA3815 de *B. anthracis*. Esto indica que la dUTPasa dimérica presente en el genoma de *F. nucleatum* subsp. *vincentii* deriva de un fago. De la misma manera, el gen BA3815 de *B. anthracis* deriva de la secuencia de un profago. La amplia distribución de la dUTPasas diméricas entre bacterias Gram-positivas y sus fagos, comparado con la rareza de estas enzimas en bacterias Gram-negativas y eucariotas, podría indicar que han emergido primero en el linaje Gram-positivo y posteriormente se diseminaron a otros linajes a través de transferencia de genes mediado por fagos.

A.IV.1.2. Estructura tridimensional de las dUTPasas diméricas

La estructura de dUTPasa de *Trypanosoma cruzi* ha sido descrita tanto en su conformación nativa como en forma de complejo con el dUDP, revelando un plegamiento que difiere totalmente de las dUTPasas tanto triméricas como monoméricas (Harkiolaki *et al.*, 2004).

Cada subunidad presenta predominantemente un ordenamiento helicoidal, compuesto por 12 hélices h1-h12 (Figura A.IV.2 A) ordenadas en dos dominios distintos, denominados dominio rígido (residuos 30 y 187) y móvil (residuos 188 y 278) formando un ángulo entre ellos de $\sim 60^\circ$ (Figura A.IV.2 B). La unidad molecular es un homodímero formado por la asociación de dos dominios rígidos que constituyen un núcleo central y que permanece estático durante la unión del sustrato, a diferencia de lo que ocurre con el dominio móvil el cual sufre cambios estructurales sustanciales para acomodar el nucleótido entrante. La estructura se completa con varios bucles que conectan las hélices con los dominios y dos giros helicoidales de 3/4 (residuos 142-145 y 236-240). Tanto la estructura nativa como el complejo presentan regiones de una densidad electrónica pobre que parecen corresponder a dominios móviles (residuos 1-9, 97-100, 120-139, y 279-283).

Cuando el sitio activo se encuentra ocupado por el sustrato, el dominio móvil sufre reordenamientos estructurales importantes al unirse al nucleótido (Figura A.IV.2 C). La h9 sufre un giro helicoidal de 3/4 y la h10 es divide en dos partes, una sección 3_{10}

(residuos 223-226) y una hélice α (227-231). Además h12 se divide en dos pequeñas hélices, un segmento 3_{10} (h12a, residuos 264-266) y una α -hélice (h12b, residuos 268-275). Tras la unión del sustrato se produce un “zip” de dos cadenas β ($\beta 1$ y $\beta 2$, residuos 217-218 y 221-220, respectivamente) que cubren el sitio activo en una conformación estable. Además hélices del dominio móvil adoptan nuevas posiciones relativas y se deslizan unas con otras para cerrar el sitio activo.

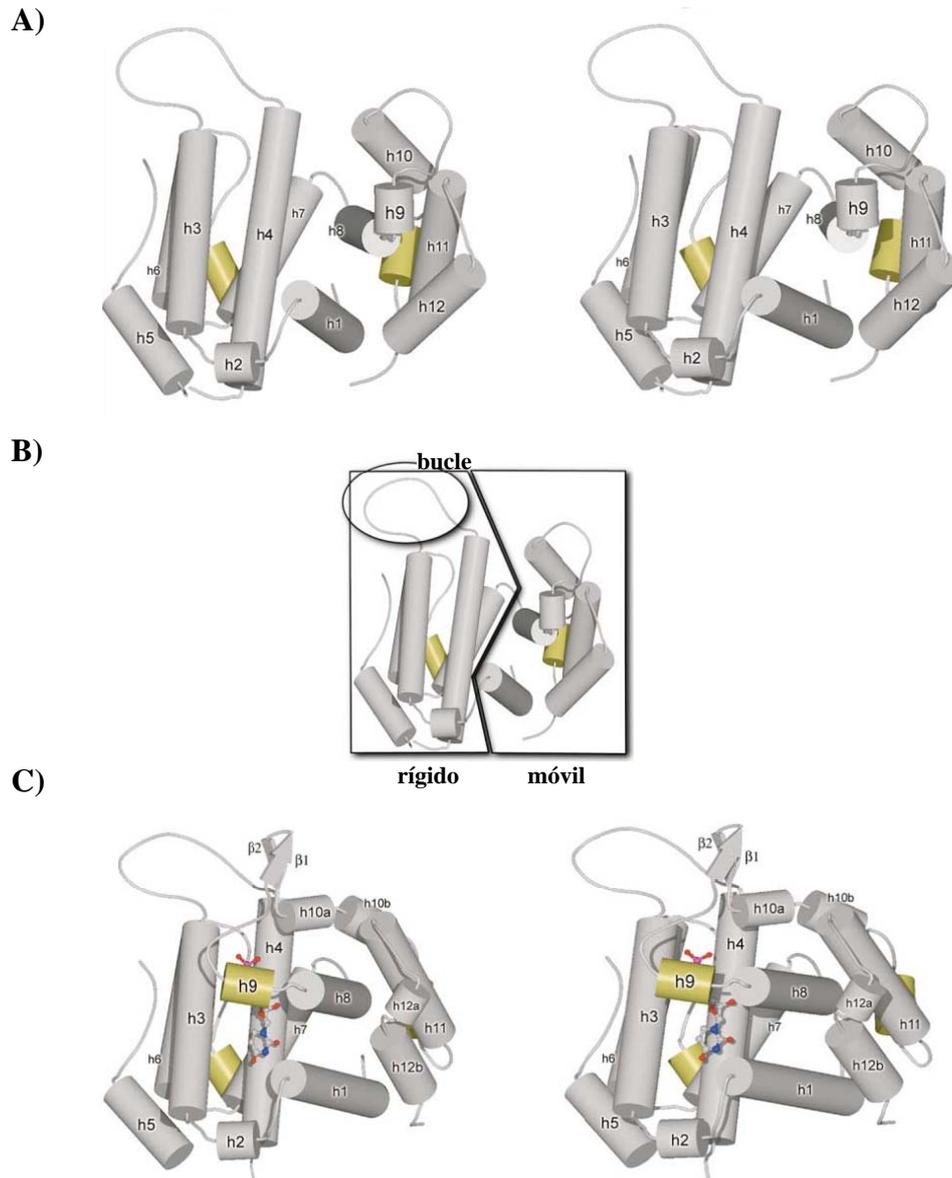


Figura A.IV.2. Estructura de la subunidad de la dUTPasas de *T. cruzi*. A) Estructura de la subunidad nativa con las hélices α representadas con cilindros numerados a partir del extremo N-terminal. B) Representación esquemática de los dominios de la subunidad. C) Estructura de la subunidad formando complejo con el dUDP, (Harkiolaki *et al.*, 2004).

Como se ha mencionado anteriormente, la unida molecular funcional es un dímero formado por la asociación de dos subunidades con un eje de simetría binario. El dímero se asocia principalmente a través de interacciones hélice-hélice de los dos dominios rígidos formando el núcleo central, siendo completado por la inserción de un lazo de una subunidad en la hendidura de la otra (Figura A.IV.3). Existen dos sitios activos por dímero localizados cada uno en la hendidura formada en la interfase de los dos dominios en la subunidad individual. Cada sitio activo está formado principalmente por residuos de una sola subunidad, pero es completado por residuos del lazo de la otra subunidad.

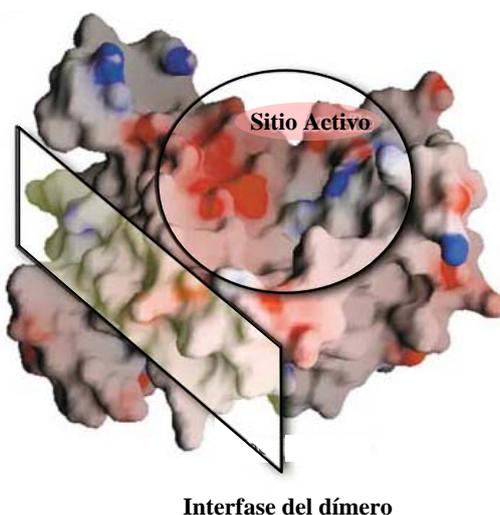


Figura A.IV.3. Estructura de la dUTPasas de *T. cruzi*. Representación electrostática de la superficie de una subunidad individual (Harkiolaki *et al.*, 2004).

La forma nativa adopta una conformación abierta con los sitios activos expuestos completamente al medio y cada dominio móvil en la posición distal al centro de masas del dímero. Cuando el sustrato se une a la enzima, tiene lugar un reordenamiento del dominio móvil sepultando el sustrato debajo de la superficie de cada subunidad quedando sólo una parte de la agrupación fosfato expuesto a un canal central de la interfase de las dos subunidades (Figura A.IV.4).

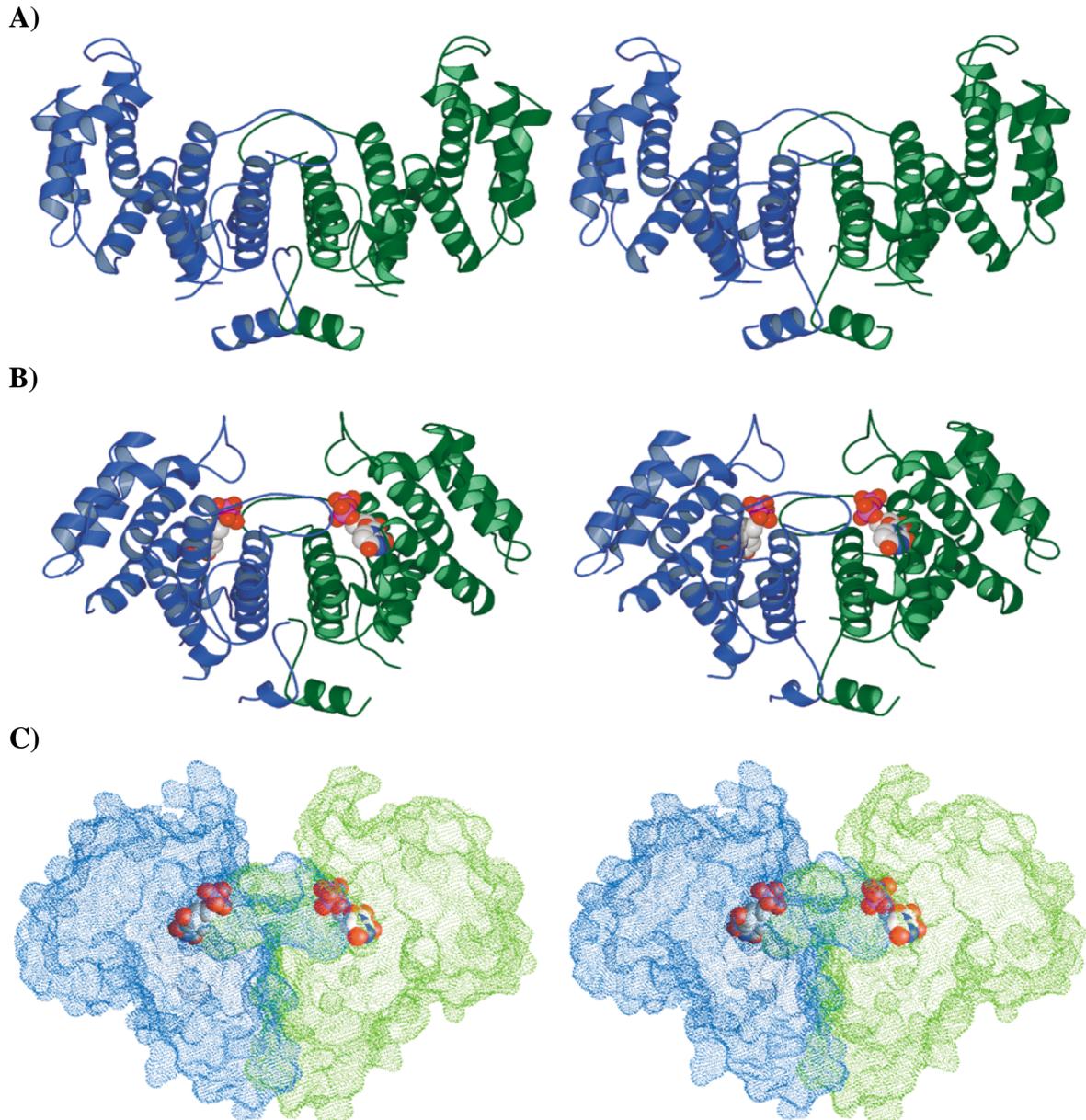


Figura A.IV.4. Estructura tridimensional del dímero funcional de la dUTPasa de *T. cruzi*. A) Conformación de la enzima nativa con los sitios activos en ausencia de sustrato. B) Conformación de la enzima con los sitios activos ocupados por el nucleótido. C) Representación de la superficie de la enzima (Harkiolaki *et al.*, 2004).

Las dUTPasas de *T. cruzi* y *L. major* presentan un alto grado de especificidad de sustrato e hidrolizan tanto el dUTP como el dUDP (Camacho *et al.*, 2000; Bernier-Villamor *et al.*, 2002). La base de uracilo se une a la enzima a través de enlaces de hidrógeno con los átomos de la cadena lateral de los residuos Asn26, Gln22 y Trp61, y una vez unido la cadena lateral de la Asn26 se cierra sobre el anillo de uracilo. En lo que

se refiere al azúcar, la desoxirribosa es anclada a través de dos enlaces de hidrógeno con los átomos $O_{\delta 1}$ y $N_{\delta 2}$ de la Asn201. Adicionalmente, dos residuos aromáticos (Phe84 y His83) flanquean el azúcar impidiendo cualquier movimiento una vez unido el sustrato. Los fosfatos están girados y posicionados dentro de una red de enlaces de hidrógeno formado con un número de residuos entre los que se incluyen: Trp62, Tyr209, Arg204, Lys197, Asn224, Lys216, Glu49, Glu52 y Glu77 (Figura A.IV.5).

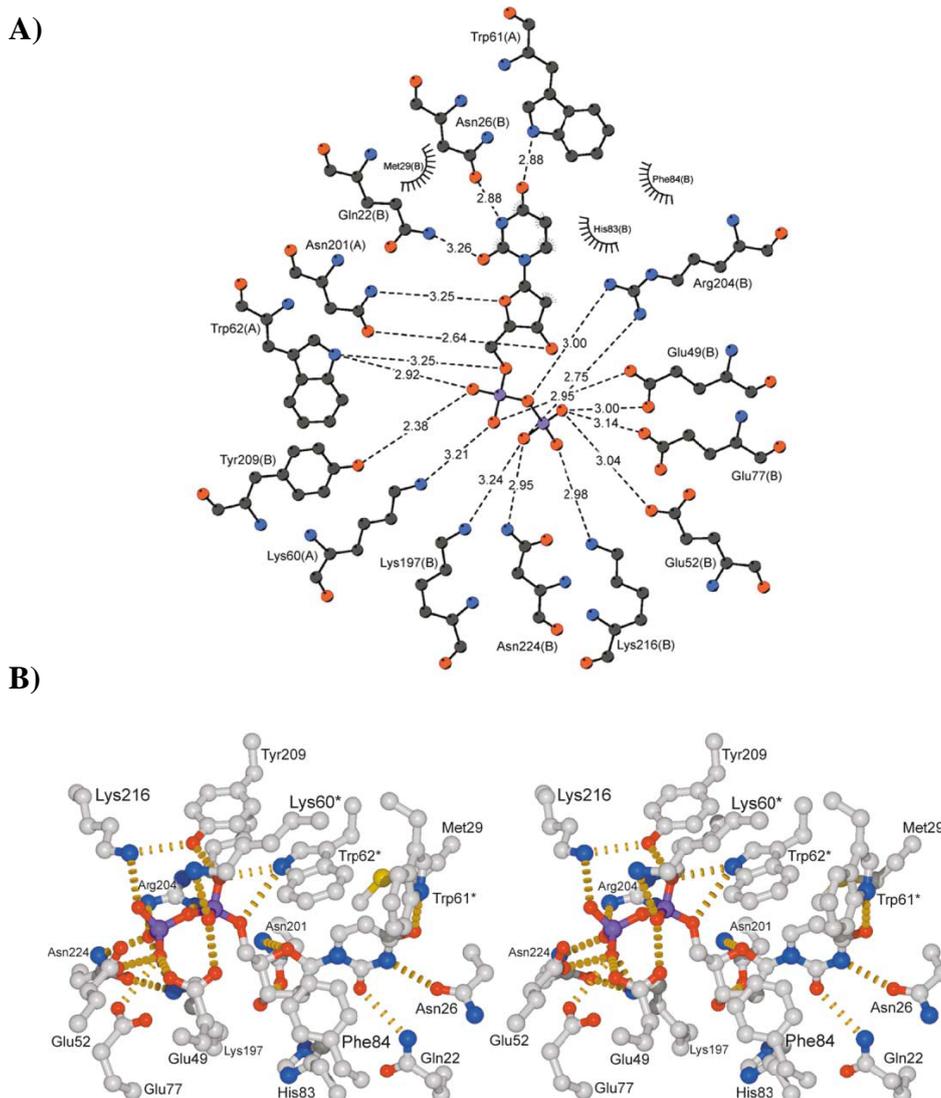


Figura A.IV.5. Representación de las interacciones establecidas entre residuos del centro activo y el sustrato. A) Representación en dos dimensiones de las interacciones establecidas en el sitio activo mostrando la longitud de los enlaces entre el ligando y la proteína. B) Representación de las interacciones de los residuos del sitio activo y el dUDP, mostrando los puentes de hidrógeno con líneas discontinuas, (Harkiolaki *et al.*, 2004).

El mecanismo de acción de la hidrólisis del dUTP o dUDP fue descrito a partir de la estructura tridimensional del complejo dUTPasa-dUpNHp de *C. jejuni* en presencia de iones magnesio (Figura A.IV.6). En la estructura están presentes tres iones magnesio por unidad, coordinados por tres residuos de glutamato (Glu46, Glu49 y Glu74) y uno de aspartato (Asp77). Una molécula de agua es el candidato probable que actúa como agente nucleofílico en la catálisis. Dicha molécula de agua es coordinada por dos iones magnesio y está geoméricamente posicionada para que tenga lugar un ataque lineal sobre el grupo fosfato β del nucleótido dUTP. Además, los tres iones magnesio favorecen la salida del grupo saliente, dUMP, una vez terminada la reacción (Moroz *et al.*, 2004).

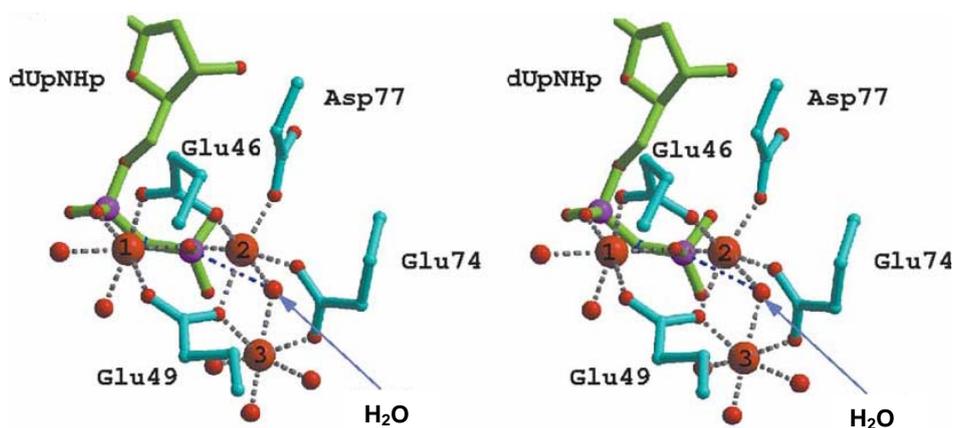


Figura A.IV.6. Representación estérica del grupo desoxirribosa fosfato del dUpNHp con los iones magnesio unidos. Los dos magnesios coordinan la hipotética molécula de agua nucleofílica. Los diferentes residuos conservados implicados en la unión a magnesio, Asp y Glu, se muestran en azul, las moléculas de agua en rojo, la molécula nucleofílica de agua se indica mediante una flecha, y la línea discontinua azul denota la supuesta dirección del ataque nucleofílico, (Moroz *et al.*, 2004).

Las dUTPasas diméricas presentan 5 motivos altamente conservados y un motivo adicional que se forma sólo cuando el sustrato está unido (Moroz *et al.*, 2004) (Figura A.IV.6). El Motivo 1 está implicado en el reconocimiento de la base de uracilo, a través de los átomos de $N^{\delta 2}$ del Glu14 y $O^{\delta 1}$ de la Asn18 que coordinan los átomos de O2 y N3 del uracilo, respectivamente. A diferencia de la enzima de *T. cruzi*, en *C. jejuni* la Asn22

forma un adicional enlace con la base, mientras que el correspondiente Asp es excluido del sitio activo en la enzima de *T. cruzi*.

El Motivo 3 pertenece al lazo de dimerización que se intercambia entre subunidades. Los residuos esenciales son el Trp56, que estabiliza el bolsillo de unión del ligando y la Lys57 que forma un enlace de hidrógeno con uno de los iones magnesio que están coordinando la molécula de agua. Otro residuo conservado es la Lys60, la cual podría coordinar el fosfato γ en el dUTP. El residuo His58 (Trp en *T. cruzi*) forma un enlace de hidrógeno entre el N^{ε3} y el O4 del uracilo siendo posiblemente la principal causa de la discriminación entre uracilo y citosina. El residuo Trp59, implicado en la formación del bolsillo de unión del ligando, coordina el fosfato α e interacciona con dos residuos conservados del segundo subdominio móvil. El Motivo 4 se localiza en la hélice 4 y contiene dos residuos de unión al magnesio (Glu74 y Asp77) y dos residuos no polares (His80 y Phe81) que acoplan la desoxirribosa. En el Motivo 5, al cual pertenece la hélice 9 del segundo subdominio móvil, los residuos más importantes son la Lys175 y la Arg182 que están implicados en la unión del fosfato y Asn179 que se une a la desoxirribosa. Además, existe una región conservada que empieza justo antes de la hélice10 y termina al comienzo de ésta, la cual contiene un residuo de Lys194 que podría interaccionar con el fosfato γ . En la estructura de *T.cruzi* se describió la presencia de dos láminas β cortas (194-195 y 199-200) que sólo se forman una vez que tiene lugar la unión del sustrato y que estarían estabilizando el bucle después de cubrir el ligando. Un residuo muy importante es el Glu200 ya que coordina dos moléculas de agua unidas a magnesio. Esta región se considera como un nuevo motivo (Motivo 6) (Figura A.IV.7).

INTRODUCCIÓN

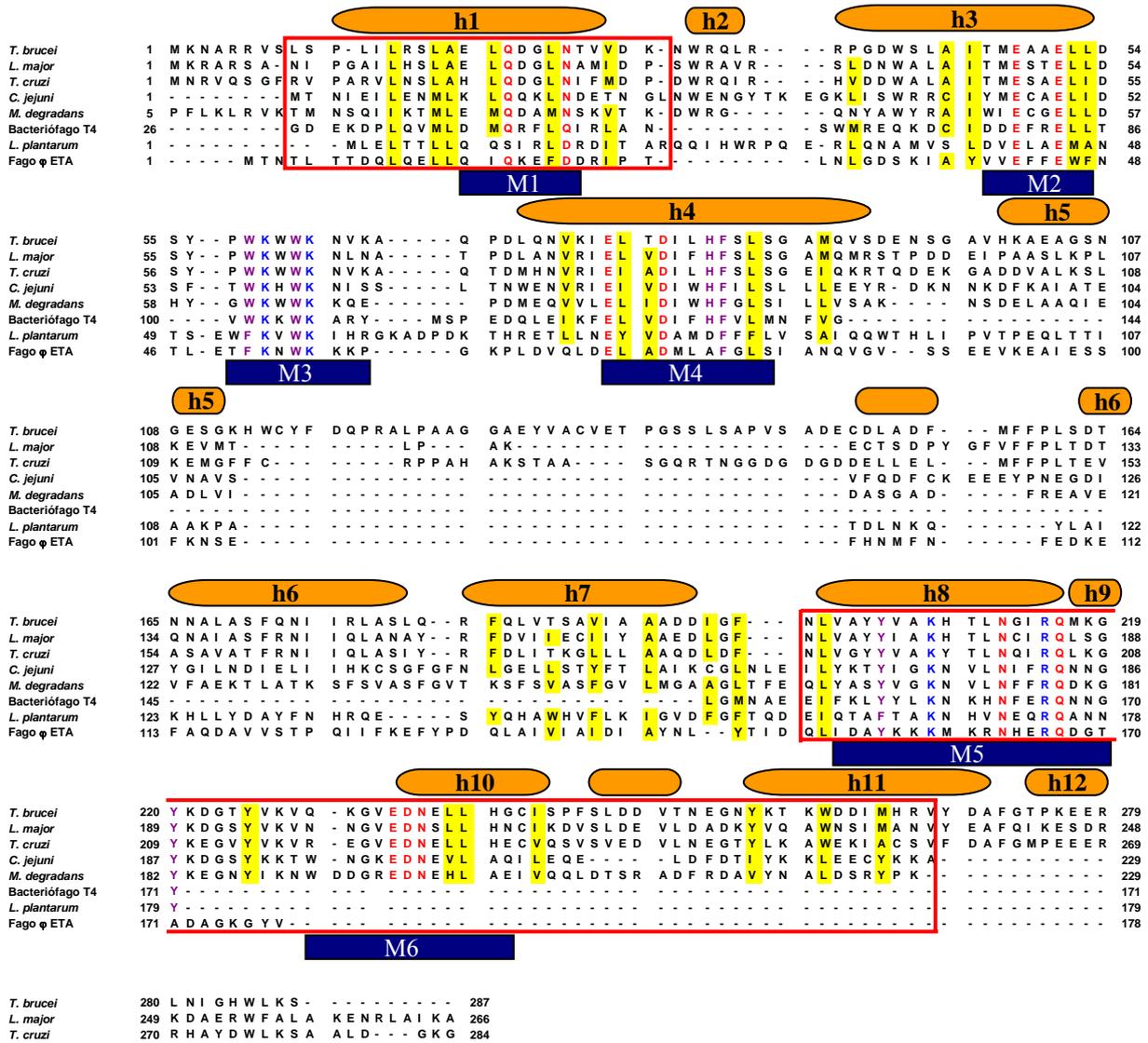


Figura A.IV.7. Alineamiento de las secuencias de aminoácidos de varias dUTPasas diméricas de diferentes organismos. El alineamiento fue ajustado manualmente tras ser obtenido mediante PSI-BLAST. Los códigos de acceso de las base de datos Swiss-Prot o GenBank, o de la identificación del gen en NCBI fueron: *T. brucei* XP846139; *L. major* AAC02795; *T. cruzi* AAB86379; *C. jejuni* CAB73874; *M. degradans* ZP00066466; Bacteriófago T4 AAD42499; *L. plantarum* CAD64028; Fago ϕ ETA BAA97620. Los residuos conservados se detallan en color con el siguiente significado: Asp / Asn / Glu / Gln, rojo; Arg / Lys, azul; residuos aromáticos, púrpura; residuo hidrofóbicos, fondo amarillo. Los motivos conservados se indican mediante una barra azul en la parte inferior de la secuencia de aminoácidos y el dominio móvil mediante cajas rojas. La estructura secundaria de la dUTPasa de *T. cruzi* se indica encima de las secuencias de aminoácidos.

A.IV.1.3. Estructura tridimensional de las dUTPasas triméricas y características de la especificidad de sustrato

La primera estructura descrita y mejor conocida es la de la enzima de *E. coli*, cuyo conocimiento facilitó el desarrollo de modelos estructurales de otras dUTPasas triméricas (Mol *et al.*, 1996; Fiser y Vertessy, 2000).

La estructura de la dUTPasa humana se ha obtenido tanto en forma nativa como formando complejos con dUMP, dUDP y dUTP (Mol *et al.*, 1996). Cada subunidad está formada por un núcleo central de hojas β y un dominio C-terminal flexible. Para que la proteína sea funcional, al igual que en las diméricas, es preciso que se produzca un ensamblaje de las tres subunidades, de tal manera que los tres centros activos adopten una conformación correcta. Las tres subunidades de la enzima están ordenadas sobre un eje ternario estableciéndose una serie de interacciones hidrofóbicas que mantienen el esqueleto de la estructura.

Cada centro activo se sitúa en la interfase de dos de los monómeros, y en su formación participan residuos de las tres subunidades, donde la tercera subunidad actúa a modo de brazo flexible cerrando el centro activo una vez unido el sustrato (Figura A.IV.8).

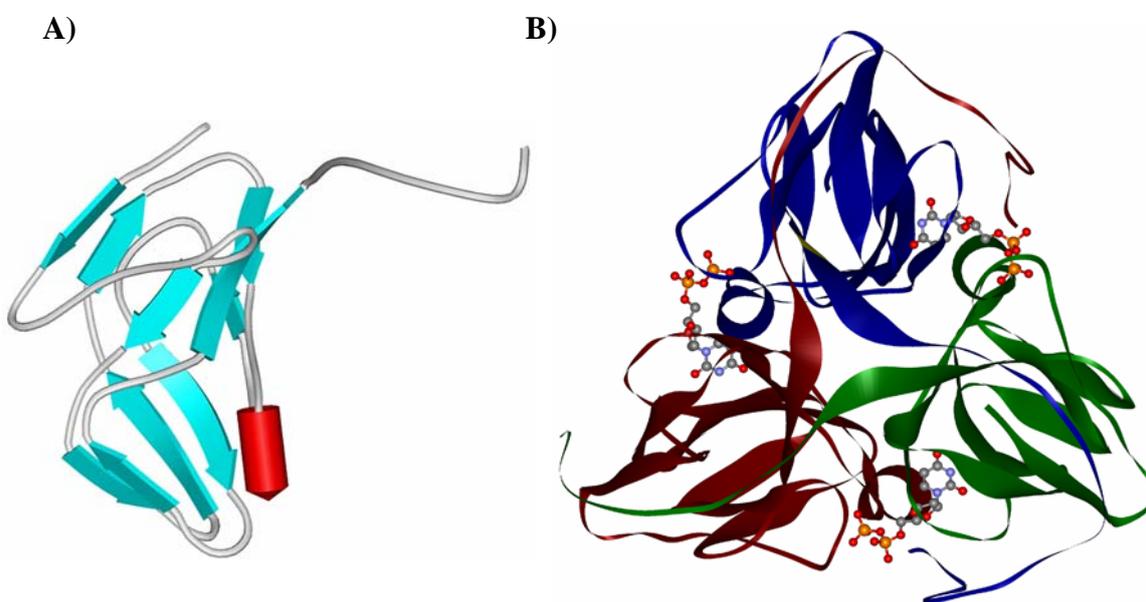


Figura A.IV.8. Estructura tridimensional de la dUTPasa humana. (A) Estructura tridimensional de uno de los monómeros de la dUTPasa humana con 8 hojas β y una hélice α en su estructura secundaria. (B) Estructura tridimensional de la dUTPasa humana en la que cada subunidad está representada con un color, obtenida a partir de cristales de la dUTPasa humana con el dUDP. En los sitios activos se encuentran tres moléculas de dUDP, y en su formación participan las tres subunidades.

Cada subunidad está formada por 8 hojas β , las cuales adoptan una estructura de barril denominada “jelly roll”. El barril se cierra con una tapa cónica formada por 5 hojas β antiparalelas, las cuales se extienden desde el barril a la única α hélice de la estructura. La hoja $\beta 8$ continúa fuera de la subunidad hasta alcanzar el sitio activo que forman los otros dos monómeros (Figura A.IV.9). Dentro del barril β de cada monómero, la hoja $\beta 5$ se encuentra dividida por la Ala75 en dos segmentos, creándose un bolsillo de unión que permite la inserción del grupo uracilo del dUTP entre las dos hojas $\beta 5$ y $\beta 6$ antiparalelas.

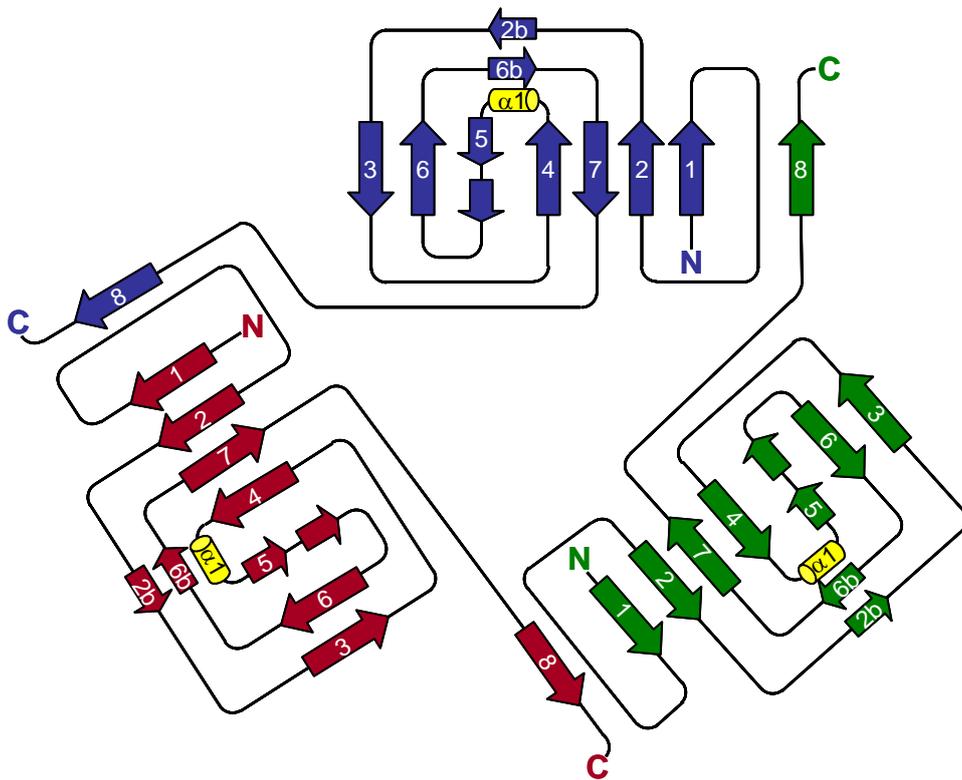


Figura A.IV.9. Diagrama topológico de la estructura secundaria dUTPasa humana. Cada una de las subunidades está coloreada de forma diferente. Las hojas β que forman el barril se encuentran numeradas. La lámina $\beta 8$ procede de una subunidad adyacente. Destaca también la hélice α entre las hojas $\beta 4$ y $\beta 5$ y las láminas 2b y 6b que se encuentran en la periferia cerrando el barril.

El mecanismo de acción de la hidrólisis en esta clase de enzimas es parecido al de las dUTPasas diméricas donde una molécula de agua actúa como nucleófilo. Esta enzima presenta una alta especificidad por el uracilo ya que la citosina no puede donar un hidrógeno al carbonilo ni establecer un puente de hidrógeno con la amida de la

Gly87, y el dTTP produce un impedimento estérico con los residuos Ala76, Gly74 y el residuo del monómero adyacente Ser93.

El grupo fosfato y el ión magnesio se sitúan en una región muy cargada, donde el grupo fosfato interacciona con los residuos Arg62, Ser63 y Gly64 (pertenecientes al motivo 3) del monómero adyacente al que reconoce el uracilo y el azúcar. También el brazo rico en glicinas del extremo carboxilo del monómero opuesto al sitio activo (motivo 5) reconoce el grupo fosfato así como la agrupación uracilo y la desoxirribosa.

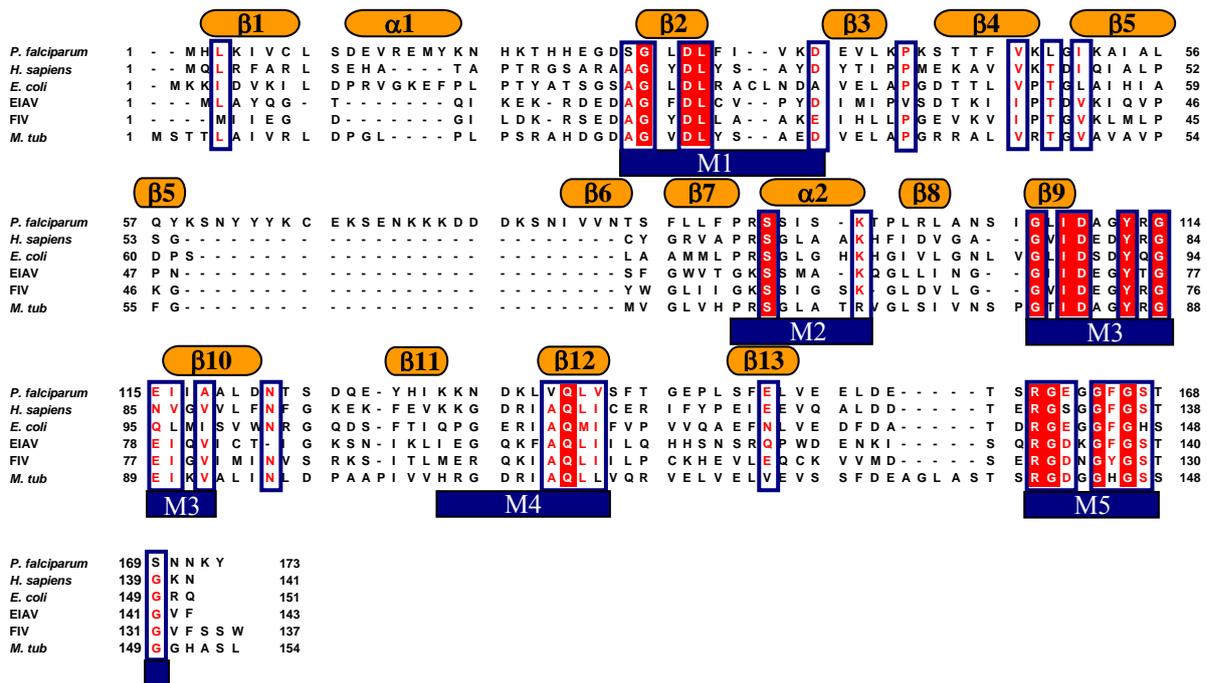


Figura A.IV.10. Alineamiento de las secuencias de aminoácidos de varias dUTPasas triméricas. El alineamiento fue ajustado manualmente tras ser obtenido mediante el programa ESPrpt (Gouet *et al.*, 1999). EIAV, virus de la anemia infecciosa equina; FIV, virus de inmunodeficiencia felina; *M. tub*, *M. tuberculosis*. Los elementos de la estructura secundaria corresponden a la estructura de *P. falciparum*. Los residuos totalmente conservados son señalados con bloques rojos, mientras que los que están muy conservados se identifican por cajas azules. Debajo de la secuencia se señalan los cinco motivos conservados de las dUTPasas triméricas (Whittingham *et al.*, 2005).

Mediante mutagénesis dirigida en la dUTPasa humana se han identificado residuos implicados en el mecanismo de catálisis: Ala75 (monómero 1), Ser63 (monómero 2), Phe135 (monómero 3). En otros organismos estos estudios han sugerido que el residuo catalítico es un ácido aspártico (Asp79 en la secuencia humana) que

interviene en un mecanismo de catálisis general ácido-base (Harris y col., 1999) y que la flexibilidad del brazo del extremo carboxilo es utilizada por la enzima para la liberación de los productos de la reacción de hidrólisis (Shao *et al.*, 1997).

La estructura de la dUTPasa de *Plasmodium falciparum* ha sido cristalizada mostrando los cinco motivos conservados característicos de esta familia de dUTPasas. Una diferencia respecto a otras proteínas es la presencia de una inserción de 25 aminoácidos empezando en el residuo 59, la cual contiene características de una región de baja complejidad (Figura A.IV. 10) (Brocchieri, 2001).

A.IV.1.4. Estructura tridimensional de las dUTPasas monómericas y características de la especificidad de sustrato

A esta familia de dUTPasas pertenecen las enzimas codificadas por herpesvirus de mamíferos y aves, como el virus del herpes simple, citomegalovirus y el virus de varicela-zoster. Presentan una homología limitada con las dUTPasas triméricas ya que los cinco motivos que forman el centro activo están presentes pero reorganizados y extendidos sobre un único polipéptido, el cual es el doble de largo que la secuencia de una subunidad de las triméricas. Se ha postulado que estas enzimas se originaron a partir de una duplicación de un gen que codificaba una enzima trimérica (McGeoch, 1990; Baldo y McClure, 1999; McGeehan *et al.*, 2001).

Recientemente se ha cristalizado la dUTPasa del virus de Epstein-Barr (EBV) formando un complejo con el dUMP y el análogo α,β -imino-dUTP (Tarbouriech *et al.*, 2005). La estructura se puede dividir en tres dominios, ocupando cada dominio la posición correspondiente a una subunidad de las enzimas triméricas (Figura A.IV.11). El plegamiento de los dos primeros dominios (residuos 1-116, dominio I y 117-219, dominio II) está relacionado con dos de las subunidades de las dUTPasas triméricas, basándose en un barril- β formado por un motivo modificado “jelly-roll”. El dominio III (residuos 220-278) tiene una estructura secundaria que sólo tiene homología con el motivo 5, localizado en el extremo C-terminal.

La enzima monomérica presenta similitudes con las dUTPasas triméricas en lo referente al mecanismo de reacción y las interacciones entre sustrato y enzima. Con respecto al mecanismo de reacción, una molécula de agua en presencia de iones magnesio produciría un ataque nucleofílico.

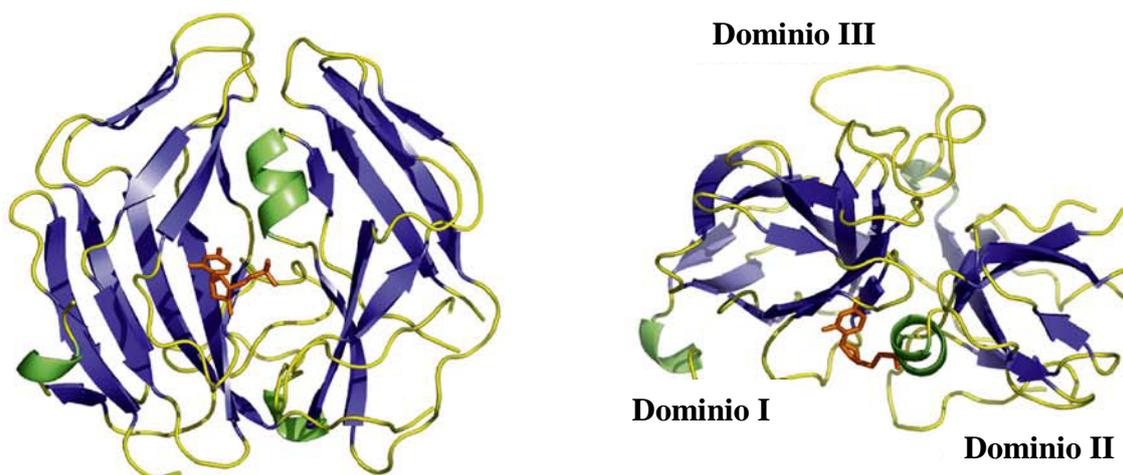


Figura A.IV.11. Estructura tridimensional de la dUTPasa monomérica del virus de Epstein-Barr. Las hélices α se indican en color verde, las láminas β en azul, las estructuras en bucle en amarillo y el sustrato en naranja (Tarbouriech *et al.*, 2005).

A.IV.2. Propiedades cinéticas de las dUTPasas

La reacción catalizada por la dUTPasa consiste en la hidrólisis del dUTP dando como productos el dUMP y pirofosfato (PPi) (Figura A.IV.12). Durante este proceso tiene lugar una liberación de protones que se utiliza para estudiar de una forma sencilla el curso de la reacción (Larsson *et al.*, 1996b). Para que se pueda llevar a cabo la hidrólisis es necesario que en el medio esté presente magnesio, aunque otros iones divalentes pueden sustituirlo (Giroir y Deutsch, 1987; Shao *et al.*, 1997; Williams y Studebaker, 2004). Se ha descrito que son tres los iones magnesio que participan en la reacción de hidrólisis del dUTP, coordinando la molécula de agua que actúa como nucleófilo, de tal manera que queda posicionada para que pueda llevarse a cabo un ataque lineal sobre el grupo fosfato β del nucleótido dUTP. Además, los tres iones magnesio favorecen el proceso de expulsión del grupo saliente una vez terminada la reacción (Moroz *et al.*, 2004).

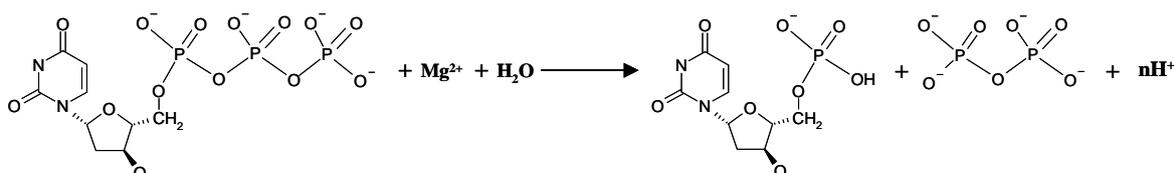


Figura A.IV.12. Reacción de la dUTPasa. N es el número de protones liberados al medio durante la reacción dependiendo del pH y concentración de magnesio de la reacción.

Todas las dUTPasas descritas hasta la fecha, cualquiera que sea la familia, han demostrado tener un elevado grado de especificidad de sustrato (Tabla A.IV.1). Esta característica es lógica teniendo en cuenta la función que desempeña en la célula de eliminar de la mezcla intracelular de nucleósidos trifosfato exclusivamente el dUTP, impidiendo su incorporación al DNA y proporcionando el sustrato para la síntesis de timidilato. Las dUTPasas han evolucionado, por tanto, para adquirir una exquisita especificidad de sustrato y consecuentemente son capaces de distinguir entre las diferentes bases, el azúcar y la agrupación fosfato. Con respecto a la agrupación fosfato, tanto las enzimas triméricas como diméricas, tienen la capacidad de unir el dUDP, pero exhiben diferentes propiedades ya que en las enzimas triméricas se comporta como un inhibidor competitivo, mientras que en el caso de enzimas diméricas es eficientemente hidrolizado (Hidalgo-Zarco *et al.*, 2001; Bernier-Villamor *et al.*, 2002).

Las constantes de Michaelis (K_m) determinadas para el dUTP muestran unos valores muy pequeños, entre 0.1 y 12 μM , que reflejan las bajas concentraciones de dUTP necesarias para una eficiente actuación de la enzima. Sin embargo, las constantes catalíticas no son muy elevadas comparadas con otras proteínas enzimáticas, por lo que se cree que han evolucionado para conseguir una elevada especificidad de sustrato, sacrificando capacidad catalítica.

K_m (μM) (K_{cat} / K_m) ($\text{M}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$)	<i>L. major</i> ¹	<i>H. sapiens</i> ²	<i>E. coli</i> ³	EIAV ⁴	HSV-1 ⁵	MMTV ⁶
dUTP	2.11 (2×10^7)	0.1 (2×10^7)	0.2 (2×10^7)	1.1 (2×10^7)	0.3 (2×10^7)	0.8 (2×10^7)
dTTP	1514 (5100)	3000 (<20)	>20000 (34)	260 (<2000)	400 (1000)	nd (2000)
dCTP	>2500 (5000)	nd	4000 (<100)	3000 (1000)	1000 (2000)	nd
UTP	>2500 (2000)	nd	2500 (<1000)	nd	1000 (200)	nd
dUDP	62.7 (1×10^6)	nd	$K_i=15$	$K_i=3.6$	$K_i=17$	nd
dUMP (K_i)	12.35	162	1500	130	170	nd

Tabla A.IV.1. Parámetros cinéticos de algunas dUTPasas. Constantes de especificidad y de inhibición de dUTPasas de tripanosomátidos (*L. major*), virales (EIAV, HSV-1 y MMTV), bacterianas (*E. coli*) y humana, para distintos nucleótidos. ¹(Hidalgo-Zarco *et al.*, 2001); ²Nord, Tesis Doctoral, 2000; ³(Larsson *et al.*, 1996a); ⁴(Nord *et al.*, 1997); ⁵(Bergman *et al.*, 1998); ⁶(Bjornberg y Nyman, 1996). nd (no determinado).

Un caso interesante son las enzimas dCTPasa-dUTPasa de los fagos T2y T4 de *E. coli*. Son enzimas que presentan diferencias a nivel de secuencia aminoacídica con las dUTPasas de la misma familia, y además tienen un comportamiento cinético que varia en relación con la especificidad de sustrato. La actividad hidrolítica para los dos sustratos, dCTP y dUTP, se localiza en el mismo sitio activo, lo cual implica un reconocimiento más versátil para la base pirimidínica que permite la hidrólisis de ambos nucleótidos (Warner y Barnes, 1966). Además se observa que la enzima es capaz de hidrolizar eficientemente los derivados difosfato dCDP y dUDP a los correspondientes nucleósidos monofosfato (Greenberg *et al.*, 1966). En términos bioquímicos estas actividades adicionales deben ser útiles, teniendo en cuenta que los derivados difosfato son aparentemente simples intermediarios en la síntesis e interconversión de los distintos nucleótidos y que su hidrólisis a los correspondientes nucleósidos monofosfato canaliza el tráfico de los desoxirribonucleótidos de uracilo y citosina hacia la obtención de los nucleótidos de timina e hidroximetilcitosina respectivamente.

A.IV.3. Mecanismos de regulación de las dUTPasas

Las dUTPasas presentan un perfil de regulación que difiere dependiendo del organismo al que pertenezca la enzima. En eucariotas superiores y en la mayoría de los organismos eucarióticos la dUTPasa está regulada durante el ciclo celular, alcanzando una mayor expresión al final de la fase G1 o comienzos de la fase S, la cual perdura durante toda esta fase de la proliferación celular (Strahler *et al.*, 1993). Dado el papel de la dUTPasa, es lógico pensar que los niveles de la enzima sean mayores durante la fase en la cual tiene lugar la replicación del DNA, ya que se necesita una concentración de nucleótidos adecuada para evitar una síntesis incorrecta o la generación de mutaciones (Johnston y Lowndes, 1992).

Por otro lado la actividad dUTPasa se regula también dependiendo del estadio de diferenciación celular. Así, células en proliferación presentan una mayor actividad dUTPasa en comparación con células diferenciadas (Pardo y Gutierrez, 1990; Hokari *et al.*, 1995). En linfocitos maduros, la correlación entre los niveles de dUTPasa y el estado de proliferación indica que la enzima esté sobreexpresada en estados asociados con síntesis de DNA, mientras que en una población de linfocitos inmaduros los niveles de la enzima son constitutivos (Strahler *et al.*, 1993).

También se ha descrito la existencia de una regulación a nivel transcripcional que podría inducir una activación de la dUTPasa en estados de daño excesivo del DNA (Kunz y Kohalmi, 1991) y de esta forma permitiría a la célula tener mayor disponibilidad de nucleótidos para reparar lesiones.

En células humanas existen dos isoformas de dUTPasa, una mitocondrial (DUT-M) y una nuclear (DUT-N) (Ladner *et al.*, 1996). Ambas isoformas son codificadas por el mismo gen y se generan a través del uso de exones 5' alternativos (Ladner y Caradonna, 1997). Análisis mediante “western blot” y “northern blot” revelaron que la expresión tanto de proteína como de mRNA de la isoforma DUT-M tiene lugar de forma constitutiva y es independiente de la fase del ciclo celular o del estado de proliferación. Sin embargo, los niveles de proteína y de mRNA para la isoforma DUT-N están fuertemente regulados en el ciclo celular, expresándose casi exclusivamente durante la replicación del DNA (fase S) (Ladner y Caradonna, 1997). Mediante técnicas inmunohistoquímicas, se ha detectado DUT-N en tejidos normales y de tumores en proliferación, como es el caso de cáncer colorectal (Fleischmann *et al.*, 1999), donde se produce una relación inversa entre expresión de la dUTPasa nuclear y la respuesta a la quimioterapia basada en el 5-fluorouracilo (5-FU), indicando que los mayores niveles de dUTPasa en el núcleo puede desempeñar un papel de protección, desencadenando una resistencia al fármaco (Ladner *et al.*, 2000). Recientemente, se ha propuesto la isoforma DUT-N, como un marcador para la evaluación de tumores intracraneales (Romeike *et al.*, 2005), además de cómo un biomarcador de exposición a carcinógenos específicos medioambientales que podrían estar asociados con un mayor riesgo de progresión maligna (Wu *et al.*, 2006).

También, se ha descrito que la dUTPasa podría estar implicada en la muerte celular por apoptosis. Se ha observado que en células apoptóticas hay una drástica disminución de la expresión de la enzima (Brockstedt *et al.*, 1998). Además se ha comprobado que los inhibidores de la síntesis de timidina que producen una incorporación masiva de uracilo al DNA, provocan la fragmentación de DNA en escalera, que es característica de células apoptóticas (Huschtscha *et al.*, 1996; Elliott *et al.*, 1998). La sobreexpresión de la dUTPasa protege de los efectos tóxicos de estos inhibidores (Parsels *et al.*, 1998).

En *Drosophila melanogaster* existen también dos isoformas de dUTPasa, una mitocondrial y otra nuclear y, al igual que en células humanas, parece que sólo la nuclear está regulada a lo largo del ciclo celular (Bekesi *et al.*, 2004). Durante el proceso

de desarrollo se ha descrito una regulación coordinada en la expresión del gen *dut* y el gen *ung* (gen que codifica para la uracil-DNA glicosilasa) en determinados estadios larvarios. La falta de dUTPasa en larvas se sugirió como un requerimiento para generar DNA rico en uracilo lo que induciría el proceso de muerte celular por falta de timina, contribuyendo a la apoptosis requerida durante la metamorfosis (Deutsch, 1995). Debido a la ausencia de dUTPasa en larvas se prevé una sustitución estable de timina por uracilo, puesto que el genoma de *Drosophila* codifica sólo una uracil DNA glicosilasa específica de apareamiento erróneo (U:G) (Hardeland *et al.*, 2003) y no existe la uracil DNA glicosilasa homóloga de la uracil DNA glicosilasa. No obstante, parece que el tercer estado larvario está asociado con la expresión de una uracil DNA endonucleasa efectiva (Deutsch y Spiering, 1982) que puede inducir degradación de DNA específica de estadio.

La dUTPasas pueden sufrir regulación por fenómenos de fosforilación y defosforilación aunque las consecuencias de la modificación covalente varían en los distintos organismos. En el caso del virus Epstein-Barr (EBV), la dUTPasa es fosforilada cuando existe una activa replicación del virus en la célula hospedadora, y la fosforilación está directamente relacionada con la actividad de la enzima (Sommer *et al.*, 1996). En células humanas se ha descrito la presencia de una secuencia consenso de fosforilación ((pS/pT)PX(R/K)) para el reconocimiento de una proteína quinasa dependiente de ciclina (p34^{cdc2}) en ambas isoformas de la enzima, nuclear y mitocondrial, sin embargo únicamente la isoforma DUT-N es fosforilada en un residuo de serina perteneciente a dicha secuencia. Sin embargo, el papel de esta fosforilación se desconoce. Mediante mutagénesis dirigida se sustituyó el residuo de serina por alanina impidiéndose de esta manera la fosforilación, pero las propiedades cinéticas de la enzima no se modificaron, descartando una función reguladora directa de la actividad enzimática por este proceso. Tampoco tuvo lugar una alteración en el proceso de dimerización de las subunidades (Ladner *et al.*, 1996). Estudios recientes han revelado que la defosforilación del residuo de serina tampoco interviene en la localización intracelular (Tinkelenberg *et al.*, 2003).

El virus del Herpes simple inhibe la fosforilación de la dUTPasa de la célula hospedadora (Lirette y Caradonna, 1990). Este virus, tras la infección, inhibe enzimas homólogas del hospedador y activa las suyas, lo cual sugiere que la defosforilación de la dUTPasa interviene de forma indirecta en la actividad de la enzima, condicionando la localización subcelular o la interacción con proteínas moduladoras de la actividad.

Otro mecanismo de regulación de dUTPasa ha sido observado en *Trichinella Spiralis*, que es el agente causante de la triquinosis. Este nematodo, presenta unos elevados niveles de expresión de timidilato sintasa (TS) y dUTPasa en el estado de larva dentro del músculo infectado. La regulación de la expresión de estas enzimas no está asociada a la proliferación del parásito si no a que intervienen inhibiendo el ciclo celular de la célula infectada (Rode *et al.*, 2000).

En *Plasmodium falciparum*, un análisis de los genes transcritos activamente en la forma de trofozoíto del parásito, ha revelado la sobreexpresión de la dUTPasa en este estadio (Spielmann y Beck, 2000). El trofozoíto, al dividirse asexualmente para originar numerosos merozoítos, necesita gran cantidad de dNTPs para la síntesis del DNA. Este resultado ha sido corroborado mediante estudios de inmunofluorescencia, donde se demuestra que la dUTPasa no se expresa en la fase de anillo, pero que a medida que el parásito progresa a estadios asexuales proliferativos intraeritrocíticos, trofozoítos y esquizontes, empieza a tener lugar la expresión de la enzima, lo que indica que la dUTPasa se encuentra asociada con las formas del parásito que tienen una replicación del DNA activa (Whittingham *et al.*, 2005).

En la secuencia de DNA de *C. albicans*, se ha identificado un sitio de restricción *MluI* flanqueante al gen *dut*, el cual se encuentra asociado a la regulación de la transcripción de genes de fisión en levaduras. Además se ha descrito que la delección del sitio *MluI* produce una reducción de la transcripción del gen *dut* por lo que desempeña un papel crítico en la regulación de la expresión (McIntosh *et al.*, 1994).

Finalmente se ha descrito una regulación de la dUTPasa del fago PBS2 de *Bacillus subtilis* que junto con su homólogo PBS1, son los únicos organismos conocidos que contienen uracilo en lugar de timina en su DNA. Para la incorporación y el mantenimiento del nucleótido de uracilo deben inhibir las enzimas dUTPasa y uracil-DNA glicosilasa del hospedador. Para ello el fago dispone de genes que codifican proteínas inhibitoras de ambas actividades (Price y Frato, 1975; Cone *et al.*, 1980).

A.IV.4. Localización intracelular de las dUTPasas

La localización celular de la dUTPasa ha sido estudiada principalmente en células humanas. Como se ha dicho anteriormente, existen dos isoformas de dUTPasa, diferenciándose exclusivamente en la región amino-terminal, pero que presentan las

mismas propiedades de especificidad y capacidad de unión a su sustrato (dUTP). La diferencia principal entre estas dos isoformas es su diferente localización, característica por la cual son denominadas. La isoforma de menor peso molecular y unas treinta veces más abundante se encuentra asociada al núcleo, mientras que la de mayor peso molecular se asocia a la mitocondria (Ladner *et al.*, 1996).

Mediante marcaje con fluorescencia *in situ* de cromosomas de linfocitos humanos, se identificó una sola marca correspondiente al gen codificante de la dUTPasa localizada en el cromosoma 15 (Cohen *et al.*, 1997). Estos datos sugerían que sólo existía un gen que codifica la dUTPasa en el genoma humano, a partir del cual se obtienen distintas especies de mRNA que se procesan a partir de un transcrito primario común, dando lugar a isoformas de localización intracelular diferente (McIntosh *et al.*, 1992).

En el caso de los herpes virus, dado que todos se replican en el núcleo de la célula huésped, así por ejemplo en el HSV-1 y PrV (Jons y Mettenleiter, 1996), la actividad dUTPasa se concentra en el núcleo. Sin embargo, es posible encontrar también actividad dUTPasa en el citoplasma de las células, como ocurre en los virus BHV (Liang *et al.*, 1993) o HSV-2 (Wohlrab *et al.*, 1982).

En el caso del bacteriófago T4, durante su ciclo infectivo establece en la célula huésped un complejo constituido por proteínas que interviene en la síntesis de dNTPs denominado complejo T4 desoxirribonucleósido trifosfato (dNTP) sintasa. Este complejo está compuesto por al menos ocho proteínas codificadas por el bacteriófago y dos de la célula huésped (Wheeler *et al.*, 1996), y se localiza junto a la maquinaria de replicación en el núcleo, aunque todavía no se ha establecido si existe una asociación entre ambas maquinarias. A partir de estos datos se ha postulado que este complejo tiene como función proveer de nucleótidos durante la replicación del DNA (Kim *et al.*, 2005).

En el parásito protozoo *Plasmodium falciparum* la dUTPasa no se encuentra asociada al núcleo ni al apicoplasto, sino que se localiza en la vacuola parasitófora. En los últimos años, se ha puesto de manifiesto un número de procesos biológicamente relevantes en la vacuola que son importantes para la supervivencia del parásito. Podría ser que la dUTPasa fuera secretada por el parásito para hidrolizar el dUTP del huésped/parásito a dUMP necesario para la biosíntesis de timidilato (Whittingham *et al.*, 2005).

A.V. LA dUTPasa ES UNA ENZIMA ESENCIAL PARA LA VIABILIDAD CELULAR

La esencialidad de la dUTPasa se puso de manifiesto por primera vez en *E. coli*, donde la imposibilidad de eliminar el gen del genoma bacteriano mostró el carácter esencial de esta enzima para la viabilidad (el-Hajj *et al.*, 1988).

Estudios previos habían conseguido crear mutantes con una actividad dUTPasa notablemente disminuida. A los primeros mutantes se les denominaron *sof*, debido a que acumulaban fragmentos cortos de DNA (“*Short Okazaki Fragment*”) como consecuencia de la incorporación de uracilo al DNA y su consecuente exclusión por la actuación del mecanismo de escisión y reparación (Tye *et al.*, 1977; Tye *et al.*, 1978). La introducción en estos mutantes de mutaciones en genes como *ung* (uracil DNA glicosilasa) o *dcd* (dCTP desaminasa), prácticamente elimina la aparición de estos fragmentos cortos de DNA, mientras que la introducción de mutaciones en genes como *lig* o *polA* mantiene el fenotipo, parándose la síntesis de DNA y finalmente desencadenando la muerte celular (Tye *et al.*, 1978). Este hecho se explica por una menor presencia de uracilo en el DNA, poniendo de manifiesto la toxicidad de este nucleótido para la célula (Wang y Weiss, 1992). Mutantes *dut* en los que adicionalmente se eliminó el gen que codifica la uracil DNA glicosilasa pueden tolerar hasta una sustitución del 90 % de uracilo por timina en el DNA. Sin embargo, estas células mueren ante la imposibilidad de dividirse tras la replicación y de crecer de tamaño, debido a una deficiencia en la síntesis de macromoléculas por parte de la célula (el-Hajj *et al.*, 1992). De hecho se ha descrito que la unión proteína-DNA por parte de los factores de transcripción disminuye tras la sustitución de timina por uracilo (Goeddel *et al.*, 1978).

En *Saccharomyces cerevisiae* la eliminación del gen de la dUTPasa muestra la esencialidad de la enzima (Gadsden *et al.*, 1993). Sin embargo, mutantes nulos *dut1* son viables en condiciones de un aporte exógeno de dTMP, produciéndose un fenómeno de auxotrofia para timidina. En levaduras, la dUTPasa no es un paso obligado para la síntesis de dTMP, por lo que la célula podría seguir sintetizando nucleótidos de timina, pero el aumento de la relación dUTP/dTTP produce una mayor incorporación de uracilo en el DNA que finalmente produce la muerte celular. En el caso de que exista timidina en el medio, la célula la utiliza para incrementar los niveles intracelulares de este nucleósido, disminuyendo por tanto la relación dUTP/dTTP, y permitiendo el crecimiento normal. Estudios recientes han demostrado que la dUTPasa desempeña un

papel crítico en el mantenimiento de la estabilidad genética en este organismo. Mutantes *dut1-1* con una baja actividad dUTPasa presentan un mayor tiempo de división, un ciclo celular anormal y una alta tasa de mutación espontánea inferida por una acumulación de sitios abásicos como consecuencia de la excisión del uracilo incorporado al DNA (Guillet *et al.*, 2006).

Son varios los estudios que demuestran que la dUTPasa es esencial para la viabilidad de distintos virus. La necesidad de una activa replicación de DNA en estos organismos durante su ciclo de vida, hace que se precise de unos niveles elevados de nucleótidos, haciendo imprescindible para su viabilidad el correcto funcionamiento de las enzimas implicadas en la síntesis de estos compuestos. Una delección en el gen que codifica la dUTPasa en HSV-1, supone una disminución de su virulencia y una incapacidad para infectar células no proliferativas debido a la insuficiente actividad dUTPasa de la célula hospedadora (Pyles *et al.*, 1992). Resultados similares se obtuvieron en los casos del virus de la anemia infecciosa felina (FIV) (Lerner *et al.*, 1995), del virus de la anemia infecciosa equina (EIAV) (Lichtenstein *et al.*, 1995) y el virus de la artritis encefalitis caprina (CAEV) (Turelli *et al.*, 1997). La razón por la que los virus presentan una dUTPasa cuando las células que infectan también tienen esta actividad no está totalmente claro, pero se ha sugerido que la dUTPasa es esencial para la replicación del virus en células no proliferativas (Chen *et al.*, 2002). En citomegalovirus la producción de partículas virales disminuye tras la delección del gen de la dUTPasa (Dunn *et al.*, 2003). Estudios recientes han demostrado que la dUTPasa es esencial para la replicación de los γ -herpesvirus-68 murinos (MHV-68 o γ HV-68) en células de pulmón en presencia de otros virus (Song *et al.*, 2005). En el caso del virus de la pseudorrabia (PrV), se ha puesto de manifiesto que la delección del gen *dut* produce cepas avirulentas que son susceptibles de ser utilizadas como vacuna en ganaderías porcinas (Jons *et al.*, 1997).

En el caso del bacteriófago T5 de *E. coli*, la combinación de mutaciones en los genes que codifican la dUTPasa y la timidilato sintasa genera fagos incapaces de lisar células de *E. coli* a menos que presenten una delección en el gen que codifica la uracil DNA glicosilasa (Swart y Warner, 1985).

Varios estudios de silenciamiento del gen de la dUTPasa en células humanas mediante la técnica del RNA de interferencia han puesto de manifiesto la esencialidad de la proteína para la proliferación celular. En primer lugar se describió que la reducción de los niveles de dUTPasa en las líneas celulares de cáncer colorectal (SW620) y de

adenocarcinoma de mama (MCF-7) en combinación con inhibidores de la enzima timidilato sintasa (TS) produce un incremento en la fragmentación de DNA y una sensibilidad de las células a la quimioterapia por este fármaco (Koehler y Ladner, 2004). Por otra parte, la disminución en actividad dUTPasa líneas celulares de SW620, HeLa y HT29 (adenocarcinoma de colon de grado II) produce una inhibición de la proliferación celular (Studebaker *et al.*, 2005) y un aumento de la dUTPasa está asociada a la resistencia a antifolatos en terapia antitumoral.

En el parásito protozoo *Plasmodium falciparum*, se ha demostrado que derivados de nucleósidos de uracilo selectivos que inhiben la dUTPasa presentan actividad antiparasitaria mientras que presentan una baja actividad frente a la enzima humana (Nguyen *et al.*, 2005; Whittingham *et al.*, 2005).

A.VI. LA dUTPasa DIMÉRICA, UNA DIANA TERAPEÚTICA FRENTE A ENFERMEDADES PROTOZOARIAS

La ruta de síntesis “*de novo*” de nucleótidos pirimidínicos constituye un proceso biológico muy atractivo para el diseño de nuevos fármacos por varias razones: los parásitos protozoos obtienen los nucleótidos pirimidínicos principalmente por la vía de la biosíntesis *de novo*, e inhibidores de enzimas de esta ruta metabólica ya han sido utilizadas satisfactoriamente en diversas patologías.

La timidilato sintasa y la dihidrofolato reductasa son dianas terapéuticas de una elevada trascendencia. Algunos compuestos como la fluorodesoxiuridina y los antifolatos, inhiben directamente estas enzimas generando una alteración en la relación dUTP/dTTP. Un desequilibrio en esta relación produce un efecto citotóxico y desencadena una fragmentación del DNA y la muerte celular (Canman *et al.*, 1994). Una inhibición de la dUTPasa provoca el mismo efecto, por lo que se ha considerado a esta enzima como un atractivo y potencial blanco de acción de fármacos para combatir diversas patologías (Kremmer *et al.*, 1997; McIntosh y Haynes, 1997; Hidalgo-Zarco y Gonzalez-Pacanowska, 2001; Nguyen *et al.*, 2005). Son muchas las evidencias que apoyan esta hipótesis: el carácter esencial de la enzima en todos los organismos estudiados hasta la fecha, la resistencia que supone una sobreexpresión de la dUTPasa a antifolatos o fluorodesoxiuridina (Parsels *et al.*, 1998; Hidalgo-Zarco y Gonzalez-

Pacanowska, 2001), la sensibilización de líneas celulares tumorales a la inhibición de la timidilato sintasa tras la disminución de la actividad dUTPasa (Koehler y Ladner, 2004).

Todas estas evidencias, unido a las diferencias significativas que presentan las dUTPasas de *T. brucei* y la humana a nivel de secuencia, estructura, y propiedades catalíticas, convierten a la dUTPasa en una interesante diana para la acción de fármacos contra la tripanosomiasis africana.

MATERIAL Y MÉTODOS

B. MATERIAL Y MÉTODOS

B.I. MATERIAL

B.I.1. LÍNEAS CELULARES

B.I.1.1. Parásitos

Los parásitos protozoos utilizados pertenecen a la subespecie de *T. brucei* que causa la tripanosomiasis africana en animales, *T. brucei brucei*. Para los experimentos de cultivos *in vitro* se han utilizado: tripomastigotes sanguíneos de la forma alargada (forma sanguínea) y tripomastigotes procíclicos (forma procíclica). Las diferentes líneas celulares utilizadas han sido:

***T. brucei brucei* 427:** línea celular salvaje de tripomastigotes tanto sanguíneos como procíclicos.

***T. brucei brucei* 449:** línea celular de tripomastigotes procíclicos que contiene un represor inducible de tetraciclina (TetR) unido a operadores inmediatamente después del sitio de inicio de transcripción del promotor de la PARP ($P_{PARP-Ti}$) (Biebinger *et al.*, 1997). Se utilizó para el estudio del efecto del RNAi generado a partir de la estrategia de estructura tallo-lazo. El cultivo de esta línea celular requiere la adición de fleomicina a $0.5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$.

***T. brucei brucei* 29-13:** línea celular de tripomastigotes procíclicos que lleva integrados genes para la T7 RNA polimerasa y para el represor inducible de tetraciclina (TetR) (Wirtz *et al.*, 1999). Se utilizó para el estudio del efecto del RNAi generado a partir de la estrategia de promotores T7 enfrentados. El cultivo de esta línea celular requiere la adición de G-418 a $15.0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ e higromicina a $50.0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$.

***T. brucei brucei* S16:** línea celular de tripomastigotes sanguíneos que lleva integrados genes para la T7 RNA polimerasa y para el represor inducible de tetraciclina (TetR) (Wirtz *et al.*, 1999). El cultivo de esta línea celular requiere la adición de G-418 a $2.5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$.

B.I.1.2. Bacterias

Fueron empleadas las siguientes cepas de *Escherichia coli*:

XL1-Blue (Bullock *et al.*, 1987)

Rec A1, end A1, gyr A96, thi-1, hdsR17, supE44, relA1, lac [F'*proAB lacI^q ZΔM15 Tn10* (Tet^r)]

BL21(DE3) (Phillips *et al.*, 1984)

F dcm, ompT, hsdS (r_B⁻ m_B⁻)gal λ (DE3)

B.I.2. MEDIOS DE CULTIVO**B.I.2.1. Para parásitos****SDM-79**

Este es el medio general utilizado para cultivar *in vitro* formas tripomastigotes procíclicas de *T. brucei brucei*. El SDM-79 fue preparado a partir MEM (Earl's) y M199 en una proporción de 7.0 g·L⁻¹ y 2.0 g·L⁻¹ (Gibco), tamponado con 30 mM de HEPES y con 23.9 mM de MOPS a pH 7.3 (Sigma), y enriquecido con una solución de 50X de aminoácidos esenciales y 100X de aminoácidos no esenciales para MEM (Gibco). Además el medio está compuesto por los siguientes productos, los cuales fueron comprados a Sigma:

Glucosa	5.5 mM
Bicarbonato sódico	23.8 mM
Piruvato sódico	1.0 mM
DL-alanina	2.2 mM
L-arginina	0.5 mM
L-glutamina	2.0 mM
DL-metionina	0.5 mM
L-fenilalanina	0.5 mM
L-prolina	5.2 mM

DL-serina	0.6 mM
Taurina	1.3 mM
DL-treonina	3.0 mM
L-tirosina	0.5 mM
Guanosina	0.04 mM
Ácido fólico	0.01 mM
D(+) hidrocloreuro de glucosamina	0.2 mM
Ácido p-aminobenzoico	0.01 mM
Biotina	0.001 mM

Una vez disuelto todos los componentes, el medio es esterilizado por filtración a través de membranas de 0.22 μm (Sistema de filtración *VacuCap*[®] de Pall corporation) y almacenado a 4°C. Para su utilización se le añade 0.01 mM de hemina, y enriquecerlo con un 10 % de suero bovino fetal (SBF) (Gibco) previamente inactivado a 56°C durante 30 min.

MEM -Pros

Este medio es una alternativa para el cultivo *in vitro* de formas tripomastigotes procíclicas de *T. brucei brucei*. Es utilizado con la línea celular que genera el silenciamiento génico mediante RNAi de la dUTPasa debido a que es un medio libre de compuestos que puedan ser una fuente de nucleótidos de timina. El MEM pros médium es tamponado con 27.4 mM de Hepes a pH 7.4 (Sigma) y enriquecido con una solución de 100X de aminoácidos no esenciales para MEM (Gibco) y una solución 100X de vitaminas para MEM (Sigma). Además el medio está compuesto por los siguientes productos, los cuales fueron comprados a Sigma:

Cloruro cálcico	2.0 mM
Cloruro potásico	5.4 mM
Sulfato magnésico	0.8 mM
Cloruro sódico	0.1 M
Fosfato dihidrógeno sódico	1.0 mM

Monohidrocloreuro de L-arginina	0.2 mM
L-cistina	0.1 mM
Monohidrocloreuro de L-histidina	0.2 mM
L-isoleucina	0.4 mM
L-leucina	0.4 mM
L-lisina	0.5 mM
L-metionina	0.1 mM
L-fenilalanina	0.6 mM
L-treonina	0.4 mM
L-triptofano	0.05 mM
L-tirosina	0.55 mM
L-valina	0.4 mM
L-prolina	5.2 mM
Adenosina	0.05 mM
Monohidrocloreuro de ornitina	0.06 mM
Rojo fenol	0.03 mM

Una vez disuelto todos los componentes, el medio es esterilizado por filtración a través de membranas de 0.22 μm (Sistema de filtración *VacuCap*[®] de Pall corporation) y almacenado a 4°C. Para su utilización se le añade 0.01 mM de hemina, y enriquecerlo con un 10 % de suero bovino fetal (SBF) (Gibco) previamente inactivado a 56°C durante 30 min.

HMI-9

Este medio se utiliza para el cultivo *in vitro* de las formas tripomastigotes sanguíneas de *T. brucei brucei*. Es preparado a partir de Iscoves Modified Dulbeccos Media (IMDM) (Gibco), suplementado con los siguientes productos (Sigma):

Hipoxantina	1.0 mM
Piruvato sódico	1 mM
L-cisteína	1.5 mM
Timidina	0.16 mM
Ácido disulfónico de batocuproína	0.05 mM
Bicarbonato sódico	36.0 mM
β -mercaptoetanol	0.2 mM

Una vez disuelto todos los componentes se ajusta el pH a 7.5, a continuación el medio es esterilizado por filtración a través de membranas de 0.22 μm (Sistema de filtración *VacuCap*[®] de Pall corporation) y almacenado a 4°C. Para su utilización se enriquece con un 10 % de suero bovino fetal (SBF) (Gibco) previamente inactivado a 56°C durante 30 min.

Para el caso concreto de la línea celular que genera el silenciamiento génico mediante RNAi de la dUTPasa, se utiliza un medio modificado de HMI-9 sin timidina, para evitar la presencia de un precursor de la síntesis de nucleótidos de timina.

B.I.2.1.1. Compuestos adicionados a los medios de cultivo

➤ **Antibióticos**

Geneticina (G-418) (Gibco)

La geneticina es un antibiótico aminoglucósido relacionado con la gentamicina, que inhibe la síntesis de proteínas.

Se utilizó como marcador para mantener los genes de la T7 RNA polimerasa y del TetR en la línea celular *T. brucei brucei* S16 (2.5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) y el gen de la T7 RNA polimerasa en *T. brucei brucei* 29-13 (15 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$).

Fleomicina (Sigma)

La fleomicina es un antibiótico glucopeptídico aislado de *Streptomyces verticillos*, que bloquea la entrada a la fase S del ciclo celular por una unión al DNA.

Es utilizado para mantener el gen TetR en la línea celular *T. brucei brucei* 449 ($0.5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$). También es utilizado como marcador de selección de parásitos transfectados con el vector p2T7 (LaCount *et al.*, 2000) para generar RNAi mediante la estrategia de dos promotores T7 enfrentados, tanto en *T. brucei brucei* S16 ($5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) como en *T. brucei brucei* 29-13 ($5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$).

Higromicina B (Sigma)

La higromicina es un antibiótico glucopeptídico aislado de *Streptomyces hygroscopicus*, que inhibe la síntesis de proteínas por la inducción de una lectura incorrecta de los RNA mensajeros.

Es utilizado para mantener el gen TetR en la línea celular *T. brucei brucei* 29-13 ($50 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), además de como marcador de selección de parásitos transfectados con el vector pGR19 (Clayton *et al.*, 2005) para generar RNAi mediante la estrategia tallo-lazo o “stuffer” en *T. brucei brucei* 449 ($50 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) y *T. brucei brucei* S16 ($5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$).

Blasticidina (Invitrogen)

La blasticidina es un antibiótico nucleósido-peptídico aislado de *Streptomyces griseochromogenes*, que inhibe la síntesis de proteínas, tanto en organismos procariontas como eucariotas, mediante la inhibición de la unión del péptido a la maquinaria ribosomal.

Es utilizado como segundo marcador de selección de parásitos transfectados con el vector pGR19 (Clayton *et al.*, 2005) para generar un doble RNAi junto con higromicina como primer marcador de selección en *T. brucei brucei* 449 ($10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) y en *T. brucei brucei* S16 ($5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$).

Doxiciclina (Sigma)

La doxiciclina es un derivado de la tetraciclina que inhibe la síntesis de proteínas por su unión irreversible a la subunidad 30S y posiblemente a la 50S del ribosoma, bloqueando la unión del aminoacil tRNA al mRNA.

Es utilizado para inducir la transcripción de todos los plásmidos que contenga el represor de tetraciclina. En nuestro caso se ha utilizado para inducir el RNAi y la expresión de la proteína fusionada a una secuencia que permite llevar a cabo la purificación de complejos mediante una doble cromatografía de afinidad. En todas las líneas celulares que generan RNAi, la doxiciclina ha sido utilizada a $1 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$.

➤ **Otros compuestos**

Metotrexato

El metotrexato es un inhibidor de la enzima dihidrofolato reductasa, el cual inhibe la síntesis *de novo* de pirimidinas. Ha sido utilizado en cultivos *in vitro* de *T. brucei* para determinar el efecto que causa en estos parásitos en combinación con un silenciamiento génico de la enzima dUTPasa. Se preparó una solución madre a 5 mM de metotrexato en PBS con NaOH a 4×10^{-4} N y se esterilizó por filtración con *Acrodisc* de 0.22 μ m antes de ser adicionado al medio de cultivo.

Timidina

La timidina es un desoxirribonucleósido pirimidínico formado por la base de timina, el cual es un precursor de la síntesis de timidilato en la biosíntesis *de novo* de pirimidinas. Ha sido utilizado en cultivos *in vitro* de *T. brucei* para determinar el efecto que causa en estos parásitos en combinación con un silenciamiento génico de la enzima dUTPasa. Se preparó una solución madre a 200 mM de timidina en H₂O y se esterilizó por filtración con *Acrodisc* de 0.22 μ m antes de ser adicionado al medio de cultivo.

Timina

La timina es un derivado cíclico de la pirimidina, la cual es una de las cuatro bases nitrogenadas que forman parte del DNA. base de timina, el cual es un precursor de la síntesis de timidilato en la biosíntesis *de novo* de pirimidinas. Ha sido utilizado en cultivos *in vitro* de *T. brucei* para determinar el efecto que causa en estos parásitos en combinación con un silenciamiento génico de la enzima dUTPasa. Se preparó una solución madre a 50 mM de timina en H₂O y se esterilizó por filtración con *Acrodisc* de 0.22 μ m antes de ser adicionado al medio de cultivo.

B.I.3. TAMPONES Y SOLUCIONES**Tabla B.I**

TAMPÓN/SOLUCIÓN	COMPOSICIÓN
TBE 1X (Sambrook <i>et al.</i> , 1989)	Tris-borato 0.089 M, ácido bórico 0.089 M, EDTA 0.002 M (pH 8.0)
TAE 1X (Sambrook <i>et al.</i> , 1989))	Tris-Acetato 0.04 M, EDTA 1 mM (pH 8.0)
PBS 1X (tampón fosfato salino) (Sambrook <i>et al.</i> , 1989)	NaCl 0.14 M, KCl 2.6 mM, NaH ₂ PO ₄ 10 mM, KH ₂ PO ₄ 1.5 mM (pH 7.2).
MOPS 10X. Solución para el desarrollo de electroforesis de RNA (Sambrook <i>et al.</i> , 1989)	MOPS 0.2 M, pH 7.0, acetato sódico anhidro 0.08 M, EDTA 0.01 M. Esterilizado por filtración.
SSC 20X (Sambrook <i>et al.</i> , 1989)	NaCl 3 M, citrato sódico 0.3 M (pH 7.0).
Tampón HAP A para purificación de la enzima dUTPasa	Tampón fosfato potásico 20 mM pH 7.0, MgCl ₂ 5 mM, PMSF 1 mM.
Tampón HAP B para purificación de la enzima dUTPasa	Tampón fosfato potásico 200 mM pH 7.0, MgCl ₂ 5 mM, PMSF 1 mM.
Tampón MonoQ A para purificación de la enzima dUTPasa	Tris-HCl 20 mM pH 7.6, MgCl ₂ 5 mM, PMSF 1 mM.
Tampón MonoQ B para purificación de la enzima dUTPasa	Tris-HCl 20 mM pH 7.8, MgCl ₂ 5 mM, PMSF 1 mM, NaCl 500 mM.
Solución de medida de actividad dUTPasa	Rojo cresol 50 µM, bicina 1.750 mM, pH 7.5-8.5, MgCl ₂ 50 mM, albumina de suero bovino (BSA) 1 mg·mL ⁻¹ .

Fijador de Karnovsky	Glutaraldehído 0.5 %, Formaldehído 4 % en tampón Cacodilato 0.1 M, pH 7.4.
Tampón de transfección de las formas sanguíneas de <i>T. brucei</i> (van den Hoff <i>et al.</i> , 1992)	EGTA 2 mM, KCl 120 mM, CaCl ₂ 0.15 mM, K ₂ HPO ₄ / KH ₂ PO ₄ 10 mM pH 7.6, HEPES 25 mM, MgCl ₂ · 6H ₂ O 5 mM, glucosa 0.5 %, albumina de suero bovino (BSA) 100 µg·mL ⁻¹ , hipoxantina 1.0 mM
Tampón de transfección de las formas procíclicas de <i>T. brucei</i> (ZPFM) (Bellofatto y Cross, 1989)	NaCl 132 mM, KCl 8 mM, Na ₂ HPO ₄ 8 mM, KH ₂ PO ₄ 1.5 mM, Mg(CH ₃ COO) ₂ 1.5 mM, Ca(CH ₃ COO) ₂ 90 µM, ajustar pH 7.0 con CH ₃ COOH

B.I.4. MATERIAL PARA BIOLOGÍA MOLECULAR

B.I.4.1. Vectores

pET-11c (Novagen). Vector de expresión de 5675 pb utilizado para clonar el gen *TbdUT*, permitiendo la sobreexpresión en *E. coli* de la proteína TbdUTPasa.

pGEM-T (Promega). Vector de 3000 pb, que proviene de la digestión del vector pGEM[®]-5Zf(+) con la endonucleasa de restricción *EcoRV* y posterior adición de residuos de desoxitimidina (T) a los extremos 3' en el sitio de inserción. Se utiliza como vector de amplificación para clonar fragmentos de DNA obtenidos por PCR.

p2T7 (LaCount *et al.*, 2000). Vector de 6078 pb utilizado para el silenciamiento génico de un gen mediante la técnica de RNA de interferencia. El RNA de doble cadena se genera por la transcripción de ambas cadenas de DNA del fragmento del gen que se quiere silenciar, mediante la disposición de dos promotores T7 enfrentados. El marcador de selección que presenta es el del gen de resistencia a bleomicina (BLE).

pGR19 (Clayton *et al.*, 2005). Vector de 6788 pb utilizado para el silenciamiento génico de un gen mediante la técnica de RNA de interferencia. El RNA de doble cadena

se genera por la transcripción por el promotor *parp* de un fragmento del gen que se quiere silenciar clonado dos veces en sentido opuesto y separado por una secuencia de 753 bp, denominada “stuffer”. Este fragmento es necesario para la propagación de los plásmidos en bacterias debido a la inestabilidad que presentan grandes repeticiones invertidas cuando se encuentran adyacentes. De esta manera la estructura resultante de la formación del RNA de doble cadena adoptaría una estructura de tallo-lazo. El marcador de selección que presenta es el del gen de resistencia a higromicina (HYG).

pHD1337 (Estevez *et al.*, 2003). Plásmido de 6850 pb que lleva integrado el gen TbRRP45 ORF cuya transcripción por el promotor *parp* está controlada por el represor de tetraciclina (TetR). Este plásmido ha sido utilizado para clonación del gen *DUT* de *T. brucei* y la expresión de la enzima dUTPasa fusionada en el extremo carboxilo a un péptido de unión de calmodulina y dos unidades de unión IgG de la proteína A de *Staphylococcus aureus* separados entre sí por una secuencia de corte de la proteasa TEV. El marcador de selección que presenta es el del gen de resistencia a blasticidina (BSD).

pGR37. Vector de 5695 pb utilizado para la expresión de la enzima dUTPasa fusionada en el extremo amino a un péptido de unión de calmodulina y dos unidades de unión IgG de la proteína A de *Staphylococcus aureus* separados entre sí por una secuencia de corte de la proteasa TEV. La transcripción del gen, al igual que en el plásmido pHD1337, está controlada por el represor de tetraciclina (TetR) y se lleva a cabo por el promotor *parp*. El marcador de selección que presenta es el del gen de resistencia a blasticidina (BSD).

B.I.4.2. Oligonucleótidos

Todos los oligonucleótidos utilizados han sido sintetizados en los Servicios Técnicos del Instituto de Parasitología y Biomedicina “López-Neyra”.

En la Tabla B.II se señala el nombre de cada oligonucleótido, su secuencia en orientación 5'→3' y su utilidad.

Tabla B.II

Nombre	Secuencia (5' → 3')	Sitios de restricción	Utilidad
<i>TbDUT</i> start	GCCATATGAAGAACGCC CGCAGA	<i>Nde</i> I	Clonación del gen <i>TbDUT</i> en pET11-c
<i>TbDUT</i> stop	GCGGATCCTTACGACTTT AGCCAGTGCCCAATGTT	<i>Bam</i> H I	Clonación del gen <i>TbDUT</i> en pET11-c, p2T7 y pGR37
T7	AATACGACTCACTATAG		Secuenciación
SP6	ATTTAGGTGACACTATA		Secuenciación
T7 terminator	GCTAGTTATTGCTCAGC		Secuenciación
dUTPasa Tb <i>Xho</i> I- <i>Hind</i> III	GCCTCGAGAAGCTTATG AAGAACGCCCGC	<i>Xho</i> I / <i>Hind</i> III	Clonación del gen <i>TbDUT</i> en p2T7 y pHD1337
HpaI-TAP V	GCACGTTAACCGACTTTA GCCAGTGCCCA	<i>Hpa</i> I	Clonación del gen <i>TbDUT</i> en pHD1337
VCA 3	AACCATATGAAGAACGC CCGCAGAGTG	<i>Nde</i> I	Clonación del gen <i>TbDUT</i> en pGR37
VCA 4	GCGGATCCAAGCTTCAG GACGGCCTCAAC	<i>Bam</i> H I / <i>Hind</i> III	Clonación del fragmento RNAi del gen <i>TbDUT</i> en pGR19
VCA 5	AACGGGCCCTTCATC TGACGGATACCG	<i>Apa</i> I	Clonación del fragmento RNAi del gen <i>TbDUT</i> en pGR19
VCA 6	GCGGATCCAAGCTTATC CGTGGAAGTGGTGGAAAG	<i>Bam</i> H I / <i>Hind</i> III	Clonación del fragmento RNAi del gen <i>TbDUT</i> en pGR19
VCA 7	AACGGGCCCGCAGCTGC GATAACGGC	<i>Apa</i> I	Clonación del fragmento RNAi del gen <i>TbDUT</i> en pGR19
VCA 8	GCACTAGCCGTGTCAACT CAC		Secuenciación
VCA 11	GCGGATCCAAGCTTCTT CGCGGAAGCGG	<i>Bam</i> H I / <i>Hind</i> III	Clonación del fragmento RNAi del gen <i>TbUNG</i> en pGR19

VCA 12	AACGGGCCCAATGTTGT AAGTACCCGTGC	<i>Apa</i> I	Clonación del fragmento RNAi del gen <i>TbUNG</i> en pGR19
VCA 13	CAGGGGGTGTGATGCTT AATGCG		Preparación de sonda de DNA de <i>TbUNG</i>
VCA 14	GCCATATGGTGCAACGG ACACTGTTTGAC	<i>Nde</i> I	Amplificación del gen <i>TbUNG</i>
VCA 15	GCGGATCCCTACTTTCCC TTACTGAGG	<i>Bam</i> H I	Amplificación del gen <i>TbUNG</i>
VCA 16	CGATATTGGTTTCAACCT CGTTGC		Preparación de sonda de DNA de <i>TbDUT</i>

B.I.5. SOFTWARE

Los ordenadores utilizados para llevar a cabo los experimentos y el análisis de los resultados obtenidos incluyen: *PC Pentium IV-III-II*, *Macintosh LC475*, *Macintosh Performa 630*, *Power Macintosh G3*, *Macintosh IMAC G3*.

➤ Programas informáticos utilizados:

- *Adobe Photoshop™* versión 7.0.
- *Agfa Foto Look* versión 3.5.
- *BD CellQuest™ Pro* version 4.0.2.
- *Cary WinUV Software*.
- *I-D Manager* versión 1.3, *Tecnología para Diagnóstico e Investigación S.A.*
- *DNA Strider®* versión 1.1 *Service de Biochimie-Departament de Biologie. Inst. de Recherche Fondamentale. Commissariat s l'Energie Atomique. France.*
- *Gene Construction Kit®* versión 1.03.1 (1990) B. Gross, A. Pytte y P. Rice. *Textco, Inc.*
- *HP 89542A UV-Visible General Scanning Software.*
- *HP 89542A UV-Visible General Kinetic Software.*
- *ImageQuant Version 5.0, Molecular Dynamics.*

- *Internet Explorer* y *Mozilla Firefox*.
- *Isis Draw*® version 2.3 MDL Information System, Inc.
- Paquete “*GCG Sequence analysis software*”, *Genetics Computer Group*.
- Paquete *Microsoft Office 2000* (*Microsoft Word*, *Microsoft Excel* y *Microsoft Power Point*).
- *Windows NT*, 95, 98, y *XP Microsoft*.

➤ **Bases de datos consultadas:**

- GenBank: Secuencias de DNA y RNA (*Laboratory Los Alamos, NM*).
- GeneDB: Búsqueda de secuencias tanto en *Trypanosoma brucei* como en general.
- EMBL-EBI: Utilizada para la búsqueda y análisis de secuencia, análisis de secuencias y alineamientos.
- NCBI: Utilizada para realizar búsquedas de secuencias de DNA, proteínas y bibliográficas.
- Paquete de programas GCG (*Universidad de Wisconsin*): Se utilizó para la búsqueda de secuencias, análisis de similitud entre ellas y alineamientos.
- PDB (*Protein Data Bank*): Búsqueda de estructuras de proteínas.
- SWISS-PROT: Secuencias de proteínas (*Universidad de Ginebra, Suiza*).

B.II. MÉTODOS

B.II.1. CULTIVO Y MANIPULACIÓN DE CÉLULAS

B.II.1.1. Parásitos

B.II.1.1.1. Cultivo de *Trypanosoma brucei*

Los estudios *in vitro* con parásitos protozoos de *Trypanosoma brucei* se han realizado con la forma tripomastigote, tanto de la forma sanguínea como de la forma procíclica.

Las líneas celulares de la forma tripomastigote sanguíneas de *T. brucei* fueron cultivadas a 37°C en un incubador con CO₂ en medio de cultivo HMI-9 o en medio

HMI-9 sin timidina, complementado con un 10 % de suero bovino fetal (SBF) inactivado o en presencia de 5 % de suero bovino fetal dializado (SBFd) inactivado y 10 % de Serum Plus, según el requerimiento del experimento. El mantenimiento en cultivo de los parásitos se lleva a cabo mediante una dilución del cultivo cuando los parásitos se encuentran en la fase logarítmica de la curva de crecimiento, aproximadamente entre una densidad celular de $2.0\text{-}2.5 \times 10^6$ parásitos·mL⁻¹. El tiempo de generación es de 8 horas por lo que la densidad inicial y el volumen, en el caso de tripomastigotes sanguíneos, va a depender de la cantidad de parásitos que se necesiten y para cuando se necesiten, pudiéndose diluir tanto como sea posible. Para el cultivo celular se utilizaron frascos de cultivo estériles de 25 cm³, 75 cm³ y 125 cm³.

Las líneas celulares de la forma tripomastigote procíclica de *T. brucei* fueron cultivadas a 28°C en medio de cultivo SDM-79 o en medio MEM-Pros, suplementado con un 10 % de suero bovino fetal (SBF) inactivado y 0.01 mM de hemina. El tiempo de generación generalmente es de 8 horas, excepto en la línea celular *T. brucei* 29-13 que es de 12 horas. El mantenimiento en cultivo de los parásitos se lleva a cabo mediante una dilución del cultivo cuando los parásitos se encuentran en la fase logarítmica de la curva de crecimiento, aproximadamente entre una densidad celular de $1.0\text{-}2.0 \times 10^7$ parásitos·mL⁻¹. En este caso, la densidad inicial es importante porque no puede ser inferior a 4.0×10^5 parásitos·mL⁻¹, y también va a depender de la cantidad de parásitos y para cuando se necesiten. Para el cultivo celular se utilizaron frascos de cultivo estériles de 25 cm³, 75 cm³, 125 cm³, además de matraces autoclavables de cultivo celular de 0.5-1.0-2.0 y 3.0 L.

B.II.1.1.2. Criopreservación y descongelación de *Trypanosoma brucei*

Para la conservación de *T. brucei*, un cultivo que se encuentre en fase logarítmica se centrifuga a 1000 x g durante 10 min a 4°C y posteriormente las células se resuspenden en una solución de medio de cultivo y 10 % (v/v) de glicerol. A continuación se preparan alícuotas de 0.25 mL en viales de congelación de 2 ml de *Sarstedt*, y son almacenadas a -80°C durante un corto periodo de tiempo y en nitrógeno líquido durante largos periodos de tiempo.

Para iniciar un cultivo a partir de células congeladas, las alícuotas una vez descongeladas a 37°C, se adicionan a 5 mL de medio de cultivo y la suspensión de

células se centrifuga a 1000 x g durante 10 min, retirando posteriormente el sobrenadante con el fin de retirar el glicerol. Finalmente, las células se resuspenden en 5 ml de medio de cultivo.

B.II.1.1.3. Determinación de la Dosis Inhibitoria 50 de crecimiento (IC50)

La IC50 se define como la concentración de fármaco que inhibe el crecimiento celular en un 50 % cuando el cultivo en ausencia de fármaco alcanza la fase logarítmica tardía de crecimiento (Ellenberger y Beverley, 1989).

Se determinó la IC50 del MTX en las líneas celulares *T. brucei* S16 y *T. brucei* 29-13, correspondientes a la forma tripomastigote sanguínea y procíclica respectivamente. En el caso de *T. brucei* S16, varios cultivos de 5 mL en ausencia o en presencia de concentraciones diferentes de MTX (0.25, 0.5, 1.0, 10, 50 μM) se iniciaron a una densidad celular de 3.0×10^4 parásitos·mL⁻¹. El recuento de parásitos se realizó cada 24 h en un contador de células *Coulter*[®] Z1 hasta que los cultivos alcanzaron la fase estacionaria de crecimiento. En el caso de *T. brucei* 29-13, la determinación se llevó a cabo de la misma manera que en *T. brucei* S16 variando la densidad inicial del cultivo que fue de 6.5×10^5 parásitos·mL⁻¹.

A partir de la representación de la curva de crecimiento de cada uno de los cultivos en el tiempo se calculó la IC50 correspondiente al fármaco. A continuación, el porcentaje de crecimiento de cada cultivo se determinó, considerando el 100 % de crecimiento el número de células·mL⁻¹ del cultivo en ausencia de fármaco en fase logarítmica tardía. El valor de IC50 se obtuvo mediante interpolación en la representación del ajuste logarítmico del porcentaje de crecimiento frente a la concentración de fármaco.

B.II.1.1.4. Transfección estable por electroporación

La transfección es una técnica que consiste en la introducción de material genético extraño en células eucariotas. En el caso de *T. brucei* esta transfección tiene lugar mediante la integración de un plásmido lineal en el genoma del parásito. Tanto en el caso de tripomastigotes sanguíneos como procíclicos, la transfección se realizó mediante electroporación según el protocolo de (Carruthers y Cross, 1992).

En el caso de formas tripomastigotes sanguíneos de *T. brucei*, cultivos *in vitro* de la línea celular *T. brucei* S16 se crecieron a una densidad celular de $1.5\text{-}2.0 \times 10^6$ parásitos·mL⁻¹. El volumen necesario para recoger un número total de 2.4×10^7 parásitos por transfección se centrifugó a 1000 x g durante 10 minutos a temperatura ambiente. A continuación, cuidadosamente se retira el sobrenadante y las células se lavan con 40 mL de tampón de transfección Cytomix (Tabla B.I). Las células se recogen mediante centrifugación en las mismas condiciones y se resuspenden en el mismo tampón a una concentración de 6.0×10^7 parásitos·mL⁻¹. El DNA plasmídico aislado mediante el kit *Wizard[®] Plus SV Minipreps DNA Purification System* (Promega) se digirió con la enzima de restricción *EcoRV* o *Not I*, dependiendo del plásmido utilizado, se precipitó con etanol y finalmente se resuspendió en agua estéril a una concentración de 1 mg·mL⁻¹. Posteriormente, 2.4×10^7 parásitos se mezclaron con 10 µg del plásmido digerido y se transfirieron a una cubeta de electroporación *Gene Pulser[®] Cuvette, 4mm gap* (Bio-Rad). Inmediatamente, se electroporó en un sistema ECM 630 de BTX con las siguientes condiciones: 1.7 KV, 25 Ω y 25 µF. Después del pulso, las células se transfirieron a un frasco de cultivo con 12 mL de medio de cultivo HMI-9 con geneticina, se repartieron en una placa de 24 pocillos adicionando 0.5 mL en cada pocillo y finalmente las células se recuperan 18 horas en un incubador a 37°C con CO₂. Para realizar la selección de los clones, se adiciona 1.0 mL de medio de cultivo HMI-9 con geneticina y con el antibiótico utilizado como marcador de selección.

En el caso de formas tripomastigotes procíclicos de *T. brucei*, cultivos *in vitro* de la línea celular *T. brucei* 29-13 y 449 se mantuvieron varios días en fase logarítmica, recogiendo las células para transfectar a una densidad celular de $4.0\text{-}8.0 \times 10^6$ parásitos·mL⁻¹. El volumen necesario para recoger un número total de 2.0×10^7 parásitos por transfección se centrifugó a 1000 x g durante 10 minutos a 4°C. A continuación, cuidadosamente se retira el sobrenadante y las células se lavan con 40 mL de tampón de transfección ZPFM frío (Tabla B.I). Las células se recogen mediante centrifugación en las mismas condiciones y se resuspenden en el mismo tampón a una concentración de 4.0×10^7 parásitos·mL⁻¹. El DNA se preparó de la misma manera que en el caso de *T. brucei* S16. Posteriormente, 2.0×10^7 parásitos se mezclaron con 10 µg del plásmido digerido y se transfirieron a una cubeta fría de electroporación *Model 620 Disposable Cuvettes Plus[™], 2 mm gap* (BTX). La mezcla se mantiene en hielo durante 5 minutos y a continuación se electroporó en un sistema ECM 630 de BTX con las siguientes

condiciones: 1.6 KV, 25 Ω y 25 μ F. Después del pulso, las células se transfirieron a un frasco de cultivo con 12 mL de medio de cultivo SDM-79 con geneticina e higromicina (*T. brucei* 29-13) o con fleomicina (*T. brucei* 449) y se recuperan durante 18 horas en un incubador a 28°C. La selección de clones se lleva a cabo con el antibiótico correspondiente al marcador de selección del plásmido transfectado en placas de 24 pocillos, donde se colocan 0.5 mL por pocillo (excepto en la primera fila) de medio condicional (medio donde han sido crecidos parásitos a una densidad comprendida entre 7.0 y 9.0 x 10⁶ parásitos·mL⁻¹). El producto de la transfección se reparte a razón de 1 mL en cada pocillo de la primera fila, a partir del cual se haran diluciones 1:2 por columna hasta llegar a la última fila.

B.II.1.1.5. Obtención de extractos totales de parásitos

Para la preparación de extractos totales de parásitos, generalmente se usa un cultivo de células que se encuentre en fase logarítmica de la curva de crecimiento (1.5-2.0 x 10⁷ células·mL⁻¹), aunque puede variar dependiendo de la necesidad del experimento realizado. En primer lugar, se determina la densidad celular a la que se encuentra el cultivo, el volumen de cultivo necesario se centrifuga a 1000 x g durante 10 min a 4 °C, se retira el sobrenadante y las células se lavan con PBS 1X (Tabla B.I) dos veces y se almacenan congeladas a -80°C si no van a ser utilizadas en el momento. A continuación, las células son resuspendidas en el tampón requerido para el experimento, en el caso de la determinación de actividad uracil- DNA glicosilasa, se utiliza el tampón de medida de actividad UNG (Tris-HCl 20 mM pH 8.0, EDTA 10 mM). La solución de células se sonica en frío seis veces con un pulso continuo de 10 s cada vez, y separados cada pulso para evitar el calentamiento excesivo de la muestra. La fracción soluble del extracto se obtiene por centrifugación a 13000 r.p.m. durante 30 min a 4°C. La concentración de proteínas del extracto se determina mediante el método de Bradford (Bradford, 1976) para su posterior utilización.

Para la determinación del patrón de proteínas de extractos de parásitos, una vez recogidas las células, son resuspendidas en tampón de lisis “Urea cracking buffer” (Tabla B.I), se le añade tampón de carga 4X para el análisis de proteínas en geles SDS-PAGE (Laemmli, 1970) (Tabla B.I) y las proteínas se desnaturalizan mediante calentamiento a 99°C durante 5 min y enfriadas rápidamente en hielo.

B.II.1.2. Bacterias

El cultivo de las diferentes cepas de *E.coli* se realizó como se describe en los manuales de laboratorio de protocolos de biología molecular (Sambrook *et al.*, 1989; Ausubel *et al.*, 1997)

B.II.2. TÉCNICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR

El procedimiento seguido para llevar a cabo todas las técnicas de biología molecular utilizadas en el desarrollo de la Tesis Doctoral se describen en los manuales de protocolos de biología molecular (Sambrook *et al.*, 1989; Ausubel *et al.*, 1997).

Las diferentes técnicas utilizadas en el trabajo desarrollado han sido:

- Electroporación de bacterias competentes.
- Extracción de DNA plasmídico de *E. coli*.
- Extracción de RNA total y mRNA.
- Extracción de DNA genómico de *Trypanosoma brucei*.
- Digestión de DNA con endonucleasas de restricción.
- Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).
- Reacción de ligamiento de DNA.
- Tratamiento de DNA con fosfatasa alcalina.
- Marcaje radiactivo de DNA. Síntesis de una sonda radiactiva.
- Electroforesis de DNA y RNA.
- Transferencia de RNA a filtros de *nylon*.
- *Northern blot*.
- Hibridación de DNA y RNA con sondas radiactivas.

B.II.3. TÉCNICAS PARA EL ESTUDIO DE LA PROTEÍNA

B.II.3.1. Aislamiento y clonado del gen *TbDUT* en pET 11c

La región codificante del gen *TbDUT* se amplificó por PCR a partir de DNA genómico de la línea celular salvaje de *T.brucei* 427 utilizando los oligonucleótidos

TbDUT start y *TbDUT* Stop (Tabla B.II). El DNA amplificado se purificó mediante electroforesis en gel de agarosa y posteriormente utilizando el kit *Illustra GFX™ PCR DNA and Band Purification* (GE Healthcare). El fragmento correspondiente al gen *DUT* se ligó directamente en el vector pGEM-T obteniéndose la construcción pGEMTBDUT, y el plásmido se secuenció para comprobar el DNA amplificado. El fragmento del gen *DUT* escindido del plásmido anterior se ligó en el vector pET 11-c, previamente digeridos ambos DNAs con las enzimas de restricción *Nde* I y *Bam*H I y defosforilado el vector, rindiendo la construcción pETTBDUT.

B.II.3.2. Obtención de extractos de *E. coli* que sobreexpresan la *TbdUTPasa*

B.II.3.2.1. Inducción de la proteína recombinante *TbdUTPasa* con IPTG

En primer lugar se realizó un estudio para optimizar las condiciones de sobreexpresión, en lo que se refiere a estirpe de bacterias, temperatura y tiempo de inducción. Finalmente la expresión de la dUTPasa se llevó a cabo en células *E. coli* BL21 (DE3) transformadas con la construcción pETTBDUT, cuya inducción se encuentra bajo control del promotor *T7lac*. Inicialmente, una colonia de células transformadas fue cultivada en 10 ml de medio LB con ampicilina ($100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) a 37°C y agitación hasta alcanzar una DO_{600} entre 0.6 y 1.0. Este cultivo se utilizó para inocular 40 mL de medio con ampicilina y se incubó toda la noche a 37°C . A la mañana siguiente el cultivo de 40 mL se utilizó para inocular 2 L de medio con ampicilina, se incubó a 37°C hasta alcanzar una DO_{600} de 0.6, en cuyo momento se añadió IPTG a una concentración final de 1 mM. El cultivo se incubó 4 h adicionales, momento en el que existe una mayor expresión de la proteína. Para recoger las células el cultivo se centrifugó a $7000 \times g$ durante 10 min a 4°C , y las células se congelaron a -80°C .

B.II.3.2.2. Preparación de extractos solubles de bacterias

Las células de *E. coli* BL21 (DE3) transformadas con la construcción pETTBDUT inducidas con IPTG durante 4°C se resuspendieron en tampón HAP A (Tabla B.I), al cual se le añadió una mezcla de inhibidores de proteasas (benzamidina 1 mM, leupeptina $20 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, 1,10 fenantrolina 10 mM, aprotinina $50 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ e

inhibidor de tripsina 50 mL⁻¹. La suspensión de células se sonicaron en frío 6 veces durante 30 s con ciclos del 50 %. El homogenizado de bacterias se centrifugó a 12000 r.p.m. durante 30 min a 4°C para obtener por separado el extracto soluble y los cuerpos de inclusión.

B.II.3.3. Purificación de la *TbdUTPasa* recombinante

B.II.3.3.1. Cromatografía de adsorción en columna de hidroxiapatito.

El hidroxiapatito de calcio es la forma cristalina del hidroxifosfato cálcico. El mecanismo de interacción de las proteínas con el hidroxiapatito es un proceso complejo. El proceso de absorción de las proteínas va a ser diferente dependiendo si es el grupo amino o el grupo carboxilo. Los grupos aminos establecen interacciones electrostáticas inespecíficas entre su carga negativa y la carga negativa que generalmente posee la columna de hidroxiapatito cuando se utiliza un tampón fosfato en la cromatografía. Los grupos carboxilo actúan de dos maneras: en primer lugar, existe una repulsión electrostática por la carga negativa de la columna; y en segundo lugar, se forman complejos con el calcio en forma de clúster.

Para la preparación de la columna se utilizaron 0.06 g de resina por mg de proteína, los cuales se resuspendieron en tampón HAP A (Tabla B.I), empaquetados en una columna de 1 cm x 20 cm, y la columna se equilibró con 4 volúmenes de columna a 4°C a un flujo de 1.0 mL·min⁻¹. El extracto soluble de proteínas obtenido de las células inducidas se diluyó a una concentración de 1.0 mg·mL⁻¹ en tampón HAP A y se cargó en la columna al mismo flujo. A continuación, la columna se lavó con 10 volúmenes de columna de tampón HAP A y la elución de la proteína de la resina se llevó a cabo mediante la aplicación de un gradiente lineal de tampón fosfato potásico pH 7.0 de 20 mM a 200 mM (tampón HAP A-tampón HAP B) (Tabla B.I) sin variar el flujo. Durante la elución se fueron tomando alícuotas de 2 mL, y a continuación se midió concentración para determinar en que fracciones se había eluido la proteína mediante electroforesis en geles de acrilamida del 12%. Las fracciones que contienen la dUTPasa se concentraron un Centriprep YM 10 (Millipore) y Microsep 10K Omega (Pall).

B.II.3.3.2. Cromatografía de intercambio iónico

En un segundo paso de purificación se utilizó una cromatografía de intercambio aniónico. El tampón de la solución de proteínas obtenida del primer paso de purificación se cambió utilizando columnas PD-10, eluyendo las proteínas en tampón MonoQ A (Tabla B.I). La cromatografía se realizó con una columna MonoQ[®] HR 5/5 (GE Healthcare) en un sistema de cromatografía líquida de alta resolución ÄKTA (GE Healthcare). La proteína se cargó en la columna a $1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ a un flujo de $0.5 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$. Una vez lavada la columna la proteína se eluyó mediante un gradiente lineal de NaCl entre 0 y 0.5 M (tampón MonoQ A-tampón MonoQ B) (Tabla B.I). El gradiente se recogió fraccionadamente y se determinó la concentración de proteínas en cada fracción por el método Bradford. Las fracciones que contenían la proteína fueron concentradas y guardadas a -80°C en el tampón de elución con MgCl_2 100 mM.

B.II.3.4. Caracterización cinética de la proteína dUTPasa de *Trypanosoma brucei*

B.II.3.4.1. Determinación espectrofotométrica de la actividad dUTPasa

Los productos de la hidrólisis del dUTP por la dUTPasa son dUMP, pirofosfato y protones. La liberación de protones ligada a esta reacción se puede aprovechar en la práctica para medir la actividad dUTPasa.

El método se describe detalladamente en (Larsson *et al.*, 1996). En líneas generales consiste en llevar a cabo la reacción en un medio débilmente tamponado y en presencia de un indicador colorimétrico que permite la detección de los cambios de pH que se originan como consecuencia de la liberación de protones. Los cambios de absorbancia registrados son directamente proporcionales a la concentración de producto que se genera, rigiéndose por la siguiente ecuación:

$$\Delta A = -n\Delta[P] \Delta\epsilon \left(1 + \frac{C_{st} K_{ind} \left(1 + \frac{[H^+]}{K_{ind}} \right)^2}{C_{ind} K_{st} \left(1 + \frac{[H^+]}{K_{st}} \right)^2} \right)^{-1}$$

ΔA = incremento de absorbancia.

$\Delta[P]$ = incremento de producto.

n = número de protones liberados por molécula de producto formado.

$\Delta\epsilon$ = diferencia entre los coeficientes de extinción de las formas ácida y básica del indicador a la longitud de onda estudiada.

C_{st} , C_{ind} = concentración total de la sustancia tamponante e indicador respectivamente.

K_{st} , K_{ind} = constantes ácido-base de la sustancia tamponante e indicador.

El término incluido en paréntesis expresa el recíproco de la capacidad tamponante del indicador en relación a la capacidad tamponante de indicador y sustancia tamponante combinadas, lo cual se simplifica a $C_{ind} / (C_{ind} + C_{st})$ cuando $K_{ind} = K_{st}$. Traducido a términos más sencillos, los errores que se pueden cometer debido a una desviación de la relación lineal entre absorbancia y formación de producto se eliminan cuando se cumpla que $C_{ind} + C_{st} \gg n\Delta[P]$ y $K_{ind} \approx K_{st}$.

El número de protones que se liberan en la reacción de hidrólisis de dUTP es directamente proporcional a la concentración de producto formado en la reacción, pero depende del pH al que se realice la reacción. A efectos prácticos, la curva de ΔA frente al tiempo que se obtiene haciendo un seguimiento espectrofotométrico en las condiciones descritas, es linealmente proporcional al $\Delta[P]$ que se produce en la reacción siempre que el cambio de pH global registrado no sea demasiado elevado.

A partir de los valores de absorbancia obtenidos en la titulación de cada mezcla tampón/indicador se pueden establecer los valores de pK_a y de la constante de extinción molar aparentes a la longitud de onda utilizada. Con ambos valores de terminados, se puede calcular el cambio de pH global ocurrido en la reacción a partir de los valores de absorbancia.

Cumplidas las premisas anteriores se puede determinar la concentración de producto en cada tiempo utilizando la ecuación:

$$[P]_t = \frac{A_0 - A_t}{A_0 - A_\infty} [S]_0$$

$[P]_t$ = concentración de producto en el tiempo t .

$[S]_0$ = concentración inicial de sustrato.

A_0, A_t, A_∞ , = absorbancia inicial, a tiempo t y final respectivamente.

La utilización de un accesorio de “*stopped flow*” acoplado al espectrofotómetro permite las medidas de absorbancia iniciales a partir de las cuales se obtiene una curva continua de hidrólisis de dUTP en el tiempo. El análisis de esta curva se puede realizar por medio de la ecuación integrada de Michaelis-Menten, obteniendo de esta forma una mayor información de la cinética subyacente:

$$\frac{[P]_t}{t} = V_{max} - \frac{K_{map}}{t} \text{Ln} \frac{[S]_0}{[S]_0 - [P]_t}$$

Ecuación integrada de Michaelis-Menten

A partir de estudios anteriores realizados en nuestro laboratorio por (Hidalgo-Zarco *et al.*, 2001; Bernier-Villamor *et al.*, 2002), se ha determinado que la mezcla de sustancia tamponante/indicador adecuada es bicina/rojo cresol, llevando a cabo la reacción a un pH entre 7.5 y 8.5 y a una longitud de onda de 573 nm.

Los datos generados a partir de las distintas curvas obtenidas en el espectrofotómetro se sometieron al análisis de la ecuación integrada de Michaelis-Menten utilizando el programa MMD (cedido por Johan Nord, Universidad de Lund, Suecia).

Los nucleótidos trifosfato (GE Healthacare) y el dUDP (Jena Biosciences) utilizados en las medidas cinéticas provienen de soluciones de alta pureza y se encuentran ausentes por tanto de productos parcialmente hidrolizados.

Todas las reacciones en las que no se especifique la temperatura se realizaron a 25°C. La cubeta utilizada para las medidas tiene un paso de luz de 1 cm y un volumen de 400 μL .

B.II.4. TÉCNICAS INMUNOLÓGICAS

B.II.4.1. Obtención de anticuerpos policlonales frente a la dUTPasa de *T. brucei*

B.II.4.1.1. Inmunizaciones

Para la obtención de anticuerpos policlonales frente a la dUTPasa de *T. brucei* se utilizó proteína purificada a la cual previamente se le cambió el tampón en el que estaba almacenada a -80°C , por PBS 1X utilizando columnas PD-10. Las inmunizaciones se realizaron en un conejo de la cepa *New Zealand White*. Previamente a la primera inmunización se extrajeron 15 ml de sangre con el fin de obtener el suero preinmune que fue utilizado como control. A continuación el conejo fue inmunizado cuatro veces por vía subcutánea con la proteína recombinante purificada *TbdUTPasa*. En la primera inmunización se inyectó una emulsión de 0.4 mg de proteína en 0.5 mL de PBS 1X mezclado con el mismo volumen de Adyuvante Completo de Freund. La segunda y tercera inmunización se realizaron con un intervalo de dos semanas y transcurrido un mes, la cuarta inmunización, inoculando en todos los casos una emulsión (v/v) de *TbdUTPasa* en PBS 1X y Adyuvante Incompleto de Freund. Transcurrida una semana de cada inmunización, se extrajeron ≈ 20 mL de sangre del conejo excepto en la última extracción donde se desangró al animal (≈ 75 mL). Posteriormente, se aisló el suero y se analizó mediante *western blot*, obteniéndose un título final aproximado de $1 : 2.056 \times 10^6$.

B.II.4.1.2. Obtención de suero

La sangre obtenida en la extracción, se dejó a temperatura ambiente durante 2 h; a continuación se incubó durante 20 min a 37°C y finalmente para favorecer la contracción del coágulo se mantuvo a 4°C durante 4 h. Los sueros fueron centrifugados a $2500 \times g$ durante 10 min y los sobrenadantes se almacenaron en alícuotas con azida sódica (0.02 %) a 4°C y a -80°C .

B.II.4.1.3. Purificación del anticuerpo anti-TbdUTPasa

Una purificación del suero se realizó mediante una cromatografía de afinidad frente a la proteína dUTPasa purificada. Para ello la proteína dUTPasa purificada se adhiere a una resina de Affi-gel 15 (Bio-Rad), la cual tiene la capacidad de fijar ligandos con amina primarias. En primer lugar, la resina es secuencialmente lavada con 20 volúmenes de agua bidestilada y con 20 volúmenes de tampón de adherencia (Hepes 50 mM pH 7.5), centrifugada y retirado el sobrenadante entre cada lavado. A continuación, 1 mg de proteína dUTPasa purificada se diluyó en 4 mL de tampón de adherencia, se cargó en la columna y se incubó en un agitador orbital toda la noche a 4°C. Al día siguiente, la columna se lavó con 20 volúmenes de tampón de bloqueo (etanolamina-HCl 100 mM pH 8.0), se resuspendió la resina en 2 mL de tampón de bloqueo y se incubó 1 h a 4°C en el agitador orbital. Posteriormente, la resina se lavó con 20 volúmenes de cada una de las siguientes soluciones: PBS 1X, tampón de elución (glicina 100 mM pH 2.5), Tris-HCl 100 mM pH 8.0. La resina se resuspendió en 2 mL de tampón Tris-HCl 100 mM pH 8.0 y se transfirió a una columna Poly-Prep® Chromatography Columns (Bio-Rad), se lavó con el mismo tampón, con 20 volúmenes de PBS-500 (NaCl 0.5 M) y de PBS 1X. A continuación, se cargaron 10 mL de suero en la columna, se dejó recircular dos veces, se lavó con 20 volúmenes de las siguientes soluciones: PBS 1X, PBS-250 (NaCl 0.25 M), PBS-500, finalmente el anticuerpo se eluyó con cinco volúmenes de glicina 100 mM pH 2.5 y se neutralizó con Tris-HCl 1 M pH 9.5.

B.II.4.2. Transferencia de proteínas, *Western blot*

Las proteínas separadas por peso molecular en geles de acrilamida se transfirieron a membranas de nitrocelulosa (Optitran BA-S 85 Reinforced NC) (Whatman® Schleicher & Schuell). Para ello, la membrana y el gel se sumergieron en solución de transferencia (Tris 0.025 M, glicina 0.15 M, metanol 20 %, pH 8.1-8.4) y a continuación se colocaron entre seis piezas de papel Whatman® 3MM previamente empapadas en la misma solución. La transferencia se llevó a cabo en un *Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell* (Bio-Rad) en unas condiciones de 100 V durante 45 min. A continuación, la membrana fue teñida con una solución de Rojo-Ponceau (0.5 %) y ácido acético (1 %) durante 1 min. Posteriormente, se lavó con agua bidestilada hasta

visualizar las proteínas. Para desteñir el filtro se utilizó una solución de PBS 1X-Tween[®] 20 0.1 %.

La membrana fue bloqueada en agitación con una solución de leche desnatada al 5 % en PBS 1X con 0.1 % de Tween[®] 20 durante 30 min a temperatura ambiente, quedando la membrana lista para llevar a cabo la inmunodetección con un anticuerpo marcado.

B.II.4.3. Inmunodetección

Para la detección de las proteínas fijadas a la membrana de nitrocelulosa, se realizó una incubación durante 1 h con una dilución 1:75000 del anticuerpo primario en solución de bloqueo (leche desnatada 5% (p/v), Tween[®] 20 0.1 % en PBS 1X). Seguidamente, se realizaron tres lavados de 10 min en solución de lavado (PBS 1X, Tween[®] 20 0.1 %), y después se incubó la membrana durante 1 h con una dilución (1:5000) de anti IgG de conejo conjugado con peroxidasa (*HRP-peroxidase*). Después de lavar tres veces, se incubó durante 1 min con los reactivos de ECL[™] (GE Healthcare), y finalmente las proteínas se detectaron tras el revelado de la película autorradiográfica Hyperfilm[™] ECL (GE Healthcare) expuesta a la membrana tratada.

B.II.4.4. Deshibridación de membranas para detección de proteínas

Antes de poder reutilizar la membrana, se hizo una deshibridación del anticuerpo unido mediante dos métodos diferentes:

1. Incubar la membrana en agitación durante 30 min en una solución Tris-HCl 10 mM pH 2.3, NaCl 150 mM y a continuación lavarla con una solución PBS 1X-Tween[®] 20 0.1 %.
2. Incubar la membrana en agitación durante 30 min a 60°C con una solución compuesta por Tris-HCl 64 mM pH 6.8, SDS 2 %, β -mercaptoetanol 100 mM, y a continuación lavarla con una solución PBS 1X-Tween[®] 20 0.1 %.

B.II.5. ESTUDIO DE LA LOCALIZACIÓN INTRACELULAR DE LA dUTPasa DE *T. brucei*.

B.II.5.1. Inmunocitoquímica y observación por microscopía electrónica de transmisión

B.II.5.1.1. Preparación de inclusiones de parásitos. Procesamiento para inmunocitoquímica (LRWhite).

Tanto la preparación de las inclusiones como el montaje de los cortes sobre las rejillas de níquel fueron realizados en el Servicio de Microscopía Electrónica del Centro de Instrumentación Científica (CIC) de la Universidad de Granada. Las inclusiones se prepararon a partir de $1-10 \times 10^7$ células en la fase exponencial de la curva de crecimiento, que fueron lavadas con tampón PBS 1X estéril (Tabla B.I) e incubadas a 4°C durante 2 h con fijador de Karnovsky (glutaraldehído tipo I 0.4 %, formaldehído 4 %, sacarosa 3.5 % y ácido pícrico 0.5 % en tampón cacodilato 0.1 M, pH 7.4). Posteriormente, se realizaron tres lavados de 20 min con tampón cacodilato a 4°C. A continuación la muestra fue resuspendida en un volumen de 500 μ l y transferida a un tubo de 1.5 mL. Los sitios carboxi-aldehído reactivos se bloquearon con glicina 0.1 M en el mismo tampón durante 1 h. Se centrifugó, y se descartó el sobrenadante. La muestra fue entonces deshidratada con concentraciones crecientes de etanol según el siguiente esquema:

Resuspensión en etanol 50 %, 20 min, -20°C. Centrifugación.

Resuspensión en etanol 70 %, 20 min, -20°C. Centrifugación.

Resuspensión en etanol 90 %, 20 min, -20°C. Centrifugación.

Resuspensión en etanol 100 %, 20 min, -20°C (2 veces). Centrifugación.

El material fue, posteriormente, transferido a un frasco de inclusión e infiltrado en la resina de la siguiente forma:

Etanol-Resina LRWhite 25 %, 2 h, -20°C

Etanol-Resina LRWhite 50 %, 2 h, -20°C

Etanol-Resina LRWhite 75 %, 2 h, -20°C

Etanol-Resina LRWhite 100 %, 2 h, -20°C (2 veces)

Por último, se transfirió el material a una cápsula de gelatina, se cubrió con resina y se dejó polimerizando durante 2 días en cámara UV a -20°C , y un día a temperatura ambiente.

Una vez obtenidos los bloques de inclusión se hicieron cortes semifinos de $1\ \mu\text{m}$ de espesor que se tiñeron con azul de toluidina al 2 % en borax al 1 % en placa caliente. Dichas secciones se observaron en un microscopio óptico. Examinados los cortes semifinos se procedió a la elección de la zona de interés para la posterior obtención de cortes ultrafinos de $500\ \text{Å}$ de espesor en un ultramicrotomo Ultracut R de Leica. Los cortes se montaron sobre rejillas de níquel de malla 300.

B.II.5.1.2. Inmunomicroscopía electrónica

Todo el proceso se llevó a cabo a temperatura ambiente en atmósfera húmeda. Las soluciones utilizadas se filtraron previamente con filtros de $0.22\ \mu\text{m}$ Acrodisc[®] (Pall corporation). Cada una de las rejillas que contenían cortes correspondientes a formas tripomastigotes procíclicas de *T. brucei* 427 se incubó durante 30 min a temperatura ambiente con $20\ \mu\text{l}$ de NH_4Cl 80 mM. A continuación las rejillas se incubaron durante 30 min con una solución de PBS 1X pH 8.0-BSA 3 % y 10 min con una solución PBS 1X pH 8.0-BSA 1 %- Tween[®] 20 0.01 %. Posteriormente, se trataron con diferentes diluciones (1:20, 1:50, 1:100) de anticuerpo policlonal anti*Tbd*UTPasa en PBS 1X pH 8.0-BSA 1 %-Tween[®] 20 0.01 % durante 2 h. Los anticuerpos no unidos fueron eliminados mediante cuatro lavados de 5 min con solución PBS 1X pH 8.0-BSA 3 % y un lavado de 30 min en PBS 1X pH 8.0-BSA 1 %-Tween[®] 20 0.01 %. A continuación se incubó con el anticuerpo secundario (Anti IgG de conejo conjugado con partículas de oro de 10 nm) en dilución (1:100) en PBS 1X pH 8.0-BSA 1 %-Tween[®] 20 0.01 % durante 1 h a temperatura ambiente. Una vez terminada la incubación, las rejillas se lavaron cinco veces de 5 min con PBS 1X pH 8.0 y cinco veces con agua bidestilada, y se dejaron secar toda la noche. Al día siguiente las muestras se contrastaron con acetato de uranilo al 2 % y fueron visualizadas y fotografiadas en un microscopio de transmisión Zeiss 902 10 CR a 100 kV.

B.II.5.2. Inmunofluorescencia

Las inmunofluorescencias se llevaron a cabo a partir de cultivos de parásitos de tripanomastigotes procíclicos de *T.brucei* en fase logarítmica de crecimiento. Las células se centrifugaron a 1000 x g durante 10 min a 4°C, se lavaron en medio de cultivo y se resuspendieron a una concentración de 0.5-1.0 x 10⁷ parásitos·mL⁻¹. En un portaobjetos previamente revestido con Poli-L-lisina 0.1 % durante 5 min, se adicionaron 20 µL de la suspensión de parásitos de tal forma que las células queden adheridas al portaobjetos. A continuación las células se fijaron con una solución de p-formaldehído al 4 % preparado en solución de lavado (PBS 1X pH 7.2-Tween[®] 20 0.2 %) durante 15 min, y después se lavaron 2 veces con solución de lavado. Se permeabilizaron con una solución de Nonidet P-40 o Igepal al 0.1 % en solución de lavado durante 20 min, se lavaron dos veces y se bloquearon durante 30 min con solución de bloqueo (PBS 1X pH 7.2-Tween[®] 20 0.2 %-BSA 1.5 %). Las preparaciones se incubaron durante 1 h con diluciones 1:500 y 1:1000 del anticuerpo anti*TbdUTPasa* purificado frente a la proteína pura preparadas en solución de bloqueo, utilizándose como control la misma dilución de suero preinmune. A continuación se realizaron tres lavados durante 20 min y se incubó en oscuridad una dilución (1:500) de anti IgG de conejo conjugado con fluoresceína durante 1 h. Después de lavar tres veces las muestras se sumergieron en metanol puro y tras incubar durante 1 min se dejaron secar al aire en oscuridad. Finalmente se realizó el montaje de las muestras tratadas con 3 µl de Vectashield con DAPI cubriéndolas con cubreobjetos y sellando las preparaciones con esmalte. Una vez seco el esmalte las muestras se conservaron protegidas a la luz y a 4°C hasta su observación.

La observación de las muestras se realizó en un microscopio de fluorescencia Zeiss Axiophot (CarlZeiss, Inc.).

B.II.6. SILENCIAMIENTO MEDIANTE RNAi DE LA EXPRESIÓN DE LA dUTPasa EN *Trypanosoma brucei*

El RNA de doble cadena que desencadena el fenómeno del silenciamiento génico se generó a partir de dos estrategias: en primer lugar a partir de promotores T7

enfrentados (LaCount *et al.*, 2000) y en segundo lugar utilizando una estructura tallo-lazo también conocida como estrategia “stuffer” (Shi *et al.*, 2000).

La estrategia de los promotores T7 enfrentados consiste en introducir una secuencia del gen que se quiere silenciar en un vector que contiene dos promotores T7, con lo que se produce la transcripción de ambas cadenas complementarias y se genera un RNA de doble cadena que desencadena la degradación del RNA mensajero endógeno del gen de la célula.

La estrategia de la estructura tallo-lazo consiste en introducir la secuencia del gen que se quiere silenciar en ambos sentidos separados por una secuencia de 753 bp en un vector que contiene el promotor endógeno de *T. brucei* PARP. Las secuencias complementarias al formar la doble cadena de RNA forman una estructura tallo-lazo.

B.II.6.1. Construcción de plásmidos para el silenciamiento génico mediante RNAi

En el caso de la estrategia de promotores T7 enfrentados, la secuencia codificante de la dUTPasa de *T. brucei* se amplificó por PCR usando los oligonucleótidos dUTPasa *Tb Xho I-Hind III* (5') y *TbDUT Stop* (3'), utilizando Taq DNA polimerasa y el plásmido pGEMTBDUT como DNA molde. El producto de la reacción de PCR se clonó en el vector pGEM-T y la amplificación se comprobó por secuenciación de la construcción con los oligonucleótidos T7 y SP6. El fragmento amplificado se escindió del plásmido mediante digestión con las enzimas de restricción *Hind III* y *BamH I* y se clonó en el vector p2T7 previamente digerido con las mismas endonucleasas y defosforilado, obteniéndose una construcción denominada p2T7TBDUT.

En el caso de la estrategia de la estructura tallo-lazo, se utilizó un fragmento de 421 pares de bases correspondiente a la posición 163 y 584 de la secuencia codificante de la dUTPasa. La amplificación se llevó a cabo a partir del plásmido pGEMTBDUT con Pwo DNA polimerasa, utilizando los oligonucleótidos VCA 6 (5') y VCA 7 (3'). En este caso el proceso consta de dos pasos de clonación en los que se introduce el fragmento de DNA en ambos sentidos. En primer lugar, una alícuota del producto de PCR se digirió con las endonucleasas *Hind III* y *Apa I*, y el producto se ligó en el vector pGR19 previamente digerido con las mismas enzimas. En un segundo paso, otra alícuota del producto de PCR se digirió con la endonucleasa *BamH I* y se clonó en la construcción resultante de la ligación anterior previamente digerida con *BamH I* y *Hpa I*,

quedando insertada en la orientación opuesta a la del primer paso. Tras los dos pasos de clonación se obtuvo un plásmido denominado pGRV6.

B.II.6.2. Estudio del efecto del RNAi sobre el crecimiento celular

Para determinar el efecto del silenciamiento del gen de la dUTPasa sobre el crecimiento celular se llevó a cabo un seguimiento de un cultivo de parásitos donde se indujo el RNAi con doxiciclina y como control se utiliza un cultivo donde no se induce el silenciamiento.

En el caso de cultivos de tripomastigotes de la forma sanguínea, tanto para la línea celular *T. brucei* S16 p2T7TBDUT como *T. brucei* S16 pGRV6, se inoculó un cultivo de 10 mL a una densidad celular de 3.0×10^4 parásitos·mL⁻¹, después se hicieron dos alícuotas, y a una de ellas se añadió doxiciclina como agente inductor del RNAi a una concentración de 1.0 µg·mL⁻¹. La densidad celular se midió cada 24 h utilizando un contador de células *Z1 Coulter® Particle Counter*. Para evitar que el cultivo supere la fase logarítmica, cada 2 días se diluyeron inoculándolos a la misma densidad inicial y volviendo a añadir. De esta manera se obtiene una curva de crecimiento frente al tiempo, pudiendo determinar el efecto del RNAi sobre el crecimiento celular.

De la manera semejante se estudió el efecto del RNAi en tripomastigotes de la forma procíclica. En el caso de *T. brucei* 29-13 p2T7TBDUT la densidad inicial fue de 0.75×10^6 parásitos·mL⁻¹ y para *T. brucei* 449 pGRV6 se partió de una densidad de 0.4×10^6 parásitos·mL⁻¹.

B.II.6.3. Cuantificación de los niveles intracelulares de los nucleótidos de uracilo y timina

El ensayo utilizado para determinar los niveles intracelulares de nucleótidos está basado en la incorporación de desoxiribonucleótidos al DNA catalizado por la DNA polimerasa (Sherman y Fyfe, 1989). La premisa de partida es que cuando uno de los tres dNTPs presentes en exceso es marcado radiactivamente, la cantidad de radiactividad incorporada al DNA es proporcional a la cantidad del cuarto, el cual sería el dNTP limitante. La síntesis de DNA por parte de la DNA polimerasa se lleva a cabo utilizando oligonucleótidos sintéticos tanto como molde como cebador.

En primer lugar, se indujo el RNAi en la línea celular *T. brucei* 449 pGRV6, se recogieron las células mediante centrifugación a 1000 x g durante 10 min a 4°C y se lavaron una vez en PBS 1X. El precipitado de células se resuspendió en PBS 1X a una concentración de 2.0×10^5 parásitos·mL⁻¹ y se hicieron alícuotas por duplicado con diferente cantidad de células ($1.0-2.0 \times 10^6$). A continuación se llevó a cabo una extracción en 250 µL de metanol al 60 % durante toda la noche a -20°C. Al día siguiente la suspensión se hirvió durante 5 min, se centrifugó durante 20 min a 17000 x g, el sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo de 1.5 mL y el disolvente se evaporó en vacío utilizando un evaporador de DNA SpeedVac® DNA 120 (Savant). El precipitado de una de las muestras de cada par de alícuotas se disolvió en 40 µL de tampón de reacción de la dUTPasa (Tris-HCl 34 mM pH 7.8, MgCl₂ 5 mM) y la segunda en 40 µL de la misma solución pero con 30 ng de dUTPasa humana. Las mezclas se incubaron a 37°C durante 20 min, se adicionaron 60 µL de metanol para detener la reacción, se incubaron durante 1 h a -20°C y se centrifugaron a 17000 x g durante 20 min. El sobrenadante se pasó a un nuevo tubo de 1.5 mL y se evaporó de nuevo con vacío. El residuo obtenido se disolvió en 100 µL de una solución compuesta por: Tris-HCl 34 mM pH 7.8, MgCl₂ 50 mM, [2,8-³H] desoxiadenosina trifosfato 0.01 µCi·µL⁻¹, 32 nM de los oligonucleótidos molde (5'- TTT ATT TAT TTA TTT ATT TAG GCG GTG GAG GCG G - 3') y cebador (5'- CCG CCT CCA CCG CC - 3'), 0.3 U de DNA polimerasa I (fragmento Klenow (exo⁻)) y las mezclas se incubaron durante 45 min a 42°C. A continuación se hicieron tres alícuotas de 30 µL de cada muestra, a las cuales se añadieron 470 µL de una solución Tris-HCl 34 mM pH 7.8, MgCl₂ 50 mM, ácido tricloroacético 10 % (v/v) y se incubaron un mínimo de 30 min a 4°C para precipitar el DNA. Cada muestra se cargó en un filtro GF/C (Whatman®), se lavó con 30 mL de una solución de ácido tricloroacético 5 % (v/v) y 3 mL de etanol absoluto utilizando un sistema de vacío. Finalmente, los filtros se secaron y la radiactividad se cuantificó utilizando un contador de centelleo (Beckman Coulter™).

B.II.6.4. Determinación del efecto combinado del RNAi de la dUTPasa y la inhibición por metotrexato en el crecimiento celular

El perfil de crecimiento de diferentes líneas celulares en presencia de MTX, doxiciclina, o de ambos fármacos se determinó para estudiar el efecto resultante en cada

caso concreto. Las concentraciones utilizadas en el ensayo se seleccionaron tras la determinación de la IC50 del MTX de dicho fármaco tanto en las formas tripomastigotes sanguíneas como procíclicas transfectadas con el plásmido p2T7TBDUT. Dichas concentraciones fueron de 0.25-0.5-1.0 μM y de 0.7-1.4-2.8 μM para las formas sanguíneas y procíclicas respectivamente. Adicionalmente, se realizó el mismo ensayo con la línea celular *T. brucei* S16 sin transfectar.

B.II.6.5. Efecto de la timidina y timina sobre el RNAi de la dUTPasa

Se estudió el efecto que tenía la presencia de timidina o timina sobre la proliferación celular en la línea celular *T. brucei* 449 pGRV6. Para ello, se inocularon cultivos en presencia únicamente de doxiciclina, timidina o timina, y cultivos con doxiciclina y concentraciones crecientes de timidina o timina, tomando como control un cultivo en ausencia de todos los productos. Para el caso de la timidina se utilizaron concentraciones de 50-150-300-600 μM y en el caso de timina se usaron concentraciones de 5-10-25-50 μM .

B.II.6.6. Análisis mediante FACS del ciclo celular de *Trypanosoma brucei*

El efecto sobre el ciclo celular se estudió mediante citometría de flujo, por el cual se puede separar las diferentes fases del ciclo celular debido al diferente contenido genómico presente en cada fase. El ensayo se realizó en la línea celular *T. brucei* 449 pGRV6, en la cual se indujo el RNAi y se tomaron muestras a lo largo del tiempo después de la inducción. Las muestras correspondientes a 2.0×10^7 parásitos se obtuvieron por centrifugación a $1000 \times g$ durante 10 min a 4°C . Las células se lavaron dos veces con PBS, y se fijaron en una solución de etanol frío al 70 % en PBS 1X durante toda la noche a 4°C . Al día siguiente, las muestras se centrifugaron, se lavaron dos veces con PBS, se resuspendieron en 500 μL de PBS 1X conteniendo $40.0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de yoduro de propidio y $10.0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de RNasa A y se incubaron en oscuridad durante 30 min a temperatura ambiente. A continuación, la citometría de flujo y el análisis se llevó a cabo en un Becton Dickinson FACScan con el programa BD CellQuest™ Pro versión 4.0.2.

B.II.6.7. Medida de las actividades enzimáticas uracil DNA glicosilasa y AP endonucleasa

Para las medidas de actividad se prepararon extractos celulares a partir de cultivos inducidos y no inducidos de la línea celular *T. brucei* 449 pGRV6. Del orden de 10^8 parásitos se centrifugaron a 1000 x g durante 10 min a 4°C, se lavaron con PBS 1X y el precipitado de células se congeló a -80°C. Los parásitos se disolvieron en 250 µL de tampón de medida de actividad UNG (Tris-HCl 20 mM pH 8.0, EDTA 10 mM) y se sonicaron en frío seis ciclos continuos de 6 s. La suspensión se centrifugó a 13000 r.p.m. durante 20 min a 4°C, la fracción soluble se transfirió a un nuevo tubo y la concentración de proteínas se cuantificó mediante el método Bradford.

Como sustrato de la reacción para la medida de actividad uracil DNA glicosilasa y AP endonucleasa se utilizaron dos oligonucleótidos de 21 residuos cada uno, que contenían en posición 10 una base de uracilo (5'- CCT GCC CTG UGC AGC TGT GGG-3') y un análogo de sitio abásico sintético de tetrahidrofurano (5'- CCT GCC CTG THF_{GC} AGC TGT GGG-3') ambos de Trevigen[®], respectivamente. En ambos casos, fueron marcados radiactivamente en el extremo 5' con [γ -³²P]ATP (3000 Ci·mmol⁻¹) utilizando T4 polinucleótido quinasa (New England Biolabs), hibridados con un oligonucleótido de secuencia complementaria en tampón de hibridación (Tris-HCl 20 mM pH 8.0, MgCl₂ 10 mM), el cual contenía una adenosina en la posición enfrentada a la lesión, rindiendo pares U:A y THF:A.

En el caso de la uracil DNA glicosilasa, la reacción se llevó a cabo de la siguiente manera: una mezcla de reacción de 10 µL compuesta por 50 fmoles de oligonucleótido U:A marcado con ³²P se incubó durante 1 h a 37°C en tampón de reacción (Tris-HCl 20 mM pH 8.0, EDTA 1 mM, DTT 1 mM, BSA 1 mg·mL⁻¹). Para cuantificar la cantidad total de sitios abásicos generados por la uracil DNA glicosilasa, a la mezcla de reacción se le añadió 5 µL de tampón de rotura de sitios abásicos (NaOH 0.1 N, EDTA 30 mM) y se incubó 5 min a 95°C. A continuación, la mezcla se neutralizó con 5 µL de una solución de HCl 0.1 N, se adicionó 20 µL de tampón de carga 2X (formamida 90 %, TBE 1X, azul de bromofenol 0.1 %, xileno cianol 0.1 %).

En el caso de la AP endonucleasa, la determinación de la actividad se realizó de la siguiente manera: una mezcla de reacción de 10 µL compuesta por 50 fmoles de oligonucleótido THF:A marcado con ³²P se incubó durante 30 min a 37°C en tampón de

reacción (Tris-HCl 25 mM pH 8.0, MgCl₂ 5 mM, NaCl 10 mM 1 mM, BSA 1 mg·mL⁻¹). A continuación, se adicionó 10 µL de tampón de carga 2X.

Las muestras previamente desnaturalizadas durante 5 min a 95°C, se resolvieron en geles de acrilamida al 20 % (19:1 acrilamida:bis-acrilamida) en condiciones desnaturalizantes. La detección y cuantificación de las bandas se llevó a cabo mediante escaneo del gel utilizando un Storm 820 PhosphorImager y un Image Quant 5.0 software (Molecular Dynamics).

B.II.6.8. Estudio del efecto de un doble silenciamiento de los genes de la dUTPasa y de la UNG en *Trypanosoma brucei*

B.II.6.8.1. Construcción de plásmidos para el silenciamiento génico mediante RNAi

En primer lugar se llevó a cabo la construcción del plásmido con la capacidad de generar RNA de interferencia para la UNG de *T. brucei*, mediante la estrategia de la estructura tallo-lazo. Para ello un fragmento de 449 pares de bases correspondiente a la posición 97 y 546 de la secuencia codificante de la UNG de *T. brucei* se amplificó por PCR usando los oligonucleótidos VCA 11 (5') y VCA 12 (3'), a partir de DNA genómico de *T. brucei* 427 utilizando Pwo DNA polimerasa. Una alícuota del producto de PCR se digirió con las endonucleasas *Hind* III y *Apa* I y el producto se ligó en el vector pGR19 previamente digerido con las mismas enzimas. En un segundo paso, otra alícuota del producto de PCR se digirió con la endonucleasa *Bam*H I y se clonó en la construcción resultante de la ligación anterior previamente digerida con *Bam*H I y *Hpa* I, quedando insertada en la orientación opuesta a la del primer paso. Tras los dos pasos de clonación se obtuvo un plásmido denominado pGRV12.

Un segundo plásmido se construyó para poder realizar el doble silenciamiento del gen de la dUTPasa y de la UNG de *T. brucei*. Para ello era necesario modificar el marcador de selección de la transfección. Los plásmidos generados a partir del vector pGR19 presentan como marcador de selección la resistencia al antibiótico higromicina. En el nuevo plásmido el marcador de selección será frente al antibiótico blasticidina. En primer lugar, el plásmido pGRV12 se digirió con *Hind* III liberándose un fragmento de DNA que contiene el fragmento del gen de la UNG utilizado para el RNAi clonado en ambos sentidos separados por la secuencia “stuffer”. Paralelamente, el plásmido

utilizado para la construcción del pHD1337 denominado pHD1336 (no publicado) fue digerido con la misma enzima de restricción. A continuación ambos fragmentos de DNA se ligaron rindiendo un plásmido denominado pGRV14.

B.II.6.8.2. Estudio del efecto del RNAi de la UNG sobre el crecimiento celular

La inducción del RNAi y el análisis posterior se hizo en las mismas condiciones que las descritas en el apartado B.II.6.2 para la inducción del RNAi de la dUTPasa.

En el caso del RNAi de la UNG las líneas celulares estudiadas fueron *T. brucei* S16 pGRV12 y *T. brucei* 449 pGRV12 de la forma sanguínea y procíclica respectivamente.

B.II.6.8.3. Estudio del efecto del doble RNAi de la dUTPasa y UNG sobre el crecimiento celular y ciclo celular de *Trypanosoma brucei*

El estudio se realizó mediante un seguimiento del perfil de crecimiento de la misma manera que en los casos anteriores del RNAi de la dUTPasa y UNG, el cual se describe en detalle en el apartado B.II.6.2.

La transfección estable con el plásmido pGRV14 se realizó con las líneas celulares que expresan RNA de doble cadena para la dUTPasa tanto de la forma sanguínea como de la procíclica, *T. brucei* S16 pGRV6 y *T. brucei* 449 pGRV6 respectivamente, obteniéndose las siguientes líneas celulares: *T. brucei* S16 pGRV6.14 y *T. brucei* 449 pGRV6.14.

De nuevo, tanto la inducción del RNAi como el análisis posterior se realizó en las mismas condiciones que las descritas en el apartado B.II.6.2.

El efecto sobre el ciclo celular se analizó mediante citometría de flujo con la línea celular *T. brucei* 449 pGRV6.14 en las mismas condiciones que en el caso del RNAi de la dUTPasa descrito en el apartado B.II.6.6.

OBJETIVOS

C. OBJETIVOS

La generación de variabilidad genética en parásitos protozoos es enorme y constituye un elemento fundamental para asegurar su supervivencia. Procesos como la variación antigénica, el polimorfismo alélico y la alta frecuencia de mutación y recombinación son esenciales para asegurar la supervivencia de estos organismos en el interior de su hospedador. Una fuente importante de mutación en todos los organismos estudiados es la presencia de uracilo en el genoma.

El uracilo no es un componente usual del DNA pero se encuentra con una baja frecuencia como resultado de la desaminación de la citosina y de la utilización de dUTP por parte de la DNA polimerasa durante la replicación. Como base errónea es eliminada mediante los mecanismos de reparación que actúan específicamente eliminando residuos de uracilo. Si se da la circunstancia de que la cantidad de dUTP aumenta por encima de determinados niveles, se facilita la incorporación masiva de uracilo al DNA lo que conlleva la formación de roturas de doble hebra, fragmentación de DNA y la muerte celular. La enzima desoxiuridina 5'-trifosfato nucleótido hidrolasa (dUTPasa), (EC 3.6.1.23) degrada el dUTP dando lugar a dUMP y PPi y tiene como función primordial eliminar el dUTP que se genera en el metabolismo celular y proveer la célula de dUMP para la síntesis de dTMP. Sin embargo, hay que tener en cuenta que una incorporación controlada de uracilo puede ser ventajosa en determinadas situaciones pues promueve la recombinación y la variabilidad genética lo que puede tener implicaciones desde el punto de vista adaptativo y biológico. Una serie de observaciones recientes han demostrado que la presencia de uracilo en el DNA tiene un papel central en la hipermutación somática y es esencial para el ciclo de vida de determinados virus.

El objetivo de esta Tesis Doctoral es profundizar en el papel de la dUTPasa en la inserción de uracilo en el DNA y en la integridad celular en tripanosomátidos. Hemos desarrollado estos estudios en *Trypanosoma brucei* ya que técnicas que permiten la manipulación genética mediante RNAi y el estudio de esencialidad de genes están desarrollados en este organismo.

Los objetivos principales son:

1. Caracterización de la dUTPasa recombinante de *Trypanosoma brucei* así como la determinación de sus propiedades cinéticas.
2. Establecimiento de la localización intracelular de la dUTPasa de *Trypanosoma brucei*.
3. Identificación de las consecuencias de la depleción de la actividad dUTPasa mediante RNAi sobre la proliferación celular y el contenido de dUTP.
4. Establecer el papel de la dUTPasa en el ciclo celular de *Trypanosoma brucei*.
5. Caracterizar la relación de la dUTPasa con enzimas implicadas en la reparación de DNA por escisión de bases.

RESULTADOS

D. RESULTADOS

D.I. AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DEL GEN DE LA DESOXIURIDINA 5'-TRIFOSFATO NUCLEÓTIDO HIDROLASA DE *Trypanosoma brucei*

D.I.1. Aislamiento del gen *TbDUT*

La secuencia codificante de la dUTPasa de *Trypanosoma brucei* se amplificó mediante PCR a partir de DNA genómico de la línea celular *T. brucei* 427. Los oligonucleótidos utilizados en la reacción (*TbDUT* start, *TbDUT* stop) fueron diseñados a partir de la secuencia del gen *DUT* depositada en la base de datos GeneDB (Tb927.7.5160) y sintetizados en los Servicios Técnicos del Instituto de Parasitología y Biomedicina “López-Neyra”. En los extremos 5’ de los oligonucleótidos se introdujeron los sitios de restricción *Nde* I (*TbDUT* start) y *Bam*H I (*TbDUT*stop) para la posterior clonación en el sistema de expresión pET. El producto de la amplificación por PCR de 864 pares de bases se purificó y se analizó en geles de agarosa al 1% (Figura D.I.1).

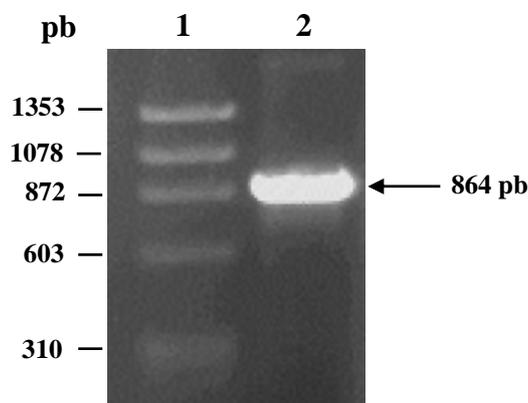


Figura D.I.1. Electroforesis en agarosa 1%. 1) Marcadores de DNA. 2) Sonda homóloga amplificada por PCR a partir de DNA genómico de *T. brucei* 427, utilizando los oligonucleótidos *TbDUT* start y *TbDUT* stop (Tabla B.II.).

El fragmento obtenido del tamaño esperado se clonó en el vector pGEM-T[®] (*Promega*), para dar el plásmido pGEMTBDUT. Esta construcción se utilizó para comprobar por secuenciación el fragmento de DNA amplificado, utilizando los oligonucleótidos T7 y SP6. La secuencia mostró dos cambios de aminoácidos respecto a

la secuencia de la dUTPasa de la cepa de *T. brucei* 927 (Tb927.7.5160) depositada en la base de datos, A48T y D248E. Estos cambios fueron corroborados en diferentes amplificaciones realizadas con la Pwo DNA polimerasa que presenta una mayor fidelidad y por tanto corresponden a diferencias con la cepa de *T. brucei* utilizada en la secuenciación del genoma de este parásito.

D.II. EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA RECOMBINANTE dUTPasa DE *Trypanosoma brucei* EN EL SISTEMA HETERÓLOGO *E. coli*

D.II.1. Construcción del sistema de expresión

El sistema de expresión pET está basado en la transcripción de genes por parte de la enzima T7 RNA polimerasa (Studier y Moffatt, 1986). La secuencia del gen que codifica la proteína de interés es clonada a continuación de la secuencia promotora de la enzima T7 RNA polimerasa y esta construcción es transformada en cepas de *E. coli* que contienen en su genoma una copia del gen que codifica esta enzima. La transcripción del gen de la T7 RNA polimerasa es inducible por IPTG, ya que en estas células se encuentra reprimida por medio de la secuencia reguladora *lac*. La adición de IPTG permite el inicio de la transcripción y la posterior expresión de la enzima T7 RNA polimerasa, la cual inicia a su vez la transcripción del gen de interés.

Para desarrollar un sistema de expresión se empleó el vector pET11-c de la serie pET de Novagen, en el que se introdujo la secuencia codificante *TbdUTPasa*, con el fin de obtener proteína recombinante soluble.

En primer lugar, el plásmido pGEMTBDUT se digirió con las enzimas de restricción *Nde* I y *Bam*H I, liberándose el fragmento correspondiente al gen *TbdUT*. A continuación, el inserto liberado se ligó en el vector pET11-c, previamente digerido con las mismas endonucleasas y defosforilado con fosfatasa alcalina. El plásmido resultante denominado pETTBDUT, fue propagado en *E. coli* XL1Blue y secuenciado con los oligonucleótidos T7 y T7 terminator para descartar errores en la reacción de ligación.

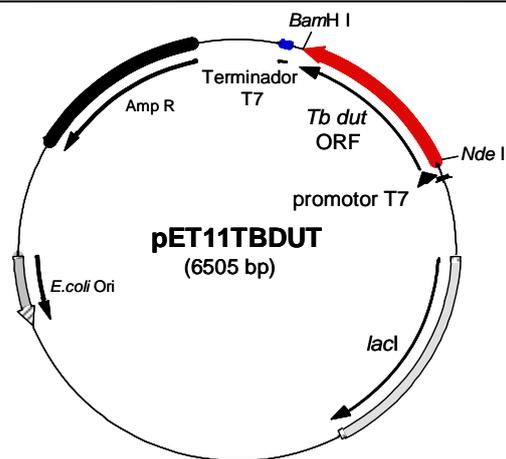


Figura D.II.1. Plásmido de expresión pETTBDUT.

Para sobreexpresar la proteína recombinante se transformaron bacterias *E. coli* BL21(DE3), la cual presenta una copia lisogénica del gen que codifica para la T7 RNA polimerasa y cuya expresión se encuentra bajo el control del promotor T7lac, con el plásmido pETTBDUT. La inducción de la dUTPasa se llevó a cabo con IPTG a una concentración final de 1 mM a 37°C, y se recogieron muestras a distintos tiempos (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 24). En las condiciones experimentales ensayadas pudimos observar una elevada sobreexpresión de la enzima recombinante en los extractos solubles a partir de la primera hora, alcanzándose un máximo de sobreexpresión a las cuatro horas (Figura D.II.2).

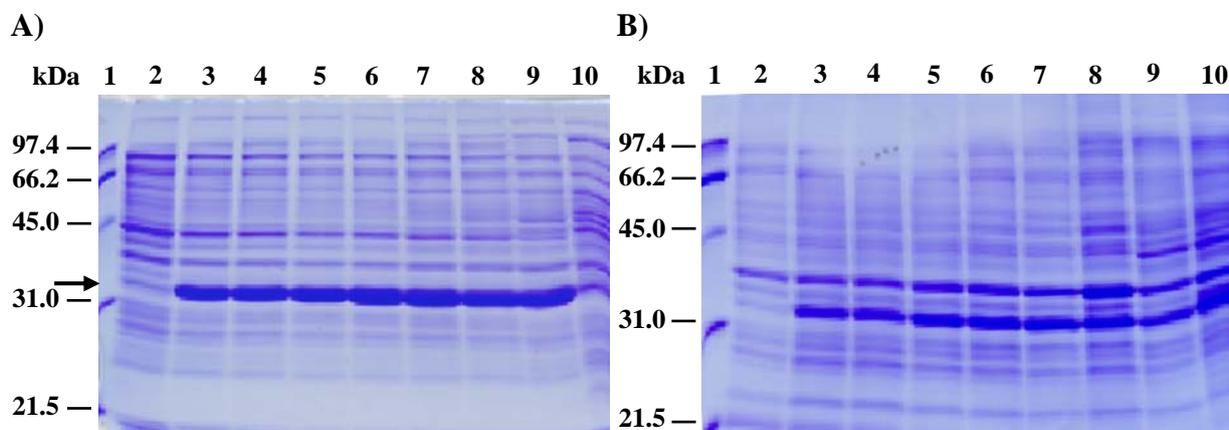


Figura D.II.2 Sobreexpresión de la proteína *Tbd*UTPasa en *E. coli* BL21 (DE3). La inducción se llevó a cabo a 37°C con IPTG 1 mM. A) Gel SDS-PAGE correspondiente a extractos solubles: (1) marcadores de peso molecular; (2) bacterias *E. coli* BL21 (DE3) transformadas con pETTBDUT en ausencia de IPTG; (3), (4), (5), (6), (7), (8), (9) y (10) bacterias *E. coli* BL21 (DE3) transformadas con el plásmido pETTBDUT, inducidas con IPTG durante 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 y 24 h respectivamente. B) Gel SDS-PAGE correspondiente a los cuerpos de inclusión, los carriles se corresponden con las muestras de la fracción soluble. La proteína *Tbd*UTPasa sobreexpresada migra con un tamaño aproximado de 32 kDa y aparece señalada con una flecha.

D.III. PURIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN CINÉTICA DE LA dUTPasa DE *Trypanosoma brucei*

D.III.1. Purificación de la proteína recombinante *TbdUTPasa*

La purificación de la enzima se llevó a cabo a partir de células *E. coli* BL21 (DE3) transformadas con el plásmido pETTBDUT e inducidas durante 4 horas con 1mM de IPTG como se indica en el apartado B.II.3.2.1 de Materiales y Métodos.

La purificación de la proteína se realizó en dos pasos cromatográficos durante los cuales se realizó un seguimiento de la proteína mediante geles desnaturalizantes SDS-PAGE (Figura D.III.1). En todas las soluciones utilizadas en el proceso fue necesaria la adición de fenil metil sulfonil fluoruro (PMSF) para prevenir una degradación proteolítica de la enzima.

En primer lugar, la cromatografía de adsorción en resina de hidroxiapatito se realizó a pH 7.0 y la elución de las proteínas se consiguió mediante la aplicación de un gradiente lineal de un tampón fosfato (20-200 mM), eluyendo la mayoría de la dUTPasa entre 85-120 mM de tampón fosfato. Las fracciones con una alta concentración de dUTPasa se unieron, la mezcla se concentró y se cambió el tampón como paso previo para el segundo paso cromatográfico. La muestra de proteínas se cargó en una columna MonoQ[®] HR 5/5, en la cual la cromatografía tiene lugar por intercambio aniónico y la elución de la proteína se realiza por la aplicación de un gradiente lineal de NaCl.

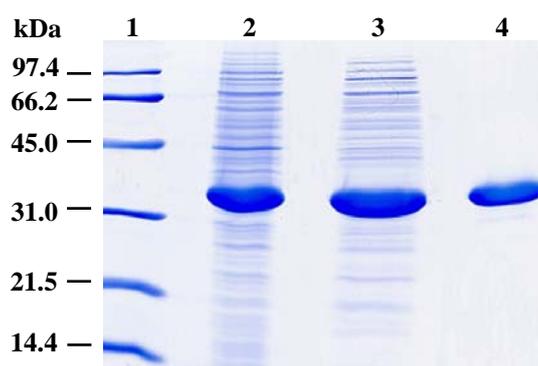


Figura D.III.1. Purificación de la dUTPasa recombinante de *T. brucei* sobreexpresada en *E. coli* BL21 (DE3). SDS-PAGE al 12% teñido con azul de Coomassie-R250. 1) marcadores de peso molecular; 2) extracto soluble BL21(DE3)- pETTBDUT inducido con 1mM de IPTG durante 4 horas; 3) fracción obtenida de la cromatografía de hidroxiapatito; 4) fracción obtenida de la cromatografía de intercambio aniónico con MonoQ[®] HR 5/5 en un sistema de cromatografía líquida de alta resolución ÄKTA.

D.III.2. Determinación cuantitativa de la actividad *TbdUTPasa*

La determinación de la actividad dUTPasa así como la caracterización cinética de la proteína recombinante *TbdUTPasa*, se llevó a cabo mediante el método espectrofotométrico descrito por Larsson y colaboradores (Larsson *et al.*, 1996), el cual consiste en la determinación de la variación de absorbancia que tiene lugar por la liberación de protones acoplada a la reacción de hidrólisis del dUTP mediada por la dUTPasa. En las condiciones donde se cumplan las premisas detalladas en el apartado B.II.3.4.1 de Materiales y Métodos, se puede cuantificar la cantidad de producto existente en cada momento, a partir del cual y aplicando la ecuación integrada de Michaelis-Menten se pueden calcular los valores de constantes cinéticas. A partir de los valores de actividad específica se ha calculado el grado de purificación y el rendimiento obtenidos en cada paso cromatográfico (Tabla D.III.1). Después de la cromatografía en columna de hidroxapatito y del intercambio aniónico se consiguió un grado de purificación de 1.52 veces con un rendimiento del 44.8 %.

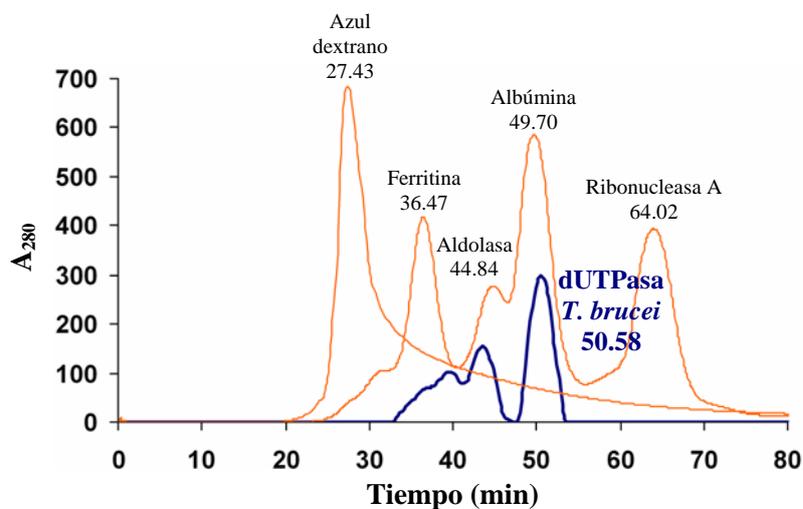
<i>Paso de purificación</i>	<i>Proteínas totales (mg)</i>	<i>Actividad específica ($\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$)</i>	<i>Actividad total ($\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}$)</i>	<i>Grado de purificación</i>	<i>Rendimiento (%)</i>
Extracto soluble	390.4	14.39	5617.86	1.0	100
Hidroxapatito	191.0	21.22	4053.02	1.47	72.1
MonoQ [®] HR 5/5	114.78	21.93	2517.26	1.52	44.8

Tabla D.III.1. Purificación de la dUTPasa recombinante de *T. brucei*. Datos relativos a la purificación a partir de 2 litro de cultivo de *E. coli* BL21 (DE3)-pETTBdUT.

D.III.3. Determinación de la masa molecular de la proteína nativa.

Para determinar la masa molecular de la proteína nativa recombinante se ha utilizado una columna de filtración en gel o exclusión molecular Superdex™-200 HR 10/30. En primer lugar se determinaron los tiempos de retención de las proteínas patrón de masa molecular conocida y posteriormente el de la proteína recombinante.

A)



B)

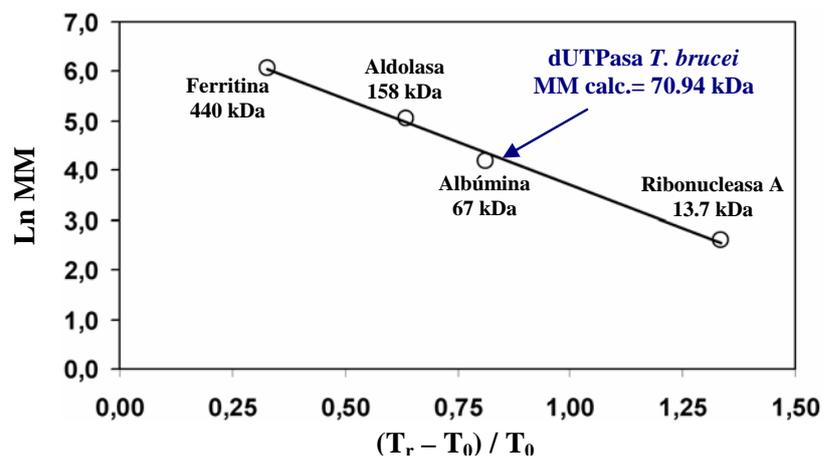


Figura D.III.2. Determinación de la masa molecular de la dUTPasa nativa de *T. brucei*. A) Cromatograma de la separación en una columna de exclusión molecular muestra la elución de la dUTPasa entre la elución de la aldolasa y la albúmina. B) Curva de calibrado obtenida a partir del cromatograma de las proteínas estándar: T_0 , es el tiempo de retención del azul dextrano; T_r , corresponde al tiempo de retención de cada una de las proteínas estándar.

La masa molecular correspondiente a la dUTPasa de *T. brucei*, deducida a partir de su secuencia de aminoácidos es de 31987.1 Da, la cual está de acuerdo con la observada en SDS-PAGE. En la figura D.III.2.A, podemos apreciar que el pico de elución correspondiente a la enzima dUTPasa de *T. brucei* aparece entre los picos de elución correspondientes a la aldolasa y la albúmina con un tiempo de retención de 50.58 min. A partir de los tiempos de retención de las proteínas estándar y el logaritmo de la masa molecular de cada una de ellas, se obtuvo una recta patrón que permitió determinar que la masa molecular aparente de la dUTPasa de *T. brucei* es de 70.94 kDa (Figura D.III.2.B). Este resultado demuestra que la enzima de *T. brucei* es un dímero en condiciones nativas.

D.III.4. Determinación de K_m y V_{max} para el dUTP y dUDP. Inhibición por producto: K_i para el dUMP

La actividad dUTPasa se puede medir directamente utilizando un método espectrofotométrico continuo, el cual permite la obtención de curvas de hidrólisis de dUTP (Larsson *et al.*, 1996). Básicamente, el método consiste en llevar a cabo la reacción en un medio débilmente tamponado y en presencia de un indicador ácido-base. La liberación de protones ligada al proceso de hidrólisis de dUTP genera una variación de color en el indicador que es detectada espectrofotométricamente.

A partir de esta curva se puede obtener información mediante la aplicación de la ecuación integrada de Michaelis-Menten. De esta forma se obtiene un valor de K_m y V_{max} a partir de una única medida de la reacción.

$$\frac{[P]_t}{t} = V_{max} - \frac{K_{map}}{t} \text{Ln} \frac{[S]_0}{[S]_0 - [P]_t}$$

Ecuación integrada de Michaelis-Menten

En la figura D.III.3 se muestra como ejemplo una curva obtenida con el método espectrométrico continuo a una concentración inicial de dUTP de 50 μM y su ajuste a la ecuación integrada de Michaelis-Menten.

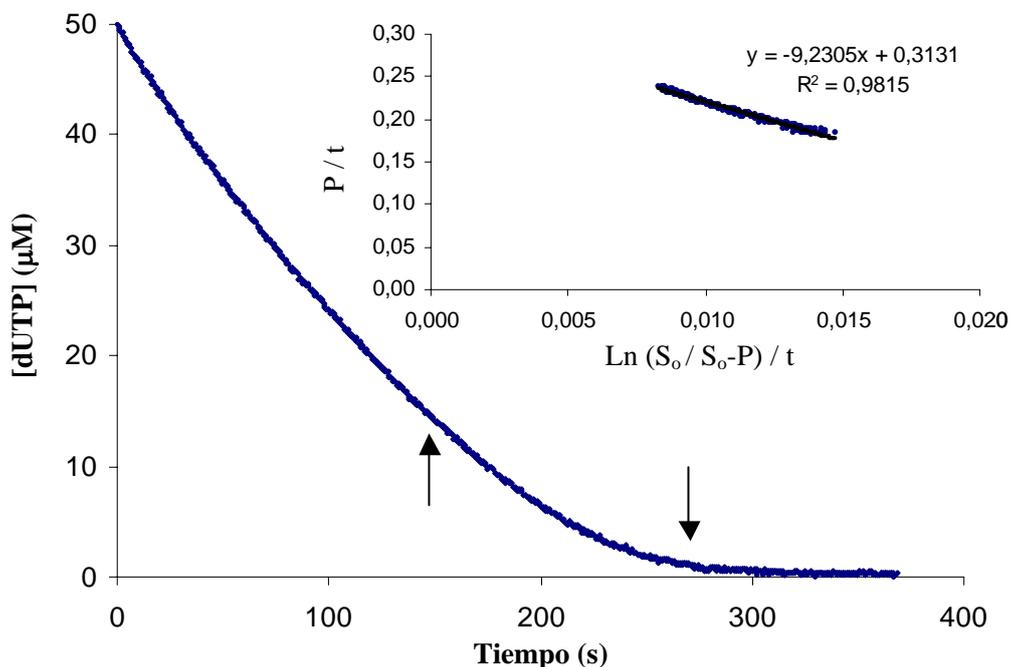


Figura D.III.3. Hidrólisis continua detectada por el método espectrofotométrico. Las flechas indican los puntos entre los que se aplica la ecuación integrada de Michaelis-Menten. La gráfica superpuesta muestra el ajuste de la porción de la curva integrada. La reacción se realizó a pH 7.8 y 25°C con una concentración final de enzima de 30 nM.

El análisis de la curva de hidrólisis mediante la ecuación integrada de Michaelis-Menten da lugar a una recta, cuyo valor de pendiente y ordenada en el origen corresponden a los valores de K_m y V_{max} respectivamente.

La existencia de una inhibición por producto, en concreto por el dUMP, hace que el valor de K_{map} (Tabla D.III.2) aumente a medida que se incrementa la concentración inicial de dUTP para una misma concentración de enzima, mientras que la V_{max} permanece constante.

[dUTP] (μM)	K_{map} (μM)
5.0	2.3 ± 0.7
10.0	3.3 ± 0.4
15.0	3.4 ± 0.2
25.0	5.1 ± 0.7
35.0	5.5 ± 0.7
50.0	7.8 ± 0.8
100.0	13.0 ± 1.0
150.0	18.4 ± 1.3

Tabla D.III.2. Valores de K_{map} para distintas concentraciones iniciales de dUTP. Los valores corresponden a la media de 10 reacciones llevadas a cabo a pH 7.8, 25°C, 50 mM de MgCl₂ y 30 nM de enzima. La relación tampón/indicador (bicina/rojo de cresol) fue 1750/50 μM.

En estos casos de inhibición por producto, la ecuación integrada de Michaelis-Menten adopta una forma más compleja y la K_m real se calcula a partir de los valores de K_m aparente observados.

$$\frac{[P]_t}{t} = \frac{V_{max}}{(1-K_m) / K_{ip}} - \frac{K_{map}}{t} \text{Ln} \frac{[S]_0}{[S]_0 - [P]_t}$$

La representación de los distintos valores de K_{map} frente a las concentraciones iniciales de sustrato da lugar a una recta de cuya ecuación se obtienen los valores de K_m real y constante de inhibición por el producto (K_{ip}) (Segel, 1975) (Figura D.III.3) .

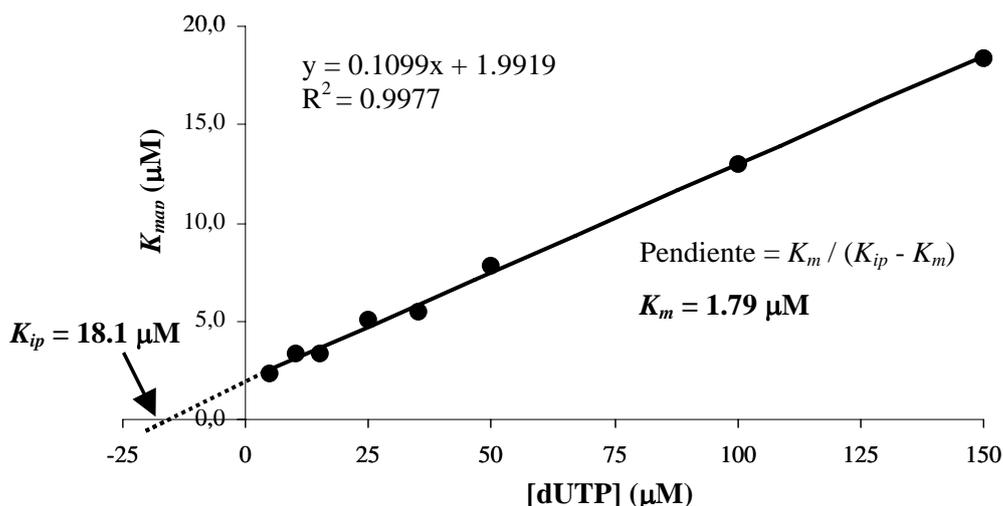


Figura D.III.3. Cálculo del valor de K_m real para el dUTP y K_{ip} para el dUMP. La representación de los distintos valores de K_{map} frente a las concentraciones de dUTP se ajustan a una línea recta a partir de la cual se obtienen el valor real de K_m y K_{ip} para el producto.

La dUTPasa de *T. brucei* presenta un valor de K_m real para el dUTP de 1.79 μM , así como un valor de K_{ip} para el dUMP de 18.1 μM .

A partir del valor de V_{max} se puede hacer una estimación de la constante catalítica (k_{cat}). Para la estimación de la k_{cat} se ha asumido que la enzima tiene dos sitios activos por unidad dimérica y el cálculo de la concentración final de enzima corresponde a concentración molar de sitios activos. Con estas premisas se obtuvo un valor de k_{cat} de $9.7 \pm 1.3 \text{ s}^{-1}$ y una constante de especificidad (k_{cat} / K_m) de $5.4 \times 10^6 \text{ s}^{-1} \cdot \text{M}^{-1}$.

Una característica específica de las dUTPasas diméricas, es la capacidad de utilizar el dUDP como sustrato a diferencia de lo que ocurre con las dUTPasas triméricas, donde el dUDP actúa como un potente inhibidor competitivo del dUTP (Larsson *et al.*, 1996).

Como el análisis del comportamiento cinético de la enzima para el dUDP puso de manifiesto, al igual que para la hidrólisis del dUTP, una significativa inhibición por producto, la determinación de las constantes cinéticas se llevó a cabo de la misma manera que en el caso del dUTP.

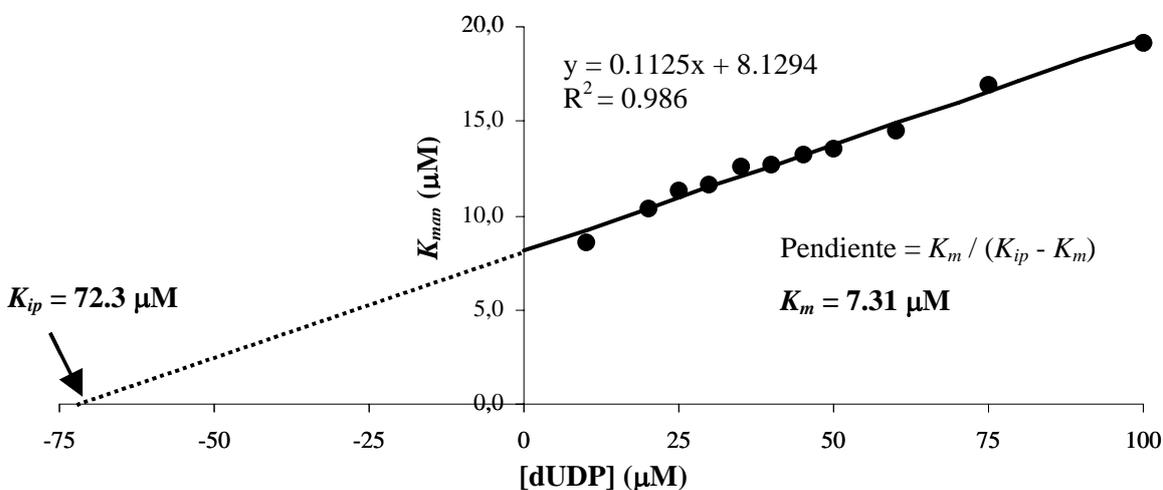


Figura D.III.4. Cálculo del valor de K_m real para el dUDP y K_{ip} para el dUMP. La representación de los distintos valores de K_{mapp} frente a las concentraciones de dUTP se ajustan a una línea recta a partir de la cual se obtienen el valor de K_m real y K_{ip} para el producto.

Los valores de K_m real para el dUDP y de K_{ip} para el dUMP obtenidas en este caso fueron de 7.31 μM y 72.3 μM respectivamente. Por otro lado, la estimación de k_{cat} para este nucleótido fue de $9.7 \pm 1.7 \text{ s}^{-1}$, con una constante de especificidad de $1.3 \times 10^6 \text{ s}^{-1} \cdot \text{M}^{-1}$.

Comparando la cinética de hidrólisis de ambos nucleótidos, se puede apreciar que la enzima tiene ligeramente mayor afinidad por el nucleótido trifosfato, pero sin embargo la reacción de hidrólisis tiene la misma V_{max} en ambos casos.

D.III.5. Efecto del ión divalente: requerimiento de magnesio

La reacción de hidrólisis del dUTP por medio de la dUTPasa es un proceso que precisa de la presencia de un catión divalente en el medio. Generalmente, este papel lo desarrolla el magnesio, si bien otros cationes divalentes son capaces de sustituirle en esta función.

Se llevó a cabo un estudio de la hidrólisis de dUTP por la dUTPasa de *T. brucei* en presencia de distintos iones divalentes a una concentración final de 5 mM. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla D.III.3.

Entre los iones ensayados, la hidrólisis en presencia de calcio no tiene lugar. Por el contrario, la dUTPasa es capaz de hidrolizar el sustrato en presencia tanto de cobalto como de manganeso, aunque la K_{map} aumenta en ambos iones respecto al magnesio sin existir variación en la V_{max} .

Catión	K_{map} (μM)	A_e ($\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$)
Mg^{2+}	1.58	11.2
Mn^{2+}	4.17	7.34
Co^{2+}	4.06	4.23
Ca^{2+}	-	-

Tabla D.III.3. Influencia de distintos cationes sobre los valores de K_m y V_{max} .

Los cationes utilizados corresponden a sus sales correspondientes en forma de cloruros. Las condiciones de reacción fueron: dUTP 25 μM , dUTPasa 30 nM, pH 7.8 y 25°C.

Hay que destacar que el cambio de pH durante la reacción es diferente según el ión divalente presente, debido a que se produce un incremento de absorbancia total

distinto en cada caso. Esta observación sugiere que la naturaleza del ión repercute en el número de protones liberados como consecuencia de la hidrólisis del dUTP.

Se llevó a cabo un estudio del requerimiento de magnesio por parte de la dUTPasa para determinar a que concentración la enzima presenta la mayor actividad. Para ello se llevaron a cabo reacciones variando la concentración final de magnesio desde 0.5 hasta 200 mM. En la figura D.III.5 se muestra la representación de la actividad específica ($\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$) en función de la concentración de magnesio. En ausencia de magnesio no tiene lugar la hidrólisis, mientras que a medida que aumenta la concentración del ión se produce un aumento en la actividad hasta alcanzar un máximo a una concentración final de 50 mM.

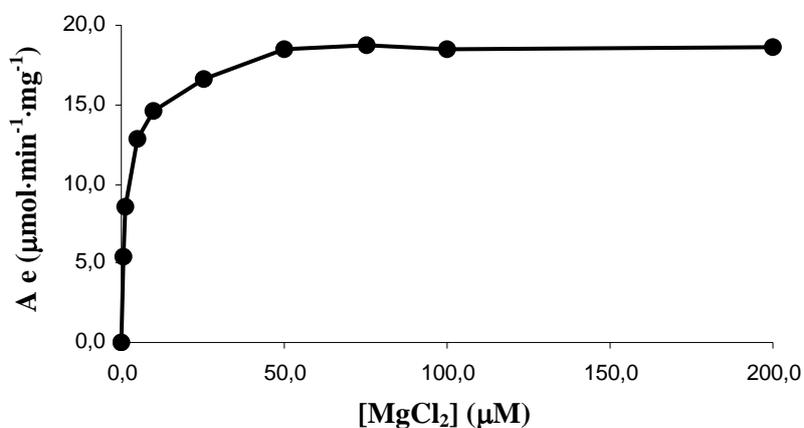


Figura D.III.5. Efecto del magnesio sobre la actividad específica de la dUTPasa. Las reacciones se realizaron en unas condiciones de: dUTP 50 μM , dUTPasa 30 nM, pH 7.8 y 25°C. Cada punto corresponde a un valor medio de 3 reacciones independientes.

D.III.6. Estudio de la especificidad de sustrato

Una característica primordial de las distintas clases de dUTPasas es que deben presentar una elevada especificidad de sustrato, ya que es una de las enzimas encargadas de la eliminación de nucleótidos no-canónicos. En el caso de las dUTPasas diméricas, tanto el dUDP como el dUTP son hidrolizados eficientemente. Se ha evaluado la capacidad de hidrólisis de otros nucleósidos y desoxirribonucleósidos trifosfato por parte de la enzima de *T. brucei*. Como sustratos se utilizaron los diferentes desoxirribonucleósidos trifosfato (dTTP, dATP, dCTP y dGTP) y el UTP. Los resultados se muestran en la figura D.III.6.

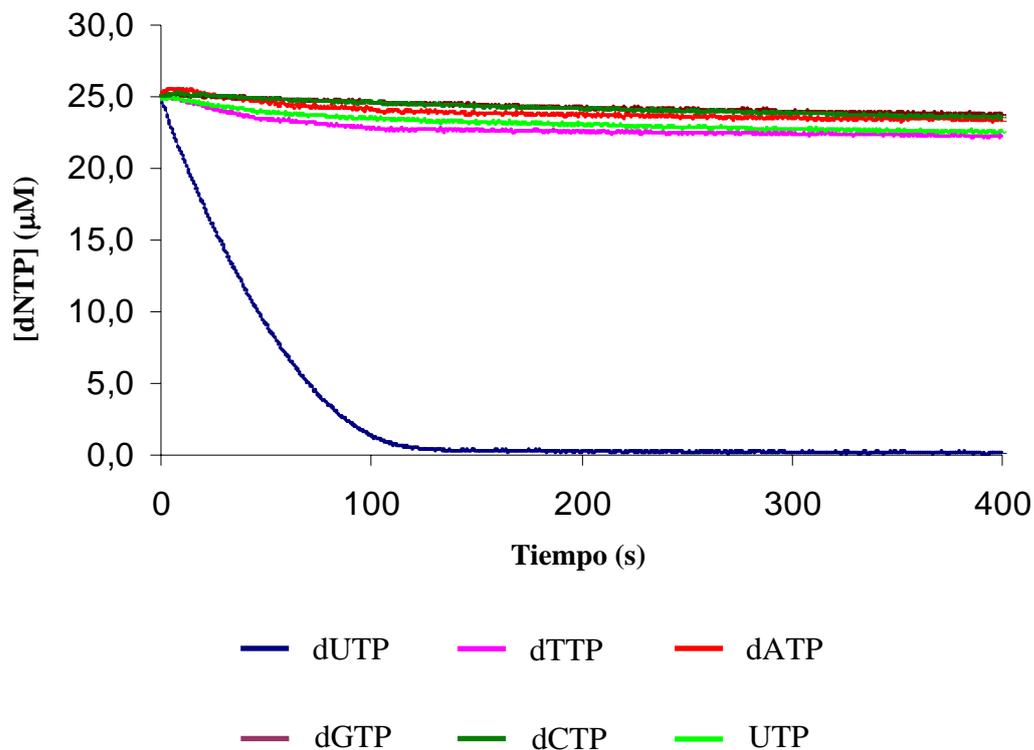


Figura D.III.6. Especificidad de sustrato de la dUTPasa de *T. brucei*. Se muestran las curvas de variación de la absorbancia con el tiempo para cada sustrato utilizado. Las reacciones se realizaron utilizando una concentración de sustrato de 25 µM y de dUTPasa 30 nM a pH 7.8 y 25°C.

Como se puede ver en el caso del UTP, el cual difiere con el dUTP únicamente en un grupo hidroxilo en el carbono 2' del azúcar, no se aprecia hidrólisis del nucleótido lo que demuestra que la enzima discrimina eficientemente la agrupación ribosa de la desoxirribosa. Tampoco se aprecia una hidrólisis significativa de otros desoxirribonucleósidos trifosfato.

Como conclusión, este estudio demuestra que la dUTPasa de *T. brucei* presenta la capacidad de discriminar tanto el grupo de azúcar como la base que esté formando el nucleótido. Sin embargo, es capaz de utilizar como sustrato tanto el nucleósido difosfato como el trifosfato de uracilo.

D.IV. LOCALIZACION INTRACELULAR DE LA dUTPasa DE *Trypanosoma brucei*

D.IV.1. Obtención de anticuerpos policlonales frente a la dUTPasa de *T. brucei*

La disponibilidad de proteína recombinante purificada a homogeneidad permitió la obtención de anticuerpos policlonales específicos para su utilización en estudios de localización subcelular y de la modulación de la expresión tanto en tripomastigotes de la forma sanguínea como de la procíclica de *T. brucei* mediante el silenciamiento génico del gen *DUT*.

D.IV.1.1. Estudio de la especificidad del anticuerpo anti-*Tbd*UTPasa mediante *western blot*

En primer lugar se determinó el grado de especificidad del anticuerpo policlonal, para lo cual se realizaron *western blots* con extractos de parásitos (forma sanguínea y procíclica) y con la proteína recombinante pura. Como controles, en el *western blot* además del anticuerpo frente a la dUTPasa de *T. brucei* se utilizaron el suero preinmune y el anticuerpo secundario anti-IgG de conejo conjugado con peroxidasa. Además se realizó un ensayo de saturación del anticuerpo con proteína recombinante pura previo a la inmunodetección.

La obtención de extractos totales de parásitos se detalla en el apartado B.II.1.1.5 de Materiales y Métodos, y se utilizaron 2.5×10^6 células por muestra, mientras que para las muestras correspondientes a proteína recombinante pura se utilizó 10 ng.

El ensayo de saturación del anticuerpo se llevó a cabo mediante una incubación previa de 30 μ g de suero anti-*Tbd*UTPasa con 10 μ g dUTPasa recombinante pura durante toda la noche a 4°C en solución de bloqueo de proteínas (leche desnatada 5% (p/v), Tween[®] 20 0.1 % en PBS 1X). A continuación se centrifugó la solución a 16000 x g durante 15 min a 4°C, y el sobrenadante se utilizó para llevar a cabo la inmunodetección.

Como se puede ver en la figura D.IV.1, el anticuerpo anti-*Tbd*UTPasa reconoce la proteína recombinante pura. Cuando se lleva a cabo la inmunodetección tras el ensayo de saturación, el suero pierde la capacidad de reconocer la proteína. En el caso de las

muestras de extractos totales de parásitos, solamente se detecta una banda del tamaño correspondiente a la dUTPasa, la cual desaparece cuando previamente se lleva la incubación del suero con la proteína recombinante pura.

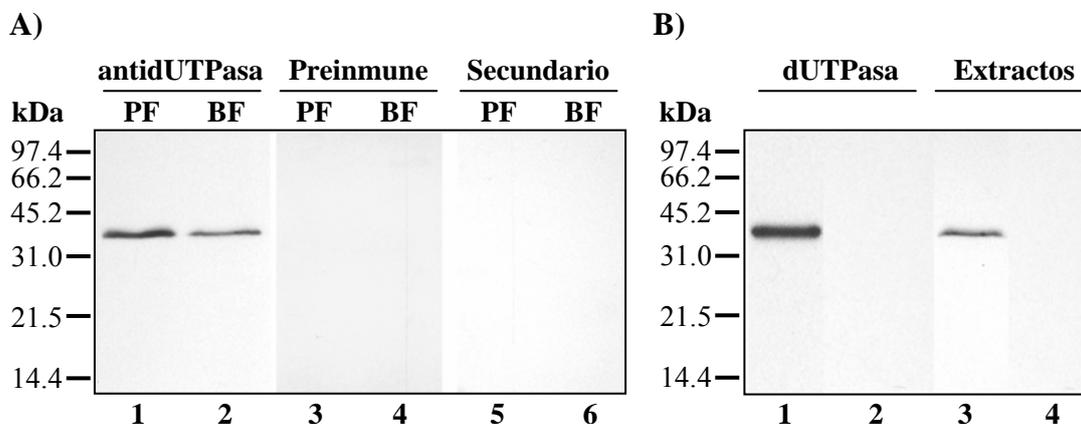


Figura D.IV.1. Especificidad del anticuerpo anti-*Tbd*UTPasa. La dilución de anticuerpo se optimizó a una dilución 1:75000. Extractos de parásitos compuestos por 2.5×10^6 células y 10 ng de dUTPasa recombinante pura. A) Extractos totales de parásitos: carriles 1, 3 y 5 formas procíclicas de *T. brucei* incubadas con suero anti-*Tbd*UTPasa, suero preinmune y anticuerpo secundario, respectivamente; carriles 2, 4 y 6 formas sanguíneas de *T. brucei* incubadas con suero anti-*Tbd*UTPasa, suero preinmune y anticuerpo secundario, respectivamente. B) Immunodetección post-incubación del suero anti-*Tbd*UTPasa con dUTPasa recombinante pura: carriles 1 y 3, sin preincubación de 10 ng de proteína pura recombinante y extractos totales de parásitos, respectivamente; carriles 2 y 4, preincubación de 10 ng de proteína pura recombinante y extractos totales de parásitos, respectivamente.

D.IV.1.2. Inmunofluorescencia

Se llevaron a cabo estudios de inmunofluorescencia indirecta para determinar donde se encuentra localizada la dUTPasa de *T. brucei* en la célula. Para ello se siguió el protocolo descrito en el apartado B.II.5.2 ensayando diluciones (1:500) y (1:1000) del anticuerpo policlonal anti-*Tbd*UTPasa y del suero preinmune utilizado como control. El anticuerpo anti-*Tbd*UTPasa se purificó frente a la dUTPasa purificada a homogeneidad. Como anticuerpo secundario se utilizó el anti-IgG de conejo conjugado con fluoresceína a una dilución de 1:500. Las preparaciones se visualizaron en un microscopio Zeiss

Axiophot de fluorescencia y en la figura D.IV.2 se muestra una de las fotografías obtenidas.

La tinción con DAPI, un colorante fluorescente que se une a cadenas de DNA, identifica tanto el DNA nuclear como el kinetoplasto (DNA mitocondrial). Como se puede observar, a diferencia de lo que ocurre en células de mamífero donde existen dos isoformas de dUTPasa localizadas en el núcleo y mitocondria (Ladner *et al.*, 1996), la dUTPasa de *T. brucei* presenta una clara localización nuclear y no se detecta fluorescencia asociada al kinetoplasto.

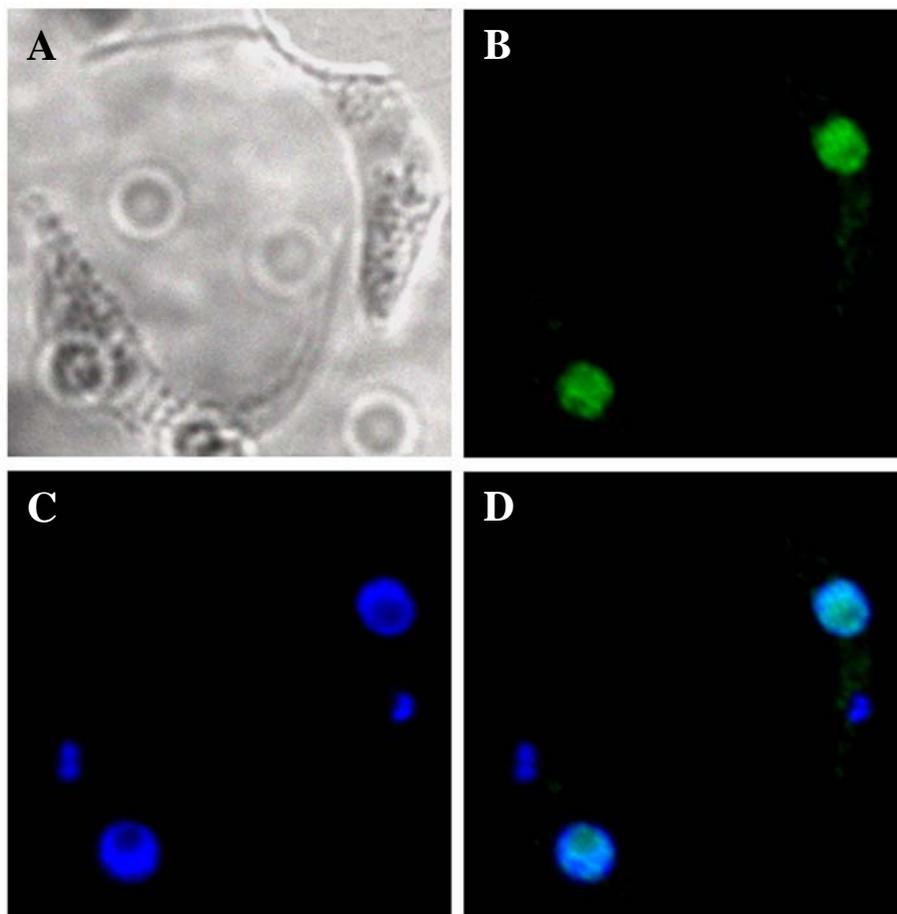


Figura D.IV.2. Inmunofluorescencia de formas procíclicas de *T. brucei* de la cepa salvaje (*T. brucei* 427). A) Contraste interdiferencial (DIC); B) anti-*TbdUTPasa* marcado con fluoresceína (FITC); C) fluorescencia correspondiente a DAPI; D) superposición de fluorescencia de fluoresceína y DAPI.

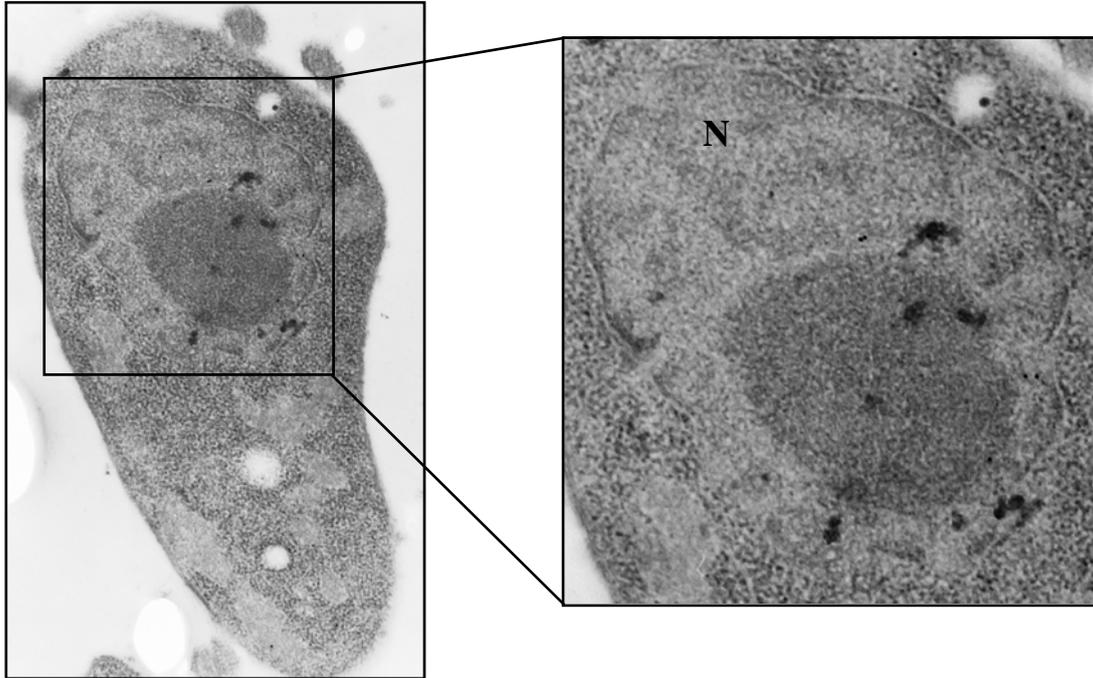
D.IV.1.3. Inmunocitoquímica y observación mediante microscopía electrónica de transmisión

La localización intracelular de la dUTPasa se estableció adicionalmente mediante inmunomicroscopía electrónica. El procedimiento seguido para la detección de la proteína se detalla en el apartado B.II.5.1. Las muestras de tripomastigotes de la forma procíclica de *T. brucei* salvaje (427) se incubaron a temperatura ambiente durante 2 h con las diluciones 1:20, 1:50 y 1:100 del anticuerpo anti-*Tbd*UTPasa purificado. A continuación se trataron con diluciones (1:100) de anticuerpo secundario anti-IgG conjugado con partículas de oro de 10 nm de diámetro durante una hora a temperatura ambiente. Después de lavar las muestras se procedió al contraste y visualización del marcaje en el microscopio electrónico Zeiss. Paralelamente, como control se trataron muestras con suero preinmune como anticuerpo primario para comprobar que no presentaba marcación inespecífica.

Los resultados obtenidos se muestran en las figuras D.IV.3 y D.IV.4.A. En todos los casos, aunque no existe una marcación muy alta, se aprecia un patrón de acumulación de partículas de oro distribuido en el núcleo de la célula, ratificando los resultados obtenidos por inmunofluorescencia indirecta. Nuevamente, no se ha podido detectar marcación con oro coloidal en el kinetoplasto.

Los parásitos utilizados como control negativo, tratados con suero preinmune de conejo, aparecen en la figura D.IV.4.B.

A)



B)

C)

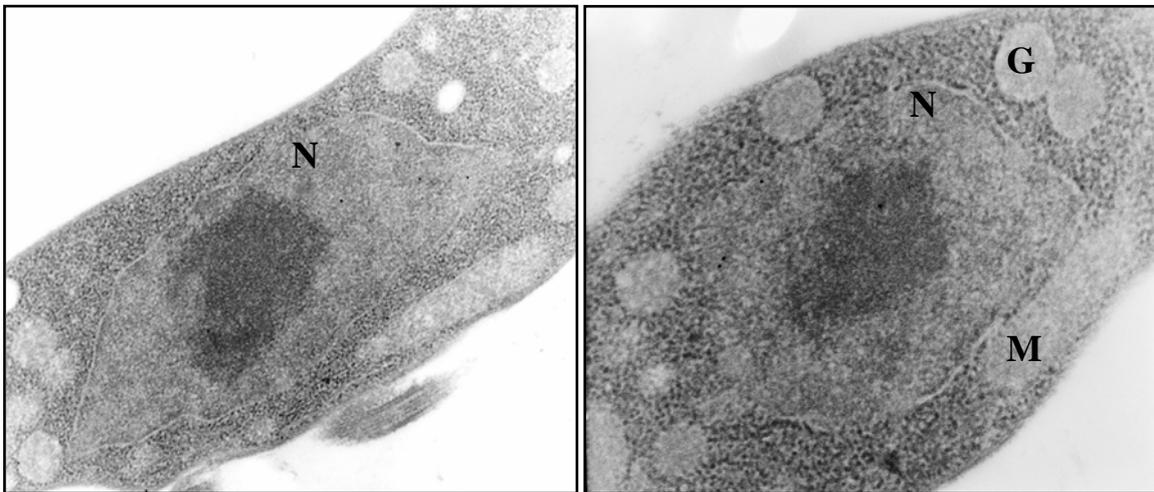
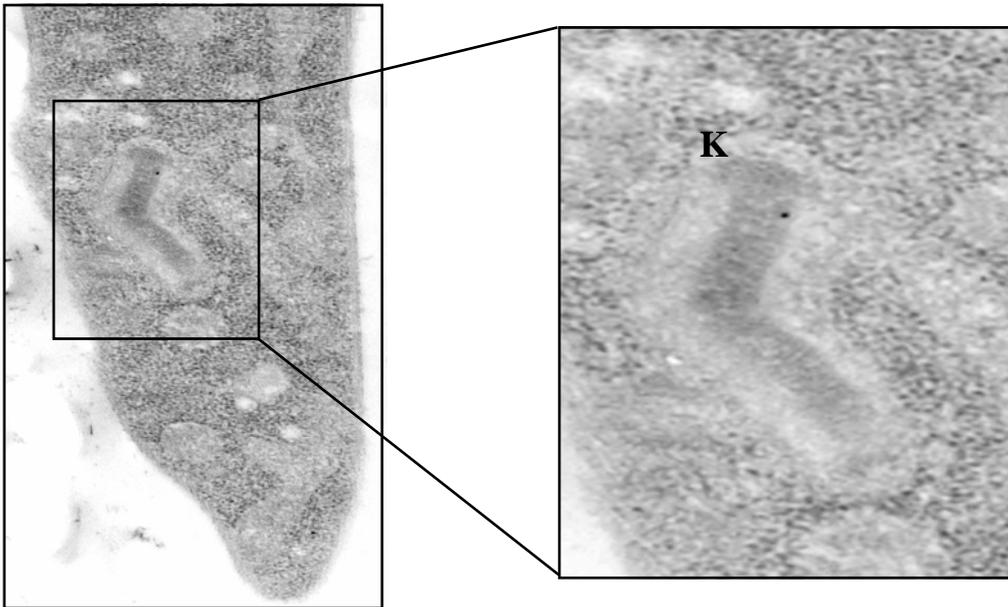


Figura D.IV.3. Microscopía electrónica de transmisión de secciones ultrafinas correspondientes a parásitos de la línea salvaje, *T. brucei* 427. Las células se inmunomarcaron con anticuerpo policlonal anti-*TbdUTPasa* diluido 100 veces (A) o 50 veces (B y C), seguido de anticuerpo anti-IgG de conejo conjugado con partículas de oro de 10 nm. A) x 25000; B) x 31500 y C) x 63000. N, núcleo; G, glicosoma; M, mitocondria.

A)



B)



Figura D.IV.4. Microscopía electrónica de transmisión de secciones ultrafinas correspondientes a parásitos de la línea salvaje, *T. brucei* 427. Las células se inmunomarcaron con anticuerpo policlonal anti-*TbdUTPasa* diluido 50 veces (A) o con suero preinmune diluido 100 veces (B), seguido de anticuerpo anti-IgG de conejo conjugado con partículas de oro de 10 nm. A) x 16000; B) x 20000. N, núcleo; K, kinetoplasto.

D.V. PAPEL DE LA dUTPasa DE *Trypanosoma brucei* EN PROLIFERACIÓN Y EL CICLO CELULAR

Con el fin de establecer la función de la dUTPasa en controlar los niveles de dUTP y la inserción de este nucleótido en el DNA, se ha utilizado la técnica de RNAi para producir el silenciamiento génico y estudiar las consecuencias de la depleción de los niveles de enzima sobre la proliferación y el ciclo celular tanto en tripomastigotes de la forma procíclica como de la forma sanguínea de *T. brucei*. El RNA de doble cadena que desencadena la degradación de la cadena de RNA mensajero se generó mediante dos estrategias: utilización de vectores que contienen promotores T7 enfrentados y producción de una estructura tallo-lazo o “stuffer”.

D.V.1. Construcción de plásmidos para el silenciamiento génico mediante RNAi

En el caso de la estrategia de los promotores enfrentados, la secuencia codificante del gen *DUT* de *T. brucei* se clonó en el vector p2T7 para dar el plásmido p2T7TBDUT. Este vector presenta dos promotores T7 en ambos sentidos por lo que tiene lugar la transcripción de ambas cadenas del fragmento, las cuales al ser complementarias hibridan formando la doble cadena de RNA que desencadena el proceso de silenciamiento.

En el caso de la estrategia de estructura tallo-lazo, un fragmento de 421 pares de bases, correspondiente a la posición 163 y 584 de la secuencia codificante de la dUTPasa, se clonó en ambos sentidos separados por una secuencia de DNA denominada “stuffer” en el vector pGR19 para dar el plásmido pGRV6. En este caso la transcripción tiene lugar a partir del promotor PARP, y sólo se transcribe una cadena del plásmido. Sin embargo, al estar clonado ambas cadenas en sentido opuesto se genera un RNA de doble cadena unido por la secuencia del “stuffer”, adoptando la estructura final de tallo-lazo.

En ambos casos estos vectores presentan dos características destacadas:

- Presentan operadores de tetraciclina, lo que hace que la transcripción sea inducible por tetraciclina o por un derivado como la doxiciclina, y permite controlar el inicio del fenómeno de silenciamiento.

- Presentan una secuencia denominada espaciador espaciador ribosomal de DNA, la cual se encuentra en una región del genoma del parásito que no sufre transcripción. Debido a esto, la integración de estos vectores tiene lugar de manera estable por un proceso de recombinación.

El procedimiento de construcción de ambos plásmidos se describe con detalle en el apartado B.II.6.1 de Materiales y Métodos. En la figura D.V.1 se muestra el esquema de los plásmidos señalando las características más destacadas, así como los sitios de clonación utilizados en la construcción de los plásmidos.

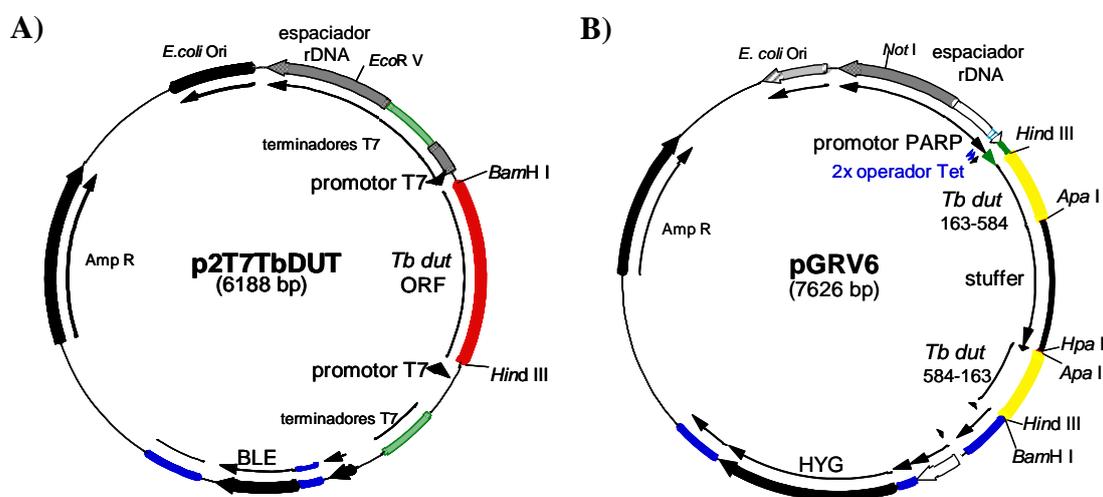


Figura D.V.1. Plásmidos de transfección p2T7TbDUT y pGRV6 para generar silenciamiento del gen *DUT* de *T. brucei*. A) p2T7TbDUT; B) pGRV6.

D.V.2. Transfección de *T. brucei*.

La transfección de células de *Trypanosoma brucei* se realizó mediante electroporación siguiendo las condiciones descritas en el apartado B.II.1.1.4 de Materiales y Métodos. El plásmido p2T7TbDUT se transfectó en las líneas celulares *T. brucei* S16 (forma sanguínea) y *T. brucei* 29-13 (forma procíclica), y el plásmido pGRV6 en *T. brucei* S16 (forma sanguínea) y *T. brucei* 449 (forma procíclica). La selección de los clones se realizó por dilución límite según las siguientes condiciones:

- Para el plásmido p2T7TbDUT, con fleomicina $2.5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ en *T. brucei* S16 y $1.0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ en *T. brucei* 29-13.

- Para el plásmido pGRV6, con higromicina $5.0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ en *T. brucei* S16 y $50.0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ en *T. brucei* 449.

Una vez obtenidos los clones fueron almacenados a -80°C durante un corto periodo de tiempo y en nitrógeno líquido durante largos periodos de tiempo como se describe en el apartado B.II.1.1.2, hasta su utilización para llevar a cabo los diferentes estudios. Las líneas celulares obtenidas tras la transfección fueron:

- Formas sanguíneas: *T. brucei* S16 p2T7TBDUT y *T. brucei* S16 pGRV6.
- Formas procíclicas: *T. brucei* 29-13 p2T7TBDUT y *T. brucei* 449 pGRV6.

D.V.3. Estudio del efecto del RNAi sobre el crecimiento celular y análisis de los niveles de proteína

En primer lugar se estudió el efecto del silenciamiento del gen de la dUTPasa sobre el crecimiento celular. Para ello se indujo el fenómeno del RNAi con doxiciclina (DOX) utilizando ambas construcciones y en las distintas líneas celulares tal y como se detalla en el apartado B.II.6.2.

D.V.3.1. Efecto sobre tripomastigotes de la forma sanguínea

En las figuras D.V.2 y D.V.3 se muestran los resultados del perfil de crecimiento de las líneas celulares de la forma sanguínea, en las cuales el silenciamiento ha sido inducido en medio de cultivo HMI-9 complementado con 10 % de suero bovino fetal inactivado (SBF). En el caso de la línea celular de formas sanguíneas *T. brucei* S16 p2T7TBDUT (Figura D.V.2), la inducción del RNA de interferencia produjo una significativa inhibición del crecimiento alcanzando un máximo del 40 % al cuarto día post-inducción, aunque posteriormente se produjo una recuperación y no se aprecian cambios significativos entre el cultivo inducido y no inducido. En el caso de la línea celular *T. brucei* S16 pGRV6 (Figura D.V.3), ocurre algo parecido alcanzándose un máximo de inhibición del 30 %, al segundo día post-inducción a partir del cual va disminuyendo hasta desaparecer el fenotipo de pérdida de viabilidad. Sin embargo en ambos casos, cuando se utilizó HMI-9 complementado con 5 % de SBF dializado y 10 % de Serum Plus la inhibición del crecimiento aumentó drásticamente. En *T. brucei* S16 p2T7TBDUT (Figura D.V.2.B), el RNAi produjo una inhibición del crecimiento del

80 % a los días 2 y 6 post-inducción. En el caso de *T. brucei* S16 pGRV6 (Figura D.V.3.B), el efecto fue similar con máximos de inhibición del crecimiento a los 2 y 6 días tras la adición de DOX.

Se analizaron los niveles de proteína en cada punto para los cultivos inducidos y no inducidos mediante la técnica de *western blot*, utilizando el anticuerpo anti-*TbdUTPasa*. Como se puede ver en la figura D.V.2.C, cuando tiene lugar la inducción del silenciamiento se produce una disminución en los niveles de proteína del 80 % en la línea celular *T. brucei* S16 p2T7TBDUT.

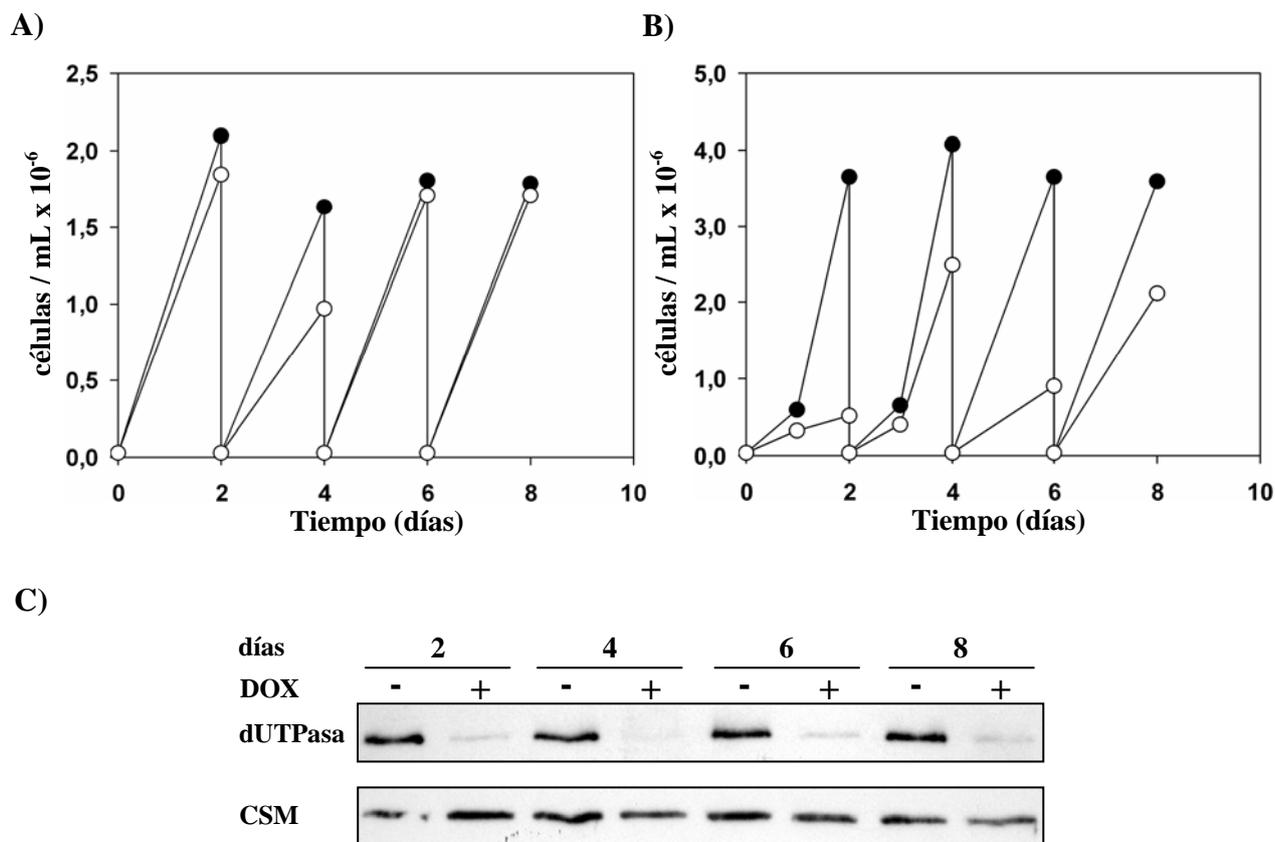


Figura D.V.2. Efecto del RNAi sobre el crecimiento celular y niveles de dUTPasa de *T. brucei* S16 p2T7TBDUT. A) Curva de crecimiento de *T. brucei* S16 p2T7TBDUT en HMI-9 suplementado con 10 % de SBF, en ausencia (●) o en presencia (○) de doxiciclina. B) Curvas de crecimiento de *T. brucei* S16 p2T7TBDUT en HMI-9 complementado con 5 % de SBF dializado y 10 % de Serum Plus, en ausencia (●) o en presencia (○) de doxiciclina. C) Niveles de dUTPasa intracelular determinados mediante *western blot* de extractos de 2.5×10^6 parásitos de cultivos en presencia o ausencia de $1 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de doxiciclina y a diferentes periodos de tiempo. La normalización se llevó a cabo con el anticuerpo CSM (Guerra-Giraldez *et al.*, 2002).

En el caso de *T. brucei* S16 pGRV6 (Figura D.V.3.C) el sistema fue más eficiente apreciándose una disminución del 90 % por densitometría de los *western blots* obtenidos.

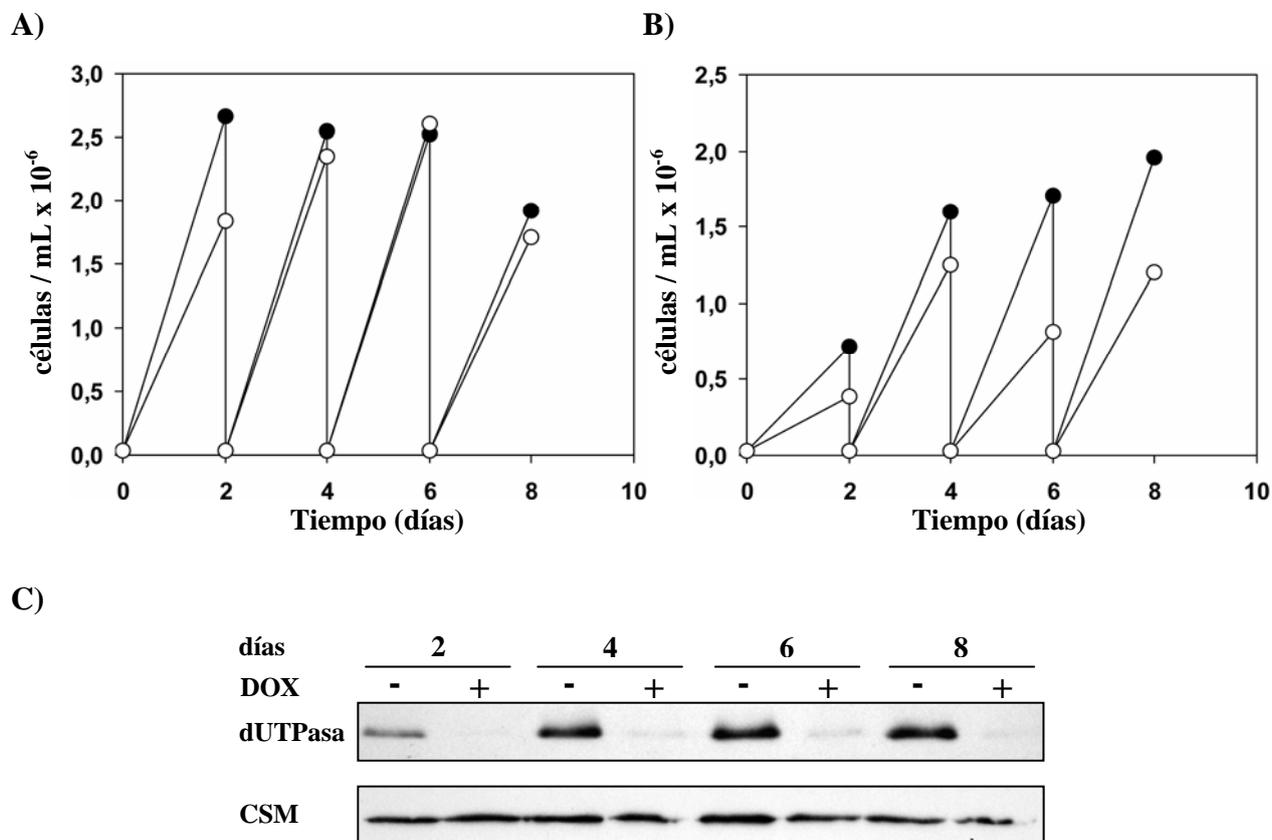


Figura D.V.3. Efecto del RNAi sobre el crecimiento celular y niveles de dUTPasa de *T. brucei* S16 pGRV6. A) Curva de crecimiento de *T. brucei* S16 pGRV6 en HMI-9 suplementado con 10 % de SBF, en ausencia (●) o en presencia (○) de doxiciclina. B) Curvas de crecimiento de *T. brucei* S16 pGRV6 en HMI-9 complementado con 5 % de SBF dializado y 10 % de Serum Plus, en ausencia (●) o en presencia (○) de doxiciclina. C) Niveles de dUTPasa intracelular determinados mediante *western blot* de extractos de 2.5×10^6 parásitos de cultivos en presencia o ausencia de $1 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de doxiciclina y a diferentes periodos de tiempo. La normalización se llevó a cabo con el anticuerpo CSM (Guerra-Giraldez *et al.*, 2002).

D.V.3.2. Efecto sobre tripomastigotes de la forma procíclica

En el caso de la expresión de RNA de doble cadena en la forma procíclica, se puede ver en las figuras D.V.4 y D.V.5 los resultados del perfil de crecimiento de las líneas celulares en las cuales ha sido inducido el silenciamiento en medio de cultivo

SDM-79 o MEM-Pros suplementado con 10 % de suero bovino fetal inactivado (SBF). En el caso de la línea celular *T. brucei* 29-13 p2T7TBDUT (Figura D.V.4), la inducción del RNA de interferencia en el medio SDM-79 no produjo ningún efecto sobre el crecimiento. Sin embargo, cuando el medio de cultivo utilizado fue MEM-Pros, el crecimiento del cultivo inducido disminuyó a partir del segundo día alcanzando un máximo de inhibición del 55 % al noveno día post-inducción.

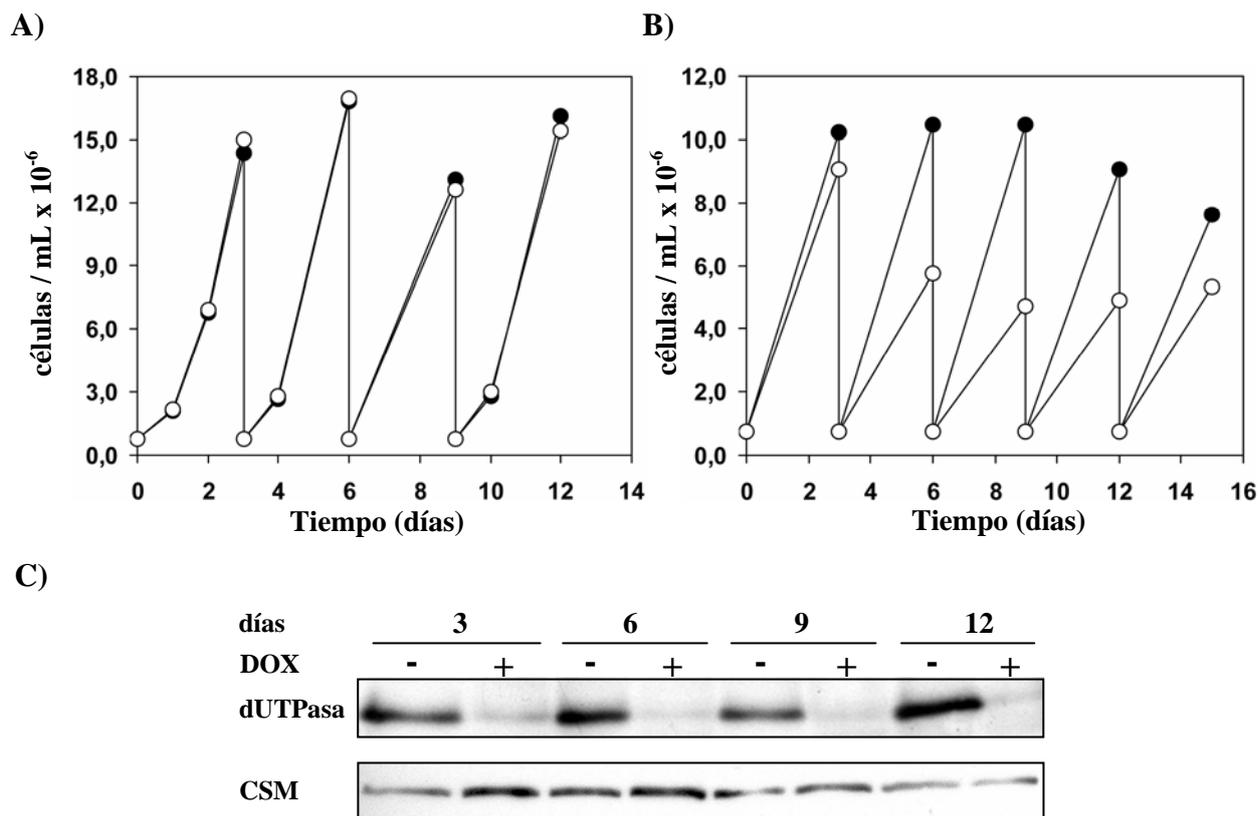


Figura D.V.4. Efecto del RNAi sobre el crecimiento celular y niveles de dUTPasa de *T. brucei* 29-13 p2T7TBDUT. A, B) Curvas de crecimiento de *T. brucei* 29-13 p2T7TBDUT en SDM-79 y MEM-Pros suplementado con 10 % de SBF, respectivamente en ausencia (●) o en presencia (○) de doxiciclina. C) Niveles de dUTPasa intracelular determinados mediante *western blot* de extractos de 2.5×10^6 parásitos de cultivos en presencia o ausencia de $1 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de doxiciclina y a diferentes periodos de tiempo. La normalización se llevó a cabo con el anticuerpo CSM (Guerra-Giraldez *et al.*, 2002).

Cuando el RNA de doble cadena se generó con la estrategia tallo-lazo, la línea celular *T. brucei* 449 pGRV6 (Figura D.V.5), la inducción en el medio de cultivo SDM-79 produjo una inhibición de crecimiento del 50 % a partir del sexto día post-inducción, similar a la conseguida con la estrategia de los promotores T7 enfrentados pero en el

medio de cultivo MEM-Pros. En medio MEM- Pros el fenotipo de pérdida de viabilidad va aumentando progresivamente hasta alcanzar valores máximos de 80 % entre los días 6 y 12 post-inducción, recuperándose posteriormente a partir de los 14 días.

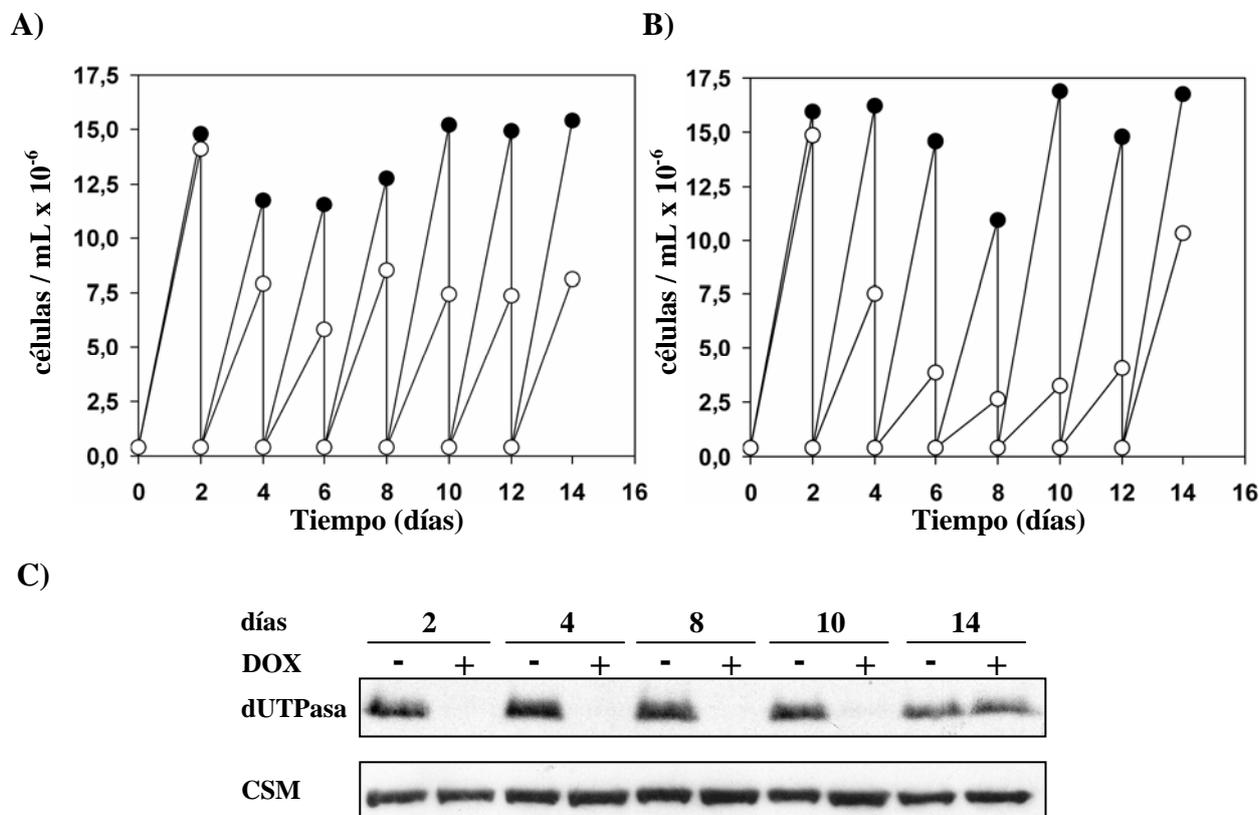


Figura D.V.5. Efecto del RNAi sobre el crecimiento celular y niveles de dUTPasa de *T. brucei* 449 pGRV6. A, B) Curvas de crecimiento de *T. brucei* 449 pGRV6 en SDM-79 y MEM-Pros suplementado con 10 % de SBF, respectivamente en ausencia (●) o en presencia (○) de doxiciclina. C) Niveles de dUTPasa intracelular determinados mediante *western blot* de extractos de 2.5×10^6 parásitos de cultivos en presencia o ausencia de $1 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de doxiciclina y a diferentes periodos de tiempo. La normalización se llevó a cabo con el anticuerpo CSM (Guerra-Giraldez *et al.*, 2002).

Al igual que en la forma sanguínea, se analizaron los niveles de proteína en cada punto para los cultivos inducidos y no inducidos mediante la técnica de *western blot*, utilizando el anticuerpo anti-*TbdUTPasa*. En las figuras D.V.4.C y D.V.5.C se muestran estos resultados. Cuando la técnica utilizada fue la de los promotores T7 enfrentados, tras la inducción del silenciamiento se produce una disminución de los niveles de proteína del 90 %, mientras que al utilizar la técnica de la estructura tallo-lazo se alcanzó una eliminación prácticamente total de proteína. En el día 14 post-inducción, se aprecia

una recuperación de los niveles de dUTPasa, lo que sugiere que la pérdida del fenotipo de inhibición del crecimiento se debe a la pérdida del fenómeno del RNAi y una recuperación de los niveles de proteína. En general existe una correlación entre los niveles de proteína y la pérdida de viabilidad siendo esta última más pronunciada en el caso de cepas donde se ha utilizado el sistema tallo-lazo para el silenciamiento.

D.V.4. Efecto del RNAi de la dUTPasa sobre los niveles intracelulares de los nucleótidos de uracilo y timina

La dUTPasa controla los niveles intracelulares de nucleótido libre dUTP por lo que es probable que la pérdida de viabilidad se deba a una mayor cantidad de dUTP intracelular tras la inducción del RNAi. Para determinar el contenido de este nucleótido así como la relación dTTP/dUTP se han realizado experimentos basándose en el ensayo de la DNA polimerasa descrito por Sherman y Fyfe (1989) (Sherman y Fyfe, 1989). Los ensayos se llevaron a cabo con la línea celular de la forma procíclica *T. brucei* 449 pGRV6 a 8 días post-inducción una vez observado un fenotipo de pérdida de viabilidad.

Como se mencionó con detalle en el apartado de Materiales y Métodos B.II.6.3 la cantidad de radioactividad incorporada por la DNA polimerasa al DNA es proporcional a la cantidad de dUTP y dTTP presente en el medio. Como nucleótido marcado radiactivamente se utilizó el nucleótido de adenosina ([2,8-³H]dATP) y para en la reacción de síntesis de DNA se utilizaron como DNA molde y como cebador dos oligonucleótidos sintéticos, cuyas secuencias eran: 5'- TTT ATT TAT TTA TTT ATT TAG GCG GTG GAG GCG G - 3' y 5'- CCG CCT CCA CCG CC - 3' respectivamente.

En primer lugar se realizaron curvas patrones para el dTTP y el dUTP, en las cuales se interpolaran los resultados obtenidos de los diferentes ensayos. Las curvas patrón se obtuvieron utilizando diferentes cantidades de cada nucleótido, tanto en el caso de llevar a cabo un tratamiento previo a la reacción de la DNA polimerasa con dUTPasa o sin realizar dicho tratamiento. Para demostrar que el tratamiento con dUTPasa tiene lugar de forma eficiente se realizó la curva patrón del dUTP en estas condiciones. Los resultados obtenidos se muestran en la figura D.V.6.

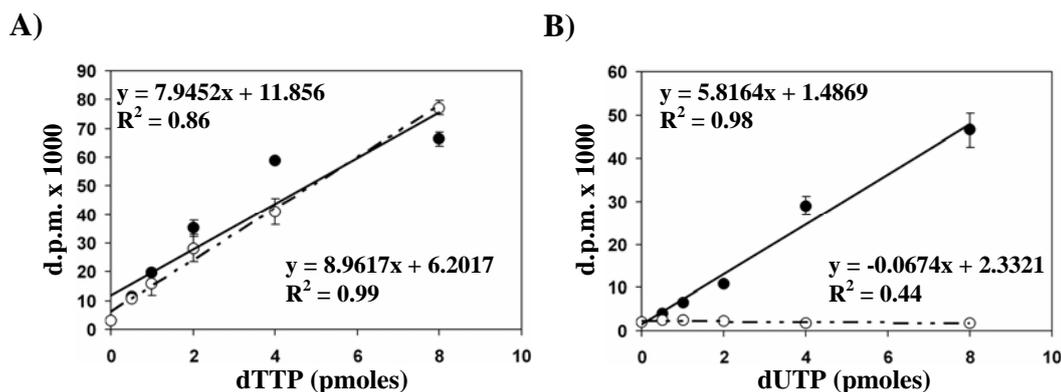


Figura D.V.6. Curvas patrón del ensayo modificado de la DNA polimerasa, demostrando una relación lineal entre la incorporación del nucleótido marcado radiactivamente representado como desintegraciones por minuto (d.p.m.) x 1000 y la cantidad de desoxinucleótido en picomoles. A) Curva patrón del dTTP utilizando 0.5-1.0-2.0-4.0-8.0 pmoles sin llevar a cabo un tratamiento previo con dUTPasa (●, $y = 7.9452x + 11.856$, $R^2 = 0.86$) o realizando el tratamiento con dUTPasa (○, $y = 8.9617x + 6.2017$, $R^2 = 0.86$). B) Curva patrón del dUTP utilizando 0.5-1.0-2.0-4.0-8.0 pmoles sin llevar a cabo un tratamiento previo con dUTPasa (●, $y = 5.8164x + 1.4869$, $R^2 = 0.98$) o realizando el tratamiento con dUTPasa (○, $y = -0.0674x + 2.3321$, $R^2 = 0.44$).

La cantidad de dTTP se determinó mediante la interpolación de los datos obtenidos en cada ensayo de las muestras tratadas con dUTPasa en la curva patrón para el dTTP tratado con dUTPasa. El dUTP es la diferencia del valor del dTTP entre las muestras tratadas y no tratadas con dUTPasa.

Los valores obtenidos muestran (Tabla D.V.1) una cantidad intracelular de dTTP en células en ausencia de inducción del RNAi de 2.3 pmoles por millón de parásitos, mientras que se obtuvo un valor extremadamente bajo de dUTP de 0.09 pmoles por millón de células. El cociente dTTP/dUTP resultante sin la inducción del silenciamiento es por tanto de 25. Cuando los niveles de dUTPasa están disminuidos por el RNAi se produce un aumento en los niveles de dUTP hasta 0.82 pmoles por millón de parásitos obtenidos a los 8 días post-inducción así como un moderado incremento en la cantidad de dTTP a 4.1 pmoles por millón de células. En este caso el valor de la relación dTTP/dUTP fue de 4.9. Este resultado, en el cual se aprecia que los niveles de dUTP aumentaron del orden de nueve veces en células con una actividad dUTPasa disminuida, sugiere que la dUTPasa presenta un papel fundamental en el mantenimiento de los niveles intracelulares de dUTP.

<i>RNAi</i>	<i>dTTP</i> (<i>pmol/10⁶ células</i>)	<i>dUTP</i> (<i>pmol/10⁶ células</i>)	<i>dTTP/dUTP</i>
No inducido	2.3 ± 0.8	0.09 ± 0.05	25.0
inducido	4.1 ± 0.9	0.82 ± 0.03	4.9

Tabla D.V.1. Concentraciones de dTTP y dUTP en extractos de *T. brucei* 449 pGRV6 tras la inducción del silenciamiento génico de la dUTPasa mediante RNAi. Los resultados son expresados como el valor medio ± la desviación estándar de 5 ensayos individuales.

D.V.5. Determinación del efecto combinado del RNAi de la dUTPasa y la inhibición por metotrexato en el crecimiento celular

La dihidrofolato reductasa en parásitos protozoos se presenta como una proteína bifuncional junto a la actividad timidilato sintasa, DHFR-TS. La actividad dihidrofolato reductasa es la responsable de la reducción de los folatos en la célula y en concreto de la reducción de dihidrofolato a tetrahidrofolato que es de vital importancia ya que tras ser metilado a metilentetrahidrofolato, es utilizado como cofactor en la metilación del nucleótido desoxiuridina monofosfato a desoxitimidina monofosfato en la ruta de síntesis *de novo* de pirimidinas. Una inhibición de la dihidrofolato reductasa impide la biosíntesis de timidilato conduciendo a la muerte celular por falta de timina. Existen diversos fármacos inhibidores de la dihidrofolato reductasa que se utilizan como antibacterianos, antitumorales y antiprotozoarios. Una inhibición de la enzima produce una disminución en la síntesis de dTTP y un aumento en los niveles intracelulares de dUTP al acumularse el sustrato de la reacción de metilación, y un aumento en el cociente dTTP/dUTP. Con estas consideraciones en mente, se ha analizado si una disminución en la capacidad de hidrólisis del dUTP tras el silenciamiento del gen de la dUTPasa tendría un efecto sobre la sensibilidad a antifolatos como el metotrexato.

Para ello se ha determinado la inhibición del crecimiento por metotrexato en líneas celulares que presentan una depleción de la dUTPasa utilizando un rango de concentraciones donde se produce inhibición del crecimiento. En primer lugar se determinó los valores de IC50 para el metotrexato en las líneas celulares de la forma sanguínea (*T. brucei* S16) y procíclica (*T. brucei* 29-13), los cuales fueron de 2.5 ± 0.3 μM y 7.9 ± 1.4 μM respectivamente (Figura D.V.7). Las concentraciones del

fármaco ensayadas fueron 0.25-0.5-1.0 μM para *T. brucei* S16 y 0.7-1.4-2.8 μM para *T. brucei* 29-13.

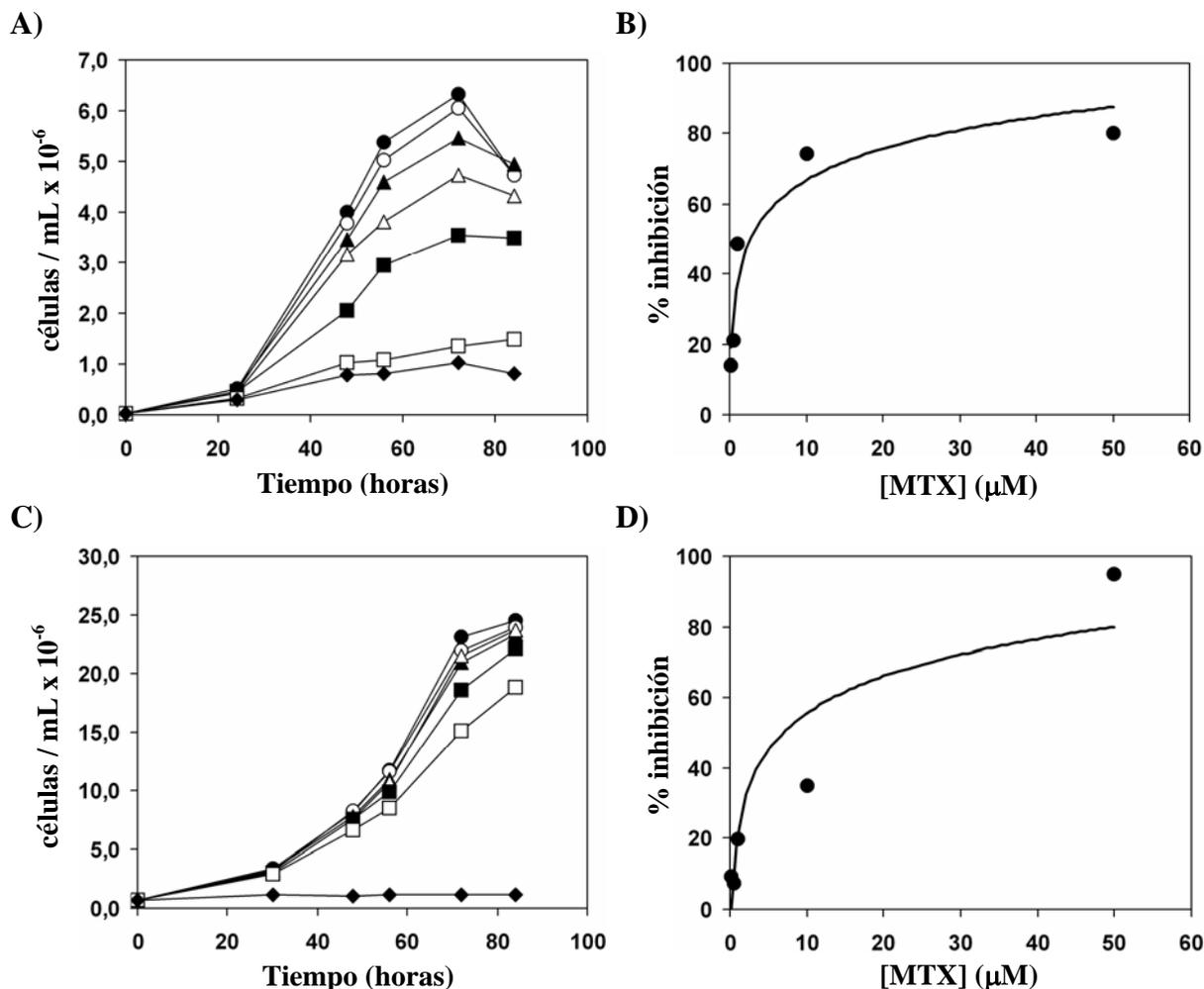


Figura D.V.7. Determinación del valor de IC50 del metotrexato en *T. brucei*. A, C) Curvas de crecimiento de las líneas celulares de la forma sanguínea (*T. brucei* S16) y de la forma procíclica (*T. brucei* 29-13) respectivamente, en ausencia de MTX (\bullet); en presencia de NaOH 4 μM utilizado como disolvente (\circ); o en presencia de concentraciones crecientes de MTX: 0.25 μM (\blacktriangle), 0.5 μM (\triangle), 1 μM (\blacksquare), 10 μM (\square) y 50 μM (\blacklozenge). B, D) Ajuste logarítmico (%inhibición = $a \cdot \ln[\text{MTX}] + b$) de la representación del porcentaje de inhibición del crecimiento celular para concentración de MTX en el momento en que los cultivos de las líneas celulares de *T. brucei* S16 y 29-13 se encontraba en fase logarítmica tardía respectivamente.

En la figura D.V.8 se muestran los valores de inhibición del crecimiento por metotrexato así como los obtenidos tras el silenciamiento de gen de la dUTPasa en presencia de metotrexato. En el caso de la forma sanguínea, la inducción del RNAi produjo una inhibición del crecimiento del 20 %, pero cuando se adiciona al medio 250 nM de metotrexato se produce un drástico aumento en la pérdida de viabilidad hasta

el 80 %. Para descartar que este efecto fuera debido a posibles interacciones entre el metotrexato y el antibiótico utilizado para inducir el RNAi (doxiciclina), se realizó el mismo experimento con la línea celular sin transfectar, la cual no tiene la capacidad de producir silenciamiento. En este caso la inhibición del crecimiento tras añadir doxiciclina más metotrexato no presenta diferencias con respecto al efecto observado con el metotrexato únicamente. Estos resultados indican que la disminución de la actividad dUTPasa mediante silenciamiento génico produce hipersensibilidad a metotrexato. Este fenómeno puede ser consecuencia de un aumento en la concentración intracelular de dUTP tras la exposición al fármaco. En el caso de la forma procíclica, se realizó el mismo experimento utilizando 700 nM de MTX observándose a los 12 días una significativa hipersensibilidad al fármaco en células donde se ha inhibido la expresión de la dUTPasa.

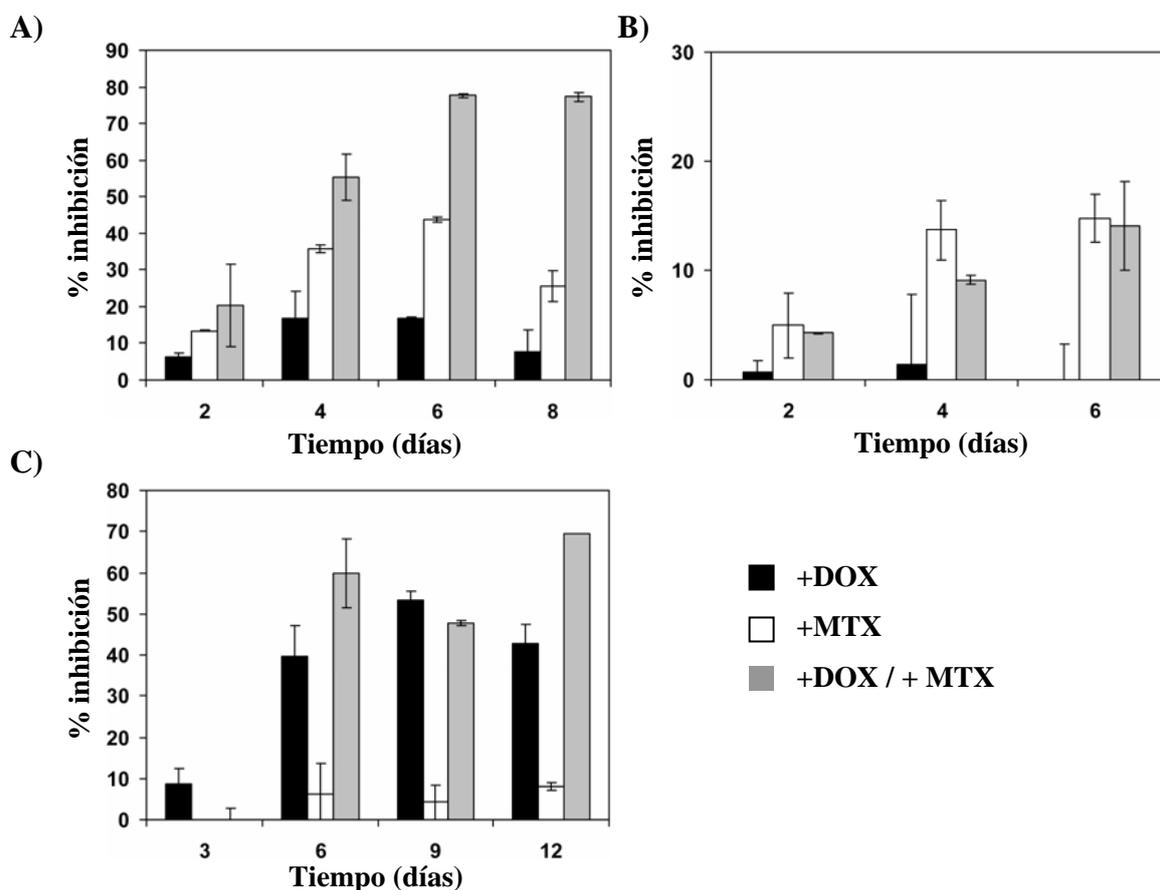


Figura D.V.8. Efecto del RNAi de la dUTPasa y el metotrexato sobre el crecimiento celular. Valores de inhibición del crecimiento celular mediado por RNAi de la dUTPasa (■), metotrexato (□), metotrexato más RNAi (■). A) *T. brucei* S16 p2T7TBDUT; B) *T. brucei* S16; C) *T. brucei* 29-13 p2T7TBDUT. Para las formas sanguíneas se utilizó 250 nM de MTX y para las procíclicas 700 nM.

D.V.6. Efecto de la timidina y timina sobre el fenotipo de pérdida de viabilidad mediado por la depleción de la dUTPasa

Dado el papel central de la dUTPasa en el control de los niveles intracelulares de dUTP es concebible que un aumento en los niveles de dUTP y por lo tanto un aumento del cociente dUTP/dTTP es el responsable de la pérdida de viabilidad celular en *T. brucei*. Estos parásitos protozoos poseen la maquinaria necesaria para la recuperación de nucleótidos pirimidínicos, incluyendo las enzimas timidina quinasa (Tb10.70.7270) y timidilato quinasa (Tb927.8.3510), por lo que si la hipótesis es correcta, una adición exógena de precursores de timidilato como timidina o timina podría revertir dicho fenotipo al aumentar la proporción intracelular de dTTP haciendo este nucleótido más accesible a la maquinaria de replicación.

Para estudiar esta posibilidad, diferentes concentraciones de timidina o timina se adicionaron a un cultivo de *T. brucei* 449 pGRV6 tras la inducción del RNAi de la dUTPasa y se analizó el perfil de crecimiento de dicho cultivo. Las concentraciones de timidina ensayadas fueron el rango de 50 a 600 μM , y en el caso de timina entre 5 y 50 μM . Los resultados muestran (Figura D.V.9.A) que la adición de timidina revierte la inhibición del crecimiento causada por una disminución en los niveles de dUTPasa. La recuperación de la proliferación celular es proporcional a la concentración de timidina presente en el medio, siendo más notable a concentraciones altas del nucleósido. A diferencia de la timidina (Figura D.V.9.B) la timina no fue capaz de revertir el fenotipo, por lo menos en el rango de concentraciones ensayadas. El hecho de que la recuperación de la proliferación tiene lugar a altas concentraciones podría deberse a que en tripanosomátidos no se han identificado hasta la fecha transportadores específicos para el nucleósido y parece ser que la incorporación de ambos compuestos tiene lugar por difusión siendo más eficaz el proceso de interiorización de la timidina (Gudin *et al.*, 2006).

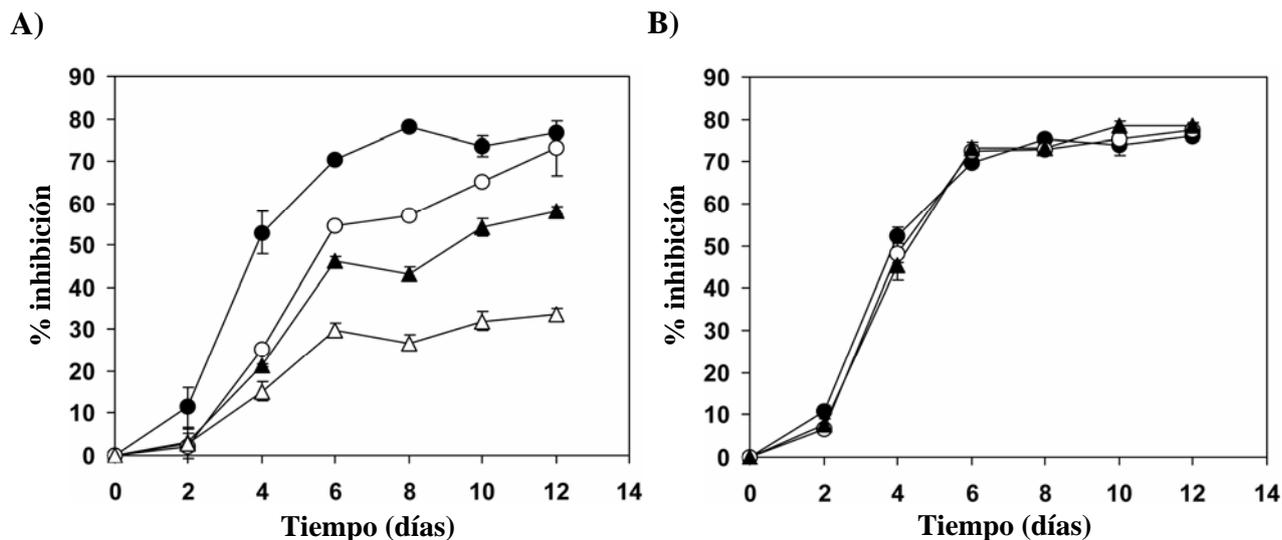


Figura D.V.9. Efecto de la adición de timidina y timina sobre el crecimiento en condiciones de silenciamiento de la dUTPasa por RNAi. Inhibición del crecimiento sobre la línea celular *T. brucei* 449 pGRV6 expresando RNA de doble cadena frente a la concentración de timidina o timina. El resultado es el promedio de dos ensayos por separado. Representación gráfica en presencia de concentraciones crecientes de: A) timidina: 50 µM (●), 150 µM (○), 300 µM (▲) y 600 µM (△); B) timina: 5 µM (●), 10 µM (○), 25 µM (▲) y 50 µM (△).

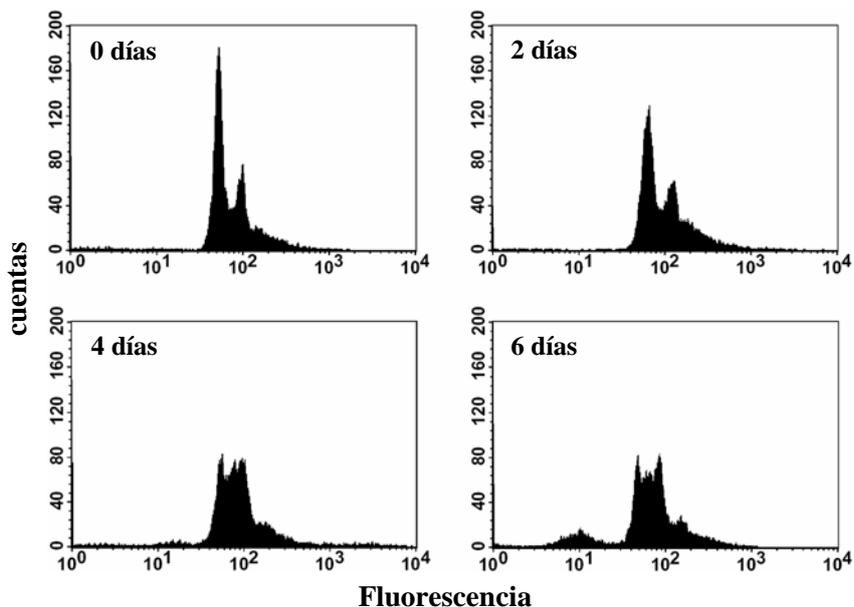
D.V.7. Efecto del RNAi de la dUTPasa sobre el ciclo celular de *T. brucei*

Para estudiar las consecuencias de la depleción de la dUTPasa sobre el ciclo celular, se realizó un análisis mediante citometría de flujo, tiñendo el DNA con yoduro de propidio para de esta manera determinar el número de células que se encuentran en cada fase del ciclo celular y diferenciando entre G1, S y G2/M. El procedimiento seguido se describe en el apartado B.II.6.6 de Materiales y Métodos. Para este estudio se utilizó la línea celular *T. brucei* 449 pGRV6 de la forma procíclica. La inducción del silenciamiento produjo una drástica disminución del número de células en fase G1 (del 62 % al 25 % de la población total) acompañado con un aumento de la misma proporción en el número de células en fase S (del 11 % al 27 %). El número de células en fase G2/M aumentó ligeramente de un 23 % a un 27 %, a la vez que aparece un pico sub-G1 alcanzando un valor máximo de 20 %. Todos estos resultados están recogidos en la figura D.V.10.

Para establecer si el silenciamiento del gen *DUT* genera alteraciones tanto a nivel del número intracelular de núcleos o kinetoplastos u otros cambios morfológicos a nivel celular, se llevó a cabo un análisis en un microscopio de fluorescencia de una población de células inducidas. La cuantificación del número de núcleos y kinetoplastos se realizó mediante la tinción con DAPI en el sexto día post-inducción, momento donde el fenotipo de pérdida de viabilidad es más acusado. A diferencia de la citometría de flujo, con este análisis es posible diferenciar entre las células que se encuentran en fase G2 y en mitosis (M), pero no se puede diferenciar entre la fase G1 y la fase S. El resultado obtenido (Figura D.V.11.A) muestra una disminución en la población de células con un núcleo y un kinetoplasto (1N1K) de un 76 % al 55 %. Curiosamente, los núcleos individuales en las células inducidas aparecen con un tamaño visiblemente aumentado (Figura D.V.11.B), denominando a esta población 1N*1K para diferenciarla de las células normales 1N1K. La proporción de la población con esta característica morfológica en el total de células con 1N1K corresponde a un 22.4 % mientras que la población con una morfología normal es del 32.6 %. Este incremento en el tamaño del núcleo podría deberse a un proceso activo de síntesis de DNA pero sin que tenga lugar la mitosis en el ciclo celular. En el caso de la población de células con un núcleo y dos kinetoplastos (1N2K) se aprecia un aumento del número de células del 11 % al 19.3 % pero al igual que en el caso anterior, determinadas células exhiben un incremento en el tamaño del núcleo. Se denomina a esta nueva población 1N*2K (Figura D.V.11.B) y el aporte al total de células 1N2K es del 13 %. La aparición de este tipo de células podría ser una consecuencia del bloqueo de la mitosis tras la división del kinetoplasto. En cuanto a la población 2N2K, tiene lugar una drástica reducción con respecto a las células sin inducir del 11.2 % al 4 % sin que hayamos apreciado un aumento en el tamaño del núcleo. El 4% residual seguramente corresponden a un porcentaje de células que escapan al RNAi, ya que no se hubieran podido formar nuevas células 2N2K bajo una situación de bloqueo del ciclo celular. Además de estas aberraciones, se produjo la aparición de células anucleadas pero que contenían un kinetoplasto (0N1K) (Figura D.V.11.B), denominadas zoides, correspondiendo este tipo de población a un 14.8 % del total de células analizadas. Este tipo de células podrían derivar de la división de células 1N*2K, dando lugar a células 1N*1K y zoides. Esta capacidad de las células 1N*2K para dividirse sugiere que la citocinesis y división celular puede ser conducida y completada por la segregación del kinetoplasto sin que tenga lugar la mitosis. Finalmente se puede apreciar

la presencia de un porcentaje del 6.7 % de células en las que existen un número de núcleos y kinetoplastos anormal, denominando a estas células XNXK, las cuales han sufrido la entrada varias veces en el proceso de replicación sin que tenga lugar la división celular.

A)



B)

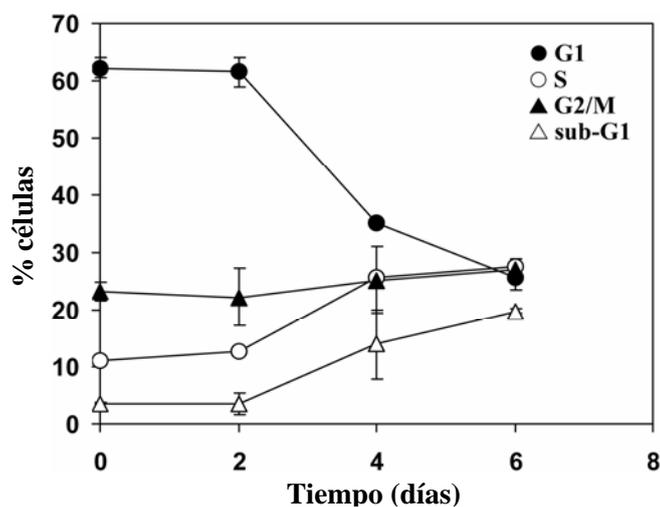
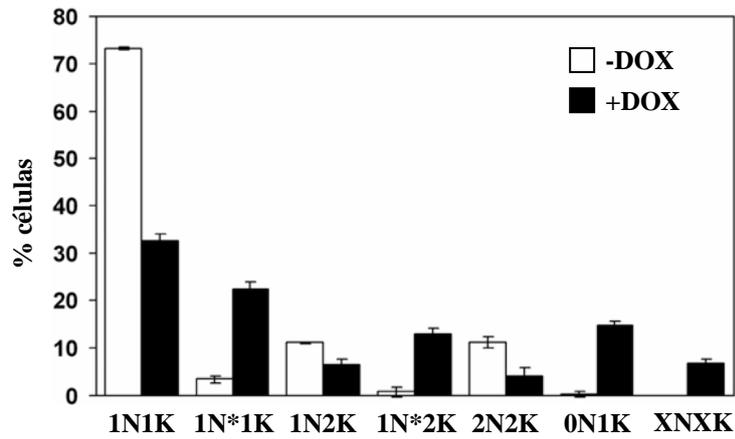


Figura D.V.10. Distribución poblacional en el ciclo celular de *T. brucei* bajo condiciones de silenciamiento del gen *DUT*. A) Análisis de la citometría de flujo a diferentes tiempos tras la inducción del RNAi de la dUTPasa. B) Representación gráfica del porcentaje de células en cada fase del ciclo celular a lo largo del tiempo: fase G1(●); fase S (○); fase G2/M (▲); y pico sub-G1 (Δ). Los resultados son el promedio de dos ensayos por separado.

A)



B)

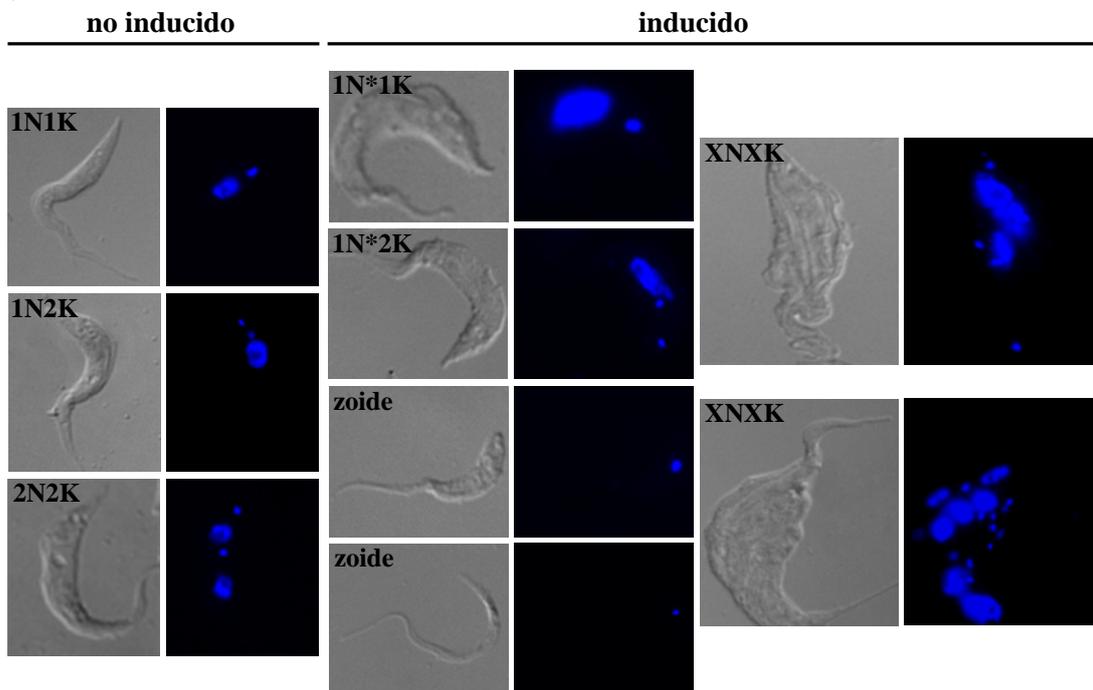


Figura D.V.11. Morfología de la forma procíclica de *T. brucei* bajo condiciones de silenciamiento del gen *DUT*. Células de la línea celular *T. brucei* 449 pGRV6, después de seis días en ausencia (no inducido) o en presencia (inducido) de doxiciclina, fueron teñidas con DAPI y analizadas en un microscopio de fluorescencia. A) Cuantificación de las células con diferente morfología tras la inducción del RNAi de la dUTPasa. El número de núcleos (N) y de kinetoplastos (K) de cada célula individual se determinó mediante un microscopio de fluorescencia. Los resultados se representan como el promedio de tres grupos individuales de > 100 células y con un error correspondiente a la desviación estándar. B) Contraste interdiferencial de fase y tinción con DAPI de las poblaciones donde el RNAi de la dUTPasa no ha sido inducido: 1N1K; 1N2K; 2N2K, o tras la inducción del RNAi: 1N*1K, 1N*2K, 0N1K (zoides) y XNXX.

D.V.8. Efecto del RNAi de la dUTPasa sobre la actividades enzimáticas uracil DNA glicosilasa y AP endonucleasa

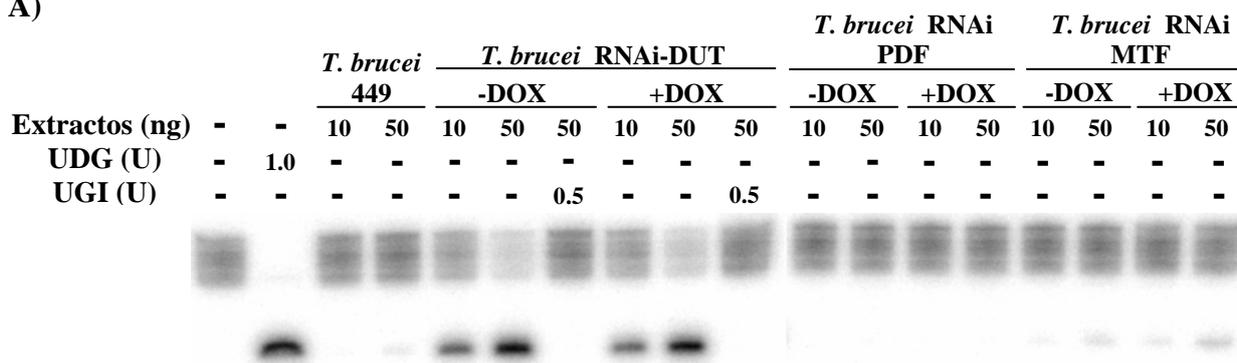
Cuando una base de uracilo es incorporada se desencadena un mecanismo denominado reparación por escisión de bases con el fin de sustituir la base errónea por la correcta, la cual en este caso concreto sería timina. Este proceso implica la acción de una serie de enzimas, dos de las cuales son la uracil DNA glicosilasa y la AP endonucleasa. La primera actividad es la encargada de reconocer la base y escindir la de la cadena de DNA y la segunda de romper el sitio abásico generado, dejando un extremo 3' hidroxilo y un extremo 5' desoxirribosa-fosfato.

Como se ha indicado previamente el silenciamiento de la dUTPasa produce una mayor cantidad de dUTP libre en la célula y una inhibición de la proliferación acompañado de defectos en la mitosis, la citocinesis y la aparición de células con DNA fragmentado. Es de suponer que en estas condiciones un acúmulo intracelular de dUTP da lugar a un aumento en la incorporación a DNA y una activación de la ruta de escisión-reparación de bases. El estudio se realizó con la línea celular de la forma procíclica *T. brucei* 449 pGRV6, cuyo procedimiento se describe en detalle en el apartado B.II.6.7 de Materiales y Métodos.

En el caso de la medida de actividad uracil DNA glicosilasa (Figura D.V.12.A), se utilizó un oligonucleótido de 21 residuos con una base de uracilo en posición 10 (5'-CCT GCC CTG UGC AGC TGT GGG-3') marcado radiactivamente en el extremo 5' con [γ - 32 P]ATP y se hibridó con un oligonucleótido de secuencia complementaria dando un apareamiento U:A. Esta doble cadena de DNA se incubó en presencia de concentraciones crecientes de extractos de proteínas de parásitos. La cuantificación de los sitios abásicos generados por la enzima uracil DNA glicosilasa se llevó a cabo por un tratamiento químico que rompe los sitios abásicos produciendo dos cadenas de DNA, una de 9 nucleótidos marcada radiactivamente y otra de 11 nucleótidos, permitiendo el posterior análisis en geles de acrilamida en condiciones desnaturizantes. La visualización del resultado se realiza en un Storm 820 PhosphorImager obteniéndose dos bandas de diferente tamaño correspondiendo la de mayor tamaño al oligonucleótido de 21 residuos utilizado como sustrato y una menor de 9 nucleótidos al producto de la reacción de la uracil DNA glicosilasa con el extremo 5' marcado radiactivamente.

Los resultados obtenidos y cuantificados mediante densitometría mostraron un aumento en actividad uracil DNA glicosilasa del orden de 100 veces en relación con la actividad de la línea celular sin transfectar (*T. brucei* 449) tanto en ausencia como en presencia de doxiciclina. Como controles se utilizaron líneas celulares disponibles en el laboratorio que producen silenciamiento de dos genes no relacionados con esta ruta, el gen de la péptido deformilasa (*def*) que cataliza la eliminación del grupo formil N-terminal de las proteínas que se están sintetizando y de la formil metil transferasa (*fmt*) la cual cataliza la incorporación de un grupo formil al Met-tRNA. En el caso de la depleción de la péptido deformilasa la inducción del RNAi produce un fenotipo de pérdida de viabilidad, mientras que en el caso de la formil metil transferasa la inducción del RNAi no produce cambios en el crecimiento celular. La inducción de RNAi en las líneas control no produjo alteraciones en la actividad uracil DNA glicosilasa, manteniéndose en valores similares al de la línea celular sin transfectar. Sin embargo sorprendentemente en la línea sin inducir para el RNAi de la dUTPasa se produce un incremento en los niveles de actividad uracil DNA glicosilasa del mismo orden que cuando se produce la inducción. Se utilizó un inhibidor específico de uracil DNA glicosilasa de la familia UDG de *E. coli*, a la cual pertenece la única uracil DNA glicosilasa de tripanosomátidos, para demostrar que la actividad que se estaba midiendo era específica de esta enzima. Este inhibidor es una proteína denominada Ugi, que está codificada por el gen *ugi* del bacteriófago PBS2 de *Bacillus subtilis*. Como el genoma del bacteriófago PBS2 contiene uracilo en lugar de timina, una vez que se ha producido la infección el bacteriófago expresa la proteína Ugi con el fin de inhibir la actividad uracil DNA glicosilasa de la célula huésped, permitiendo la presencia de uracilo en su genoma (Bennett y Mosbaugh, 1992). Como se observa en la figura D.V.12 en presencia de Ugi se inhibe totalmente la actividad glicosilasa.

A)



B)

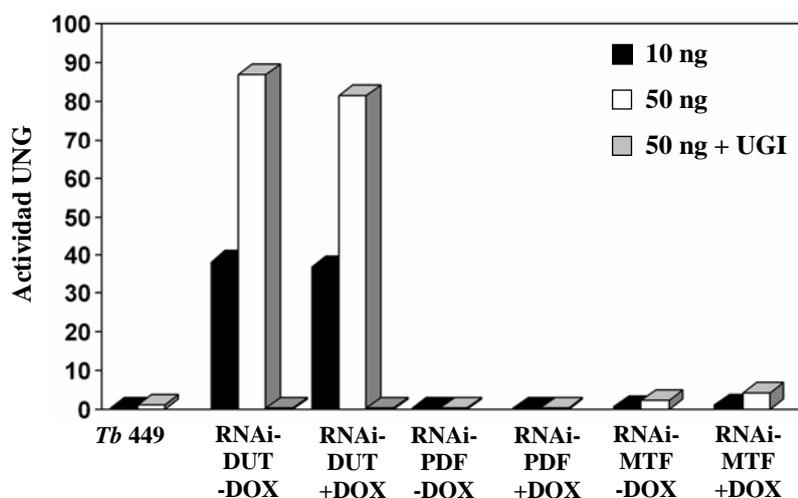


Figura D.V.12. Medida de actividad uracil DNA glicosilasa. A) Determinación de la actividad UNG de diferentes líneas celulares: sin expresar RNA de doble cadena, *T. brucei* 449; generando el silenciamiento de los genes *DUT*, *T. brucei* 449 pGRV6 (RNAi DUT), *DEF*, *T. brucei* RNAi PDF, *FMT*, *T. brucei* RNAi MTF; en ausencia (-) o presencia (+) de doxiciclina; UDG (uracil DNA glicosilasa) humana; Ugi (inhibidor de la uracil DNA glicosilasa). Los productos de reacción se separaron mediante electroforesis en geles de acrilamida desnaturalizantes al 20 %. B) Representación de la actividad uracil DNA glicosilasa de las distintas líneas celulares de *T. brucei* con diferentes cantidades de extracto. El valor es el promedio de tres determinaciones siendo el coeficiente de variación menor del 4 % en todos los casos.

Para el estudio de la actividad AP endonucleasa (Figura D.V.13) se utilizó un oligonucleótido de 21 residuos conteniendo en posición 10 el análogo de sitio abásico sintético tetrahidrofurano (5'- CCT GCC CTG_{THF}GC AGC TGT GGG-3'). El oligonucleótido se marcó radiactivamente en el extremo 5' con [γ -³²P]ATP y se hibridó con un oligonucleótido de secuencia complementaria dando lugar a un apareamiento THF:A. Esta doble cadena de DNA se incubó en presencia de concentraciones crecientes de extractos de proteínas de parásitos. La actividad AP endonucleasa produce dos productos de reacción, un oligonucleótido de 9 residuos marcado radiactivamente y otro

de 11 residuos, los cuales fueron analizados posteriormente en geles de acrilamida en condiciones desnaturizantes. La visualización del resultado se realizó en un Storm 820 PhosphorImager obteniéndose dos bandas de diferente tamaño correspondiendo la de mayor tamaño al oligonucleótido de 21 residuos restante utilizado como sustrato y una menor de 9 nucleótidos correspondiendo al producto de la reacción de la AP endonucleasa glicosilasa con el extremo 5' marcado radiactivamente. El resultado mostró que a diferencia de lo que ocurre con la actividad uracil DNA glicosilasa, no hay diferencias significativas entre las muestras correspondientes al RNAi de la dUTPasa sin inducir o inducidas. Tampoco se apreciaron diferencias significativas en las líneas celulares utilizadas como control.

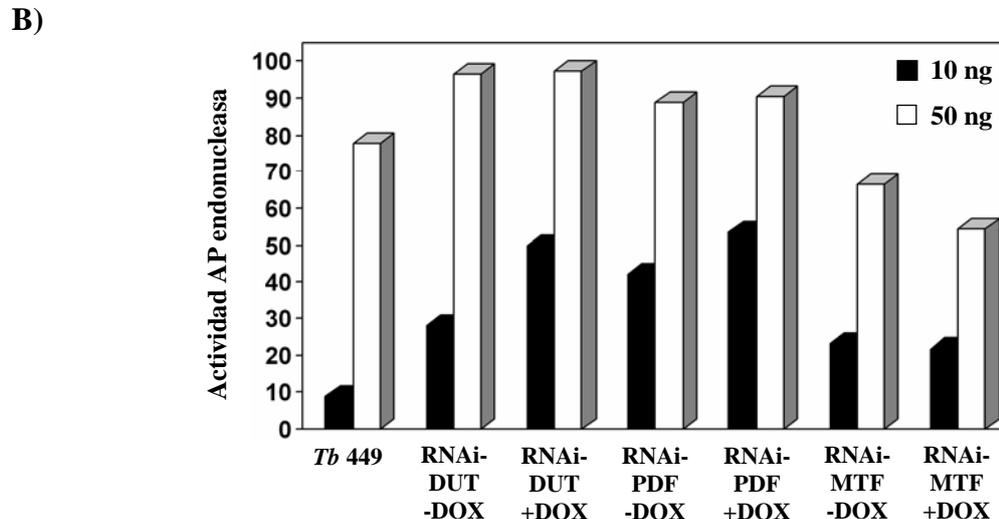
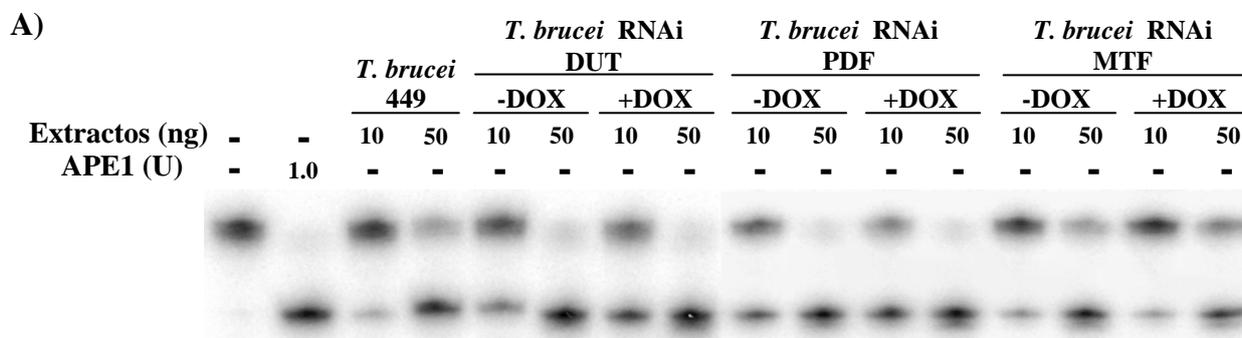


Figura D.V.12. Medida de actividad AP endonucleasa. A) Determinación de la actividad AP endonucleasa de diferentes líneas celulares: sin expresar RNA de doble cadena, *T. brucei* 449; generando el silenciamiento de los genes *DUT*, *T. brucei* 449 pGRV6 (RNAi-DUT), *DEF*, *T. brucei* RNAi-PDF, *FMT*, *T. brucei* RNAi-MTF; en ausencia (-) o presencia (+) de doxiciclina; APE1 (AP endonucleasa humana). Los productos de reacción se separaron mediante electroforesis en geles de acrilamida desnaturizantes al 20 %. B) Representación de la actividad AP endonucleasa de las distintas líneas celulares de *T. brucei* con diferentes cantidades de extracto. El valor es el promedio de tres determinaciones siendo el coeficiente de variación menor del 5 % en todos los casos.

Se analizó asimismo si las variaciones en actividad se corresponden con modificaciones en la cantidad de mRNA para lo que se determinaron los niveles mediante *northern blot*. En la figura D.V.14 se puede apreciar como el silenciamiento del gen *DUT* produce una práctica eliminación de los niveles de RNA mensajero, mientras que no se aprecian diferencias significativas en ninguna de las líneas celulares para el mRNA del gen *UNG*. De la misma manera se determinaron los niveles de transcrito para la AP endonucleasa de *T. brucei* y al igual que para el gen *UNG*, no se aprecian modificaciones tras la producción del RNAi-DUT.

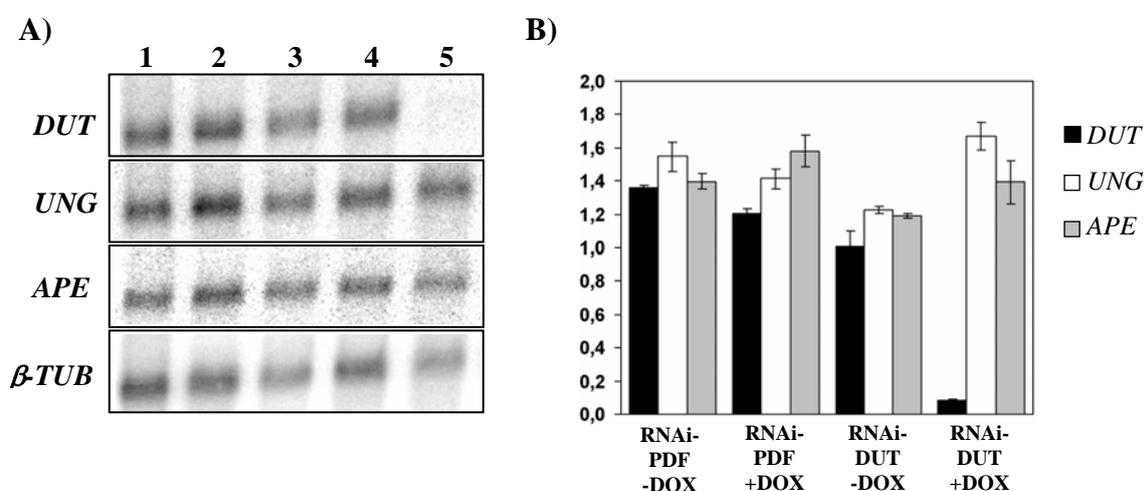


Figura D.V.14. Niveles de mRNA para los genes *DUT*, *UNG* y *APE* en distintas líneas celulares de *T. brucei*. A) Carril 1, *T. brucei* 449; 2 y 3, *T. brucei* 449 RNAi-PDF; 4 y 5, *T. brucei* 449 RNAi-DUT sin inducir e inducido respectivamente. B) Cuantificación relativa de los niveles de mRNA. El valor de expresión para un gen determinado en cada línea celular se expresa como el cociente entre su nivel de mRNA y el nivel de mRNA para este mismo gen en la línea celular *T. brucei* 449. Los niveles de mRNA se normalizaron previamente respecto al gen de la β -tubulina.

D.V.9. Efecto del doble silenciamiento mediante RNAi de los genes de la dUTPasa y UNG de *T. brucei*

En *Saccharomyces cerevisiae* se ha puesto de manifiesto que la eliminación del gen *dut1* causa muerte celular principalmente debido a la aparición de sitios abásicos por la activación del mecanismo de escisión-reparación de bases. Sin embargo en presencia de una actividad dUTPasa residual, una eliminación de la actividad glicosilasa produce

una disminución de sitios abásicos y una reversión parcial del fenotipo de pérdida de viabilidad (Guillet *et al.*, 2006).

En *Caenorhabditis elegans*, una depleción de la dUTPasa por RNAi causa letalidad embrionaria y conduce a la activación de un arresto del ciclo celular y apoptosis. Cuando se realiza una doble depleción de los genes *dut-1* y *ung-1* se produce un rescate del desarrollo de la línea germinal, permitiendo la formación de oocitos y esperma, sugiriendo que el fenotipo observado es una consecuencia directa del procesamiento del uracilo incorporado al DNA por la ruta de escisión-reparación de bases (Dengg *et al.*, 2006).

Con estas consideraciones en mente se ha realizado el doble silenciamiento de los genes *DUT* y *UNG*, con el fin de establecer el papel de la uracil glicosilasa en el control de la presencia de uracilo en el DNA tras una depleción de la dUTPasa. Primero se ha analizado células donde se ha silenciado únicamente el gen *UNG* y posteriormente se han obtenido líneas celulares que producen el RNAi-DUT con el RNAi-UNG.

D.V.9.1. Construcción de plásmidos para el silenciamiento génico mediante RNAi de la UNG

En primer lugar se clonó un fragmento de 421 pares de bases correspondiente a la posición 97 a 546 de la secuencia codificante de la UNG, en ambos sentidos separados por una secuencia de DNA “stuffer” en el vector pGR19 para dar el plásmido pGRV12. Para realizar un doble silenciamiento junto con el gen de la dUTPasa, se generó un segundo plásmido a partir del pGRV12, tras la inserción de un fragmento que contiene la secuencia utilizada para silenciar el gen *UNG* en el plásmido pHD1336, el cual presenta un marcador de selección para blasticidina, obteniéndose la construcción pGRV14.

El procedimiento de construcción de ambos plásmidos se describe con detalle en el apartado B.II.6.8.1 de Materiales y Métodos. En la figura D.V.15 se muestra el esquema de ambos plásmidos señalando las características más destacadas, así como los sitios de clonación utilizados en la construcción de los plásmidos.

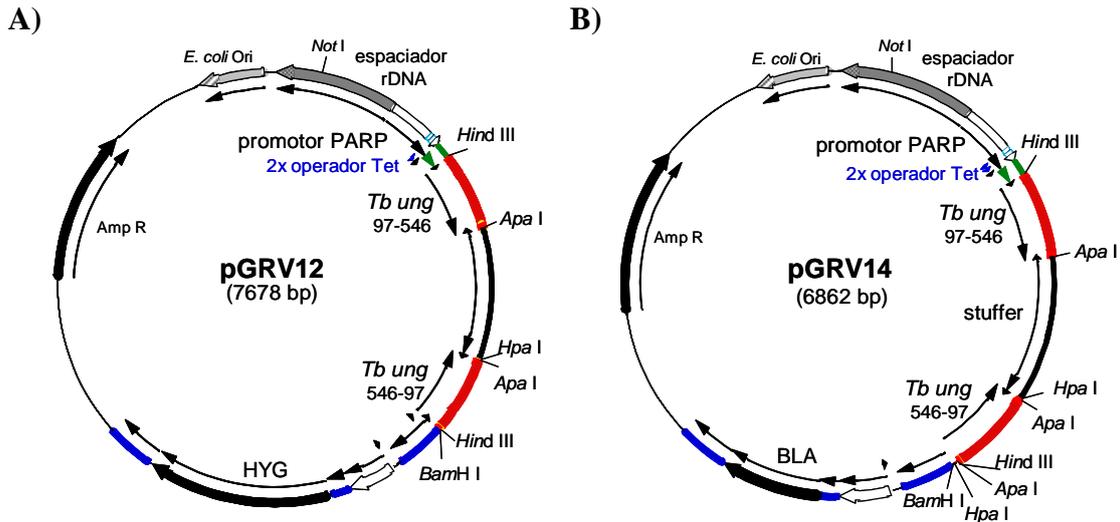


Figura D.V.15. Plásmidos de transfección pGRV12 y pGRV14 para generar silenciamiento del gen *UNG* de *T. brucei*. A) pGRV12; B) pGRV14.

D.V.9.2. Transfección de *T. brucei*.

La transfección de células de *Trypanosoma brucei* se realizó mediante electroporación siguiendo las condiciones descritas en el apartado B.II.1.1.4 de Materiales y Métodos. El plásmido pGRV12 se utilizó para transfectar la línea celular *T. brucei* 449 (forma procíclica), y el plásmido pGRV14 la línea *T. brucei* 449 pGRV6 (forma procíclica). La selección de los clones se realizó por dilución límite según las siguientes condiciones:

- Para el plásmido pGRV12, 50.0 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de higromicina en *T. brucei* 449.
- Para el plásmido pGRV14, 10.0 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de blasticidina en *T. brucei* 449 pGRV6.

Una vez obtenidos los clones fueron almacenados a -80°C durante un corto periodo de tiempo y en nitrógeno líquido durante largos periodos de tiempo como se describe en el apartado B.II.1.1.2, hasta su utilización para llevar a cabo los diferentes estudios.

D.V.9.3. Estudio del efecto del RNAi de la UNG y del doble RNAi de la dUTPasa y UNG sobre el crecimiento celular y análisis de los niveles de proteína

En primer lugar se estudió el fenotipo sobre el crecimiento celular del silenciamiento del gen de la uracil DNA glicosilasa. Para ello se indujo el fenómeno del RNAi con doxiciclina (DOX) con ambas construcciones y en las distintas líneas celulares como se detalla en el apartado B.II.6.2.

D.V.9.4. Silenciamiento del gen de la UNG

En el caso de la forma procíclica (Figura D.V.16), se estudió el efecto del RNA de interferencia de la línea celular *T. brucei* 449 pGRV12 en el medio de cultivo SDM-79 suplementado con un 10 % de suero bovino fetal inactivado (SBF). La expresión de RNA de doble cadena no produjo alteraciones en el crecimiento celular a lo largo del estudio.

Los niveles de RNA mensajero del gen *UNG* se determinaron para los cultivos inducidos y no inducidos mediante la técnica de *northern blot*, utilizando una sonda de DNA preparada a partir de la secuencia de DNA del gen de la UNG que no estuviera contenido en el fragmento seleccionado para generar el silenciamiento. Como se puede ver, los niveles de RNA mensajero disminuyen tras la inducción del RNAi un 80 %.

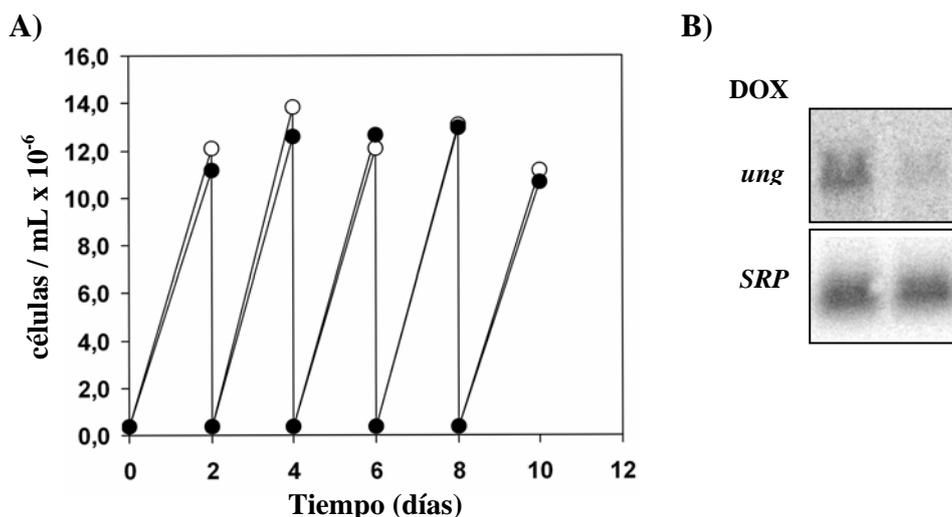


Figura D.V.16. Efecto del RNAi sobre el crecimiento celular y niveles de RNA mensajero del gen *UNG* de *T. brucei* 449 pGRV12. A) Curva de crecimiento de *T. brucei* 449 pGRV12. B) Niveles de RNA mensajero del gen de la UNG en ausencia o presencia de doxiciclina a las 24 horas post-inducción, determinados por *northern blot* y normalizados con la sonda SRP (Estevez *et al.*, 2001).

D.V.9.5. Silenciamiento de los genes de la dUTPasa y UNG

El efecto del doble RNA de interferencia en la línea celular *T. brucei* 449 pGRV6.14 se estudió en el medio de cultivo SDM-79 suplementado con un 10 % de suero bovino fetal inactivado (SBF). La inducción del RNAi produjo una inhibición del crecimiento a partir del segundo día post-inducción hasta alcanzar un máximo del 80 % en el octavo día. En comparación con los RNAi de los genes *DUT* y *UNG* por separado, la doble interferencia incluso acentúa el fenotipo de pérdida de viabilidad existente en el caso del gen *DUT* en el medio de cultivo SDM-79.

Paralelamente al estudio del crecimiento se analizaron los niveles de RNA mensajero del gen *UNG* para los cultivos inducidos y no inducidos mediante la técnica de *northern blot*, utilizando una sonda de DNA preparada a partir de la secuencia de DNA del gen de la UNG que no estuviera contenida en el fragmento seleccionado para generar el silenciamiento. En el caso del gen *DUT* se determinaron los niveles de proteína mediante *western blot*. Los resultados muestran una depleción en los niveles de dUTPasa del 95 % mientras que los niveles de RNA mensajero del gen *UNG* sólo disminuyeron un 40 %.

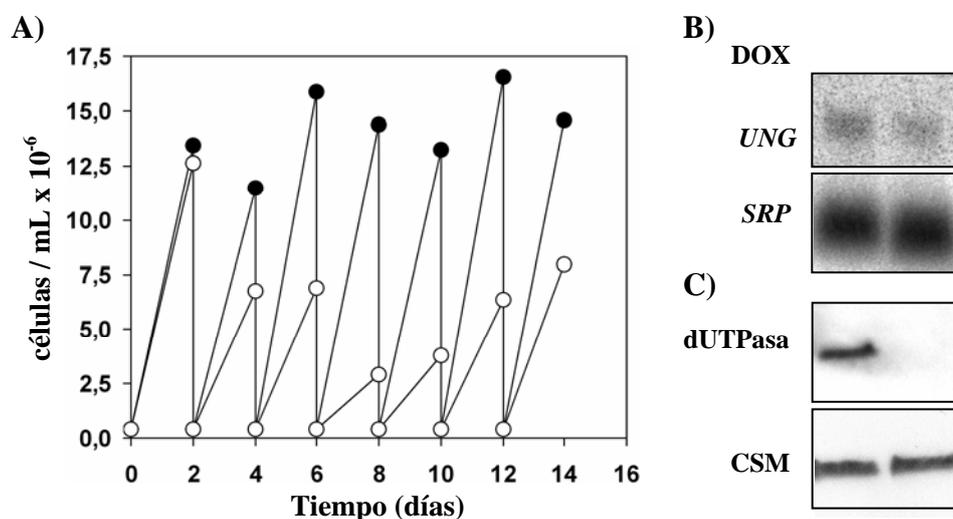
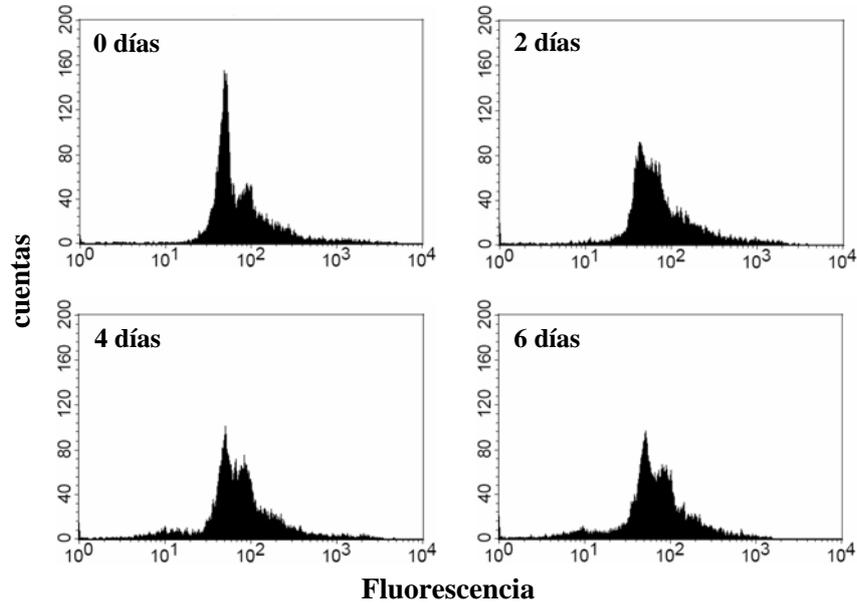


Figura D.V.19. Efecto del doble RNAi sobre el crecimiento celular y niveles de RNA mensajero del gen *UNG* y de proteína de la dUTPasa de *T. brucei* 449 pGRV6.14. A) Curva de crecimiento de *T. brucei* 449 pGRV6.14. B) Niveles de RNA mensajero del gen de la UNG en ausencia o presencia de doxicilina, determinados por *northern blot* y normalizados con la sonda SRP (Estevez *et al.*, 2001). C) Niveles de dUTPasa en ausencia o presencia de doxicilina, determinados por *western blot* y normalizados con el anticuerpo CSM (Guerra-Giraldez *et al.*, 2002).

D.V.9.6. Efecto del doble RNAi de los genes *DUT* y *UNG* sobre el ciclo celular

Se ha realizado un análisis mediante citometría de flujo de células en las que se había inducido el RNAi tanto del gen *DUT* como del *UNG* (Figura D.V.20). En este caso hubo una disminución drástica de células en fase G1 (66 % a 46 %), un aumento de células en fase G2/M (19 % a 25 %), así como un aumento de células en fase S (del 12 % al 20 %). Menos pronunciado fue la presencia del llamado pico sub-G1 que corresponde a células con DNA fragmentado que aumenta hasta constituir el 9 % del total. El análisis morfológico puso de manifiesto de manera más detallada las alteraciones en la mitosis y citocinesis (Figura D.V.21). Así la población 1N*1K pasó a ser un 28 % del total de células. También fue muy significativo el aumento de células 1N*2K que aumentó hasta un 20 %. Nuevamente se observó una elevada proporción de zoides (aproximadamente el 18 %) y de células XNXX.

A)



B)

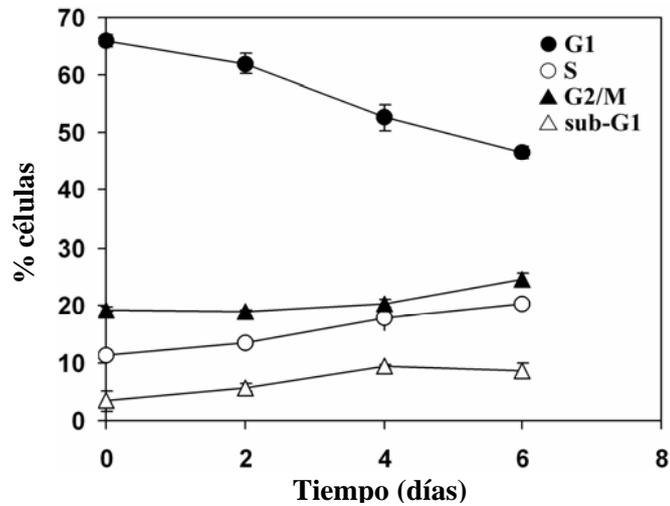
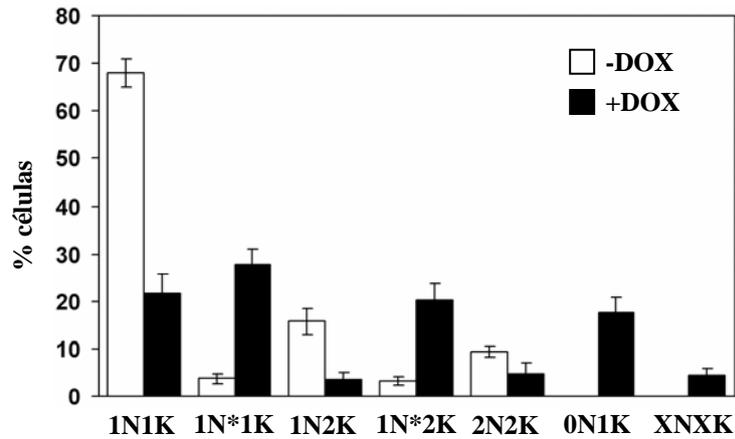


Figura D.V.20. Distribución poblacional en el ciclo celular de *T. brucei* bajo condiciones del doble silenciamiento de los genes *DUT* y *UNG*. A) Análisis de la citometría de flujo a diferentes tiempos tras la inducción del doble RNAi de la dUTPasa y *UNG*. B) Representación gráfica del porcentaje de células en cada fase del ciclo celular a lo largo del tiempo: fase G1(●); fase S (○); fase G2/M (▲); y pico sub-G1 (△). Los resultados son el promedio de dos ensayos por separado.

A)



B)

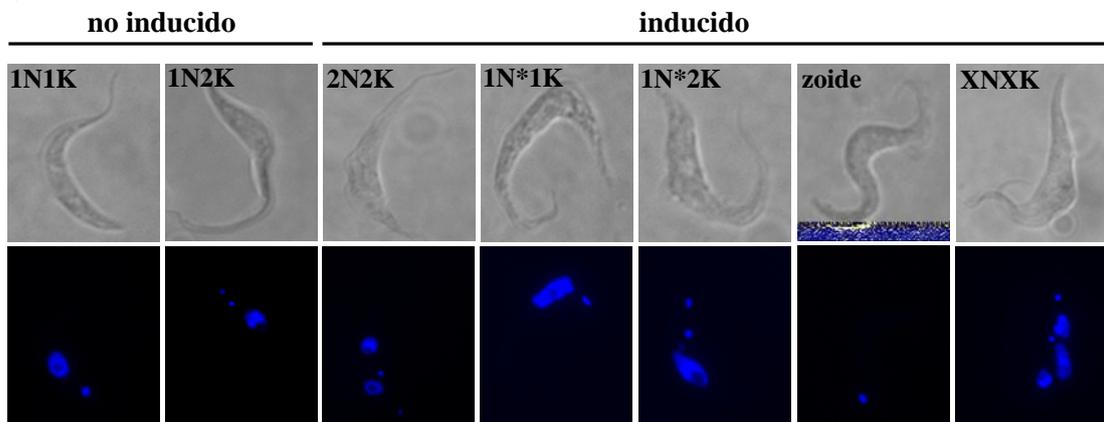


Figura D.V.21. Morfología de la forma procíclica de *T. brucei* bajo condiciones del doble silenciamiento de los genes *DUT* y *UNG*. Células de la línea celular *T. brucei* 449 pGRV6.14, después de seis días en ausencia (no inducido) o en presencia (inducido) de doxiciclina, fueron teñidas con DAPI y analizadas en un microscopio de fluorescencia. A) Cuantificación de las células con diferente morfología tras la inducción del doble RNAi de la dUTPasa y UNG. El número de núcleos (N) y de kinetoplastos (K) de cada célula individual se determinó mediante un microscopio de fluorescencia. Los resultados se representan como el promedio de tres grupos individuales de > 100 células y con un error correspondiente a la desviación estándar. B) Contraste interdiferencial de fase y tinción con DAPI de las poblaciones donde el doble RNAi no ha sido inducido: 1N1K; 1N2K; 2N2K, o tras la inducción del doble RNAi: 1N*1K, 1N*2K, 0N1K (zoides) y XNXX.

DISCUSIÓN

E. DISCUSIÓN

El control de las enfermedades parasitarias supone en la actualidad un serio problema tanto sanitario como socioeconómico en todo el mundo. La mayoría de los protozoos patógenos presentan una gran versatilidad, tanto biológica como bioquímica, que les permite desarrollar con relativa facilidad mecanismos de resistencia frente a una gran variedad de fármacos. Estos problemas hacen que sea imprescindible el desarrollo de nuevas terapias que complementen los fármacos actuales, muchos de los cuales fueron desarrollados hace mucho tiempo y han perdido parte de la eficacia inicial debido a la aparición de resistencias.

El mayor conocimiento de la bioquímica y biología molecular de los parásitos protozoos ha permitido la identificación de diferencias significativas con respecto a las células del hospedador humano. Es de esperar que los estudios realizados en este campo permitan llevar a cabo un diseño racional de nuevos fármacos que presenten una mayor eficacia y una menor toxicidad.

Una ruta metabólica atractiva para el desarrollo de nuevos fármacos ha sido la síntesis *de novo* de nucleótidos pirimidínicos y en particular se ha estudiado en detalle la enzima bifuncional dihidrofolato reductasa-timidilato sintasa (Ivanetich y Santi, 1990; Reche *et al.*, 1994). El conocimiento de la estructura tridimensional de la enzima de *Leishmania major* (Knighton *et al.*, 1994) ha permitido el desarrollo de antifolatos específicos frente a la enzima (Chowdhury *et al.*, 1999) y la descripción de cepas resistentes a antifolatos a través de distintos mecanismos (Arrebola *et al.*, 1994; Olmo *et al.*, 1995; Robello *et al.*, 1997) ha permitido conocer las bases moleculares de la resistencia en estos organismos.

Otra enzima de la misma ruta, la dUTPasa, constituye una atractiva diana de la acción de fármacos en diversos organismos. En *Saccharomyces cerevisiae* se ha demostrado que la actividad dUTPasa es un punto crítico en el mantenimiento de la estabilidad genética mostrando su carácter esencial (Guillet *et al.*, 2006). En *E. coli* la delección del gen *dut* es letal (el-Hajj *et al.*, 1992) y en virus, inserciones o deleciones en el gen de la dUTPasa, afectan severamente a la replicación y disminuyen la carga viral en células no proliferativas (Chen *et al.*, 2002), además de presentar una incapacidad de infectar dichas células así como disminuir la virulencia debido a la insuficiente actividad dUTPasa (Pyles *et al.*, 1992). En células humanas son varias las evidencias de

la importancia de esta enzima. Así, la disminución de actividad dUTPasa produce un incremento del dUTP intracelular y una menor proliferación (Williams y Studebaker, 2004) y células tumorales que expresan altos niveles de dUTPasa son más resistentes a agentes quimioterapéuticos como el 5-fluorouracilo (5-FU) (Canman *et al.*, 1993) o el metotrexato (Parsels *et al.*, 1998). Recientemente, esta enzima se ha propuesto como una interesante diana para el desarrollo de fármacos antimaláricos debido a la correlación existente entre la inhibición de la enzima y la inhibición del crecimiento de *P. falciparum* (Nguyen *et al.*, 2005).

La enzima de los tripanosomátidos presenta grandes diferencias a nivel de estructura primaria como cuaternaria con la enzima humana, por lo que se ha propuesto como una potencial diana farmacológica para el desarrollo de inhibidores para combatir las enfermedades causadas por este tipo de organismos. El trabajo desarrollado en la presente Tesis se ha planteado con el fin de estudiar la función de la dUTPasa de *Trypanosoma brucei* y analizar su papel en la proliferación y ciclo celular en tripanosomátidos. Las importantes diferencias con la homóloga en función en mamíferos, así como el papel primordial que desempeña esta enzima en la célula, sugieren que el diseño de nuevos inhibidores frente a la dUTPasa puede constituir un punto de partida para el desarrollo de una terapia frente a enfermedades parasitarias.

E.I. LA dUTPasa DE *Trypanosoma brucei* ES UNA ENZIMA DIMÉRICA QUE PERTENECE A LA FAMILIA DE TODO- α NUCLEÓTIDO HIDROLASAS

La pauta abierta de lectura del gen *DUT* codifica una proteína de 287 aminoácidos, con una masa molecular teórica de 31987.1 Da y un punto isoeléctrico teórico de 5.53. La secuencia primaria de la proteína se encuentra muy conservada con respecto a dUTPasas descritas en tripanosomátidos, presentando una identidad del 53-55 %. En lo que se refiere a otras dUTPasas, como la humana o la de *P. falciparum*, presenta una similitud del 14 y 20 % respectivamente. Las dUTPasas se pueden clasificar en tres grupos dependiendo de la estructura cuaternaria que adopten: triméricas, las que poseen la mayoría de los organismos desde bacterias, arqueobacterias, virus hasta eucariotas; diméricas, a las que pertenecen las enzimas de los

tripanosomátidos; y monoméricas a las que pertenecen las de los herpesvirus (Moroz *et al.*, 2004).

La estructura cuaternaria de la enzima de *T. brucei* se determinó tras el establecimiento de la masa molecular nativa de la dUTPasa mediante cromatografía de exclusión molecular, demostrando que la unidad funcional de la enzima es un homodímero al igual con lo que ocurre en las otras enzimas de los tripanosomátidos.

Hasta la fecha, se han publicado las estructuras de rayos-X de varias dUTPasas triméricas: dos bacterianas, una de mamíferos, la de *Plasmodium falciparum* y dos retrovirales. Todas ellas presentan tres sitios activos idénticos situados en la interfase de las subunidades y cada uno de ellos está formado por residuos de las tres subunidades y contiene los cinco motivos altamente conservados. Dos subunidades están implicadas en el reconocimiento de la base y del azúcar, mientras que la tercera presenta un motivo flexible rico en glicinas localizado en el extremo C-terminal que cierra el sitio activo durante la catálisis. Se piensa que las dUTPasas monoméricas, características de los herpesvirus de mamíferos, están relacionadas evolutivamente con la familia de las triméricas ya que comparte propiedades catalíticas y los mismos motivos conservados, aunque dichos motivos se ordenan de diferente manera (Nguyen *et al.*, 2005). Las enzimas triméricas presentan una estructura formada casi exclusivamente por láminas β -plegadas y se les denomina de forma genérica todo β -nucleótido hidrolasas.

Las enzimas diméricas de *T. cruzi* y *C. jejuni* han sido cristalizadas recientemente. Al contrario de las triméricas, están constituidas casi exclusivamente por hélices α y su identificación estructural ha permitido la descripción de una superfamilia de nucleótido hidrolasas todo- α que engloba a proteínas como MazG y RS21-C6 (Wu *et al.*, 2007). Presentan un cuerpo rígido que permanece estático durante la unión del sustrato, mientras que otro dominio móvil sufre reordenamientos para acomodar dicho sustrato durante la unión a la enzima. El alineamiento de las dUTPasas diméricas conocidas confirma la existencia de cinco motivos conservados totalmente diferentes a los de las dUTPasas triméricas. A partir de la estructura tridimensional del complejo dUTPasa-dUDP de *T. cruzi* se ha demostrado que todos los residuos de estos motivos conservados están localizados en el sitio activo y están directamente implicados en la unión y catálisis del dUDP (Harkiolaki *et al.*, 2004; Moroz *et al.*, 2004). La enzima de *T. brucei* es altamente homóloga a las enzimas de *T. cruzi* y *Leishmania major* y conserva los aminoácidos implicados en las interacciones establecidas con la base de uracilo, el

proteínas de protozoos de la familia *Trypanosomatidae* sugiere que la dUTPasa de *T. brucei* corresponde a una enzima todo- α nucleótido hidrolasa de la familia de las dUTPasas diméricas.

E.II. CARACTERIZACIÓN CINÉTICA DE LA dUTPasa DE *Trypanosoma brucei*

La dUTPasa de *T. brucei* y en general todas las dUTPasas tienen dos funciones muy importantes en la célula: el mantenimiento de unos niveles correctos de dUTP para evitar su incorporación errónea al DNA durante la replicación, y proporcionar mediante la hidrólisis del dUTP el sustrato para la síntesis del nucleósido trifosfato de timina (dTTP). Un estudio cinético detallado ha permitido hacer una comparación de esta enzima con las descritas con anterioridad tanto en *Leishmania major* (Hidalgo-Zarco *et al.*, 2001) como en *T. cruzi* (Bernier-Villamor *et al.*, 2002).

Las constantes cinéticas obtenidas para la hidrólisis del dUTP fueron similares a las descritas para otras dUTPasas (Tabla E.II.1) si bien la k_{cat} fue algo más baja que la de la enzima de *Leishmania major*.

Organismo	K_m (μM)	K_{ip} (dUMP) (μM)	k_{cat} (s^{-1})	k_{cat}/K_m ($\text{M}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$)	Referencia
<i>T. brucei</i>	1.79	18.1	9.7	5.4×10^6	Castillo-Acosta, Tesis Doctoral, 2007
<i>L. major</i>	2.11	13.05	49.0	2.3×10^7	(Hidalgo-Zarco <i>et al.</i> , 2001)
<i>T. cruzi</i>	0.5	18.4	2.8	5.2×10^6	(Bernier-Villamor <i>et al.</i> , 2002)
<i>H. sapiens</i>	0.1	162	2.7	2.0×10^7	Nord, Tesis Doctoral, 2000
<i>E. coli</i>	0.2	1500	9.0	4.5×10^7	(Larsson <i>et al.</i> , 1996)
<i>P. falciparum</i>	2.4	164	9.3	3.9×10^6	(Nguyen <i>et al.</i> , 2005)
EIAV	1.1	130	1.1	2.0×10^7	(Nord <i>et al.</i> , 1997)
MMTV	0.8	-	1.5	1.9×10^6	(Bjornberg y Nyman, 1996)
HSV-1	0.3	170	0.3	4.0×10^7	(Bergman <i>et al.</i> , 1998)

Tabla E.II.1. Comparación de las constantes cinéticas de distintas dUTPasas. EIAV (virus de la anemia infecciosa equina); HSV-1 (virus de herpes simple tipo 1); MMTV (virus del tumor mamario de ratón).

Una de las características más destacables de las dUTPasas es que presentan un valor bajo de K_m para el dUTP. Este hecho sugiere que la elevada toxicidad de este nucleótido para la célula habría ejercido una presión biológica promoviéndose una evolución de la enzima hasta alcanzar valores bajos de K_m , de tal manera que es capaz de seleccionar eficazmente este nucleótido no canónico de una mezcla de nucleótidos canónicos que pueden estar en un exceso de hasta 1000 veces, evitando de esta manera la incorporación errónea de uracilo al DNA (Larsson *et al.*, 1996; Galperin *et al.*, 2006).

Una diferencia de la familia de dUTPasas diméricas es la elevada inhibición por el producto de la reacción, dUMP, con un valor de $K_{ip} = 18.1 \mu\text{M}$ en el caso de la enzima de *T. brucei*. Así la constante de inhibición es entre 10 y 100 veces mayor que para las dUTPasas triméricas, lo que indica un potencial sistema de regulación en el contexto celular. En condiciones fisiológicas normales, el dUMP es utilizado eficientemente por la timidilato-sintasa (Reche *et al.*, 1994), mientras que un aumento intracelular de este compuesto en condiciones en que la síntesis de timidina está inhibida conllevaría una inhibición de la dUTPasa, un acúmulo de dUTP y una potenciación de la muerte celular por falta de timina.

El valor de k_{cat} obtenido para la dUTPasa de *T. brucei* es del mismo orden que el de otras dUTPasas descritas hasta la fecha y presenta valores del orden de 10^3 - 10^4 veces inferiores a los encontrados para otras enzimas relacionadas, como por ejemplo la UDP-glucosa-pirofosfatasa, la cual cataliza la transferencia de UMP desde el UTP hasta la glucosa 1-fosfato. Esta clase de enzimas, sin embargo, presentan una menor capacidad de discriminación del sustrato, pudiendo actuar sobre varios nucleósidos trifosfato y hexosas fosfato (Turnquist y Hansen, 1973). En el caso de las dUTPasas, la necesidad de eliminar el dUTP de la mezcla de nucleótidos esenciales para la célula, entre los cuales existe una elevada similitud, explicaría que estas enzimas hubieran desarrollado una elevada especificidad de sustrato, sacrificando para ello una posible mayor velocidad de catálisis. Esta especificidad de sustrato puede medirse mediante el valor de k_{cat}/K_m , que oscila entre 10^6 y $10^7 \text{ M}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$ lo que es característico de enzimas altamente específicas.

E.II.1. Requerimiento de iones divalentes

Todas las dUTPasas descritas hasta la fecha muestran una dependencia de iones divalentes, en cuya ausencia la enzima pierde toda la capacidad de catálisis. Generalmente, el ión divalente es el magnesio aunque la enzima presenta actividad en presencia de otros iones divalentes. De esta forma, el verdadero sustrato de la dUTPasa es el dUTP-magnesio. De hecho, se ha descrito que la ausencia de magnesio disminuye la unión del dUTP y dUDP a la dUTPasa de *E. coli* (Larsson *et al.*, 1996).

En el caso de dUTPasas diméricas, la determinación de la estructura del complejo de la enzima de *C. jejuni* con el dUpNHp ha permitido identificar la presencia de tres iones magnesio formando un complejo con un índice de coordinación 6. Dos de los iones magnesio coordinan una molécula de agua, la cual podría ser la responsable del ataque nucleofílico, orientándola correctamente para que tenga lugar un ataque lineal sobre el grupo fosfato β del nucleótido dUTP. Además, los tres iones magnesio favorecen la salida del grupo saliente, dUMP, una vez terminada la reacción (Moroz *et al.*, 2004).

En el caso de dUTPasas triméricas, el análisis del complejo enzima-dUTP en ausencia de magnesio, reveló que la enzima conserva capacidad para unir el sustrato, pero se postula que se requiere la presencia del metal para ordenar correctamente una parte flexible de su estructura y de esta forma cerrar el sitio activo para ejecutar la hidrólisis. Se piensa por tanto que el magnesio debe establecer interacciones con ciertos residuos del motivo 5 que se sitúan en la región flexible y que participarían en aproximar los residuos catalíticos de la proteína al enlace entre los fosfatos α y β (Mol *et al.*, 1996). Asimismo, estudios estructurales de la enzima de FIV (virus de la inmunodeficiencia felina) confirman esta teoría, ya que también ha sido imposible ordenar esa zona flexible en ausencia de magnesio (Prasad *et al.*, 2000).

La dUTPasa de *T. brucei* tiene una dependencia de magnesio similar a la descrita para el resto de dUTPasas diméricas, alcanzando un máximo de actividad en presencia de de 50 mM de $MgCl_2$. El magnesio puede ser sustituido de forma efectiva por otros iones divalentes como el cobalto o el manganeso pero no por calcio, produciéndose un aumento en el valor de K_{map} y una ligera disminución de la actividad específica. Esta observación estaría de acuerdo con un papel estructural similar al descrito en la dUTPasa humana y del FIV, es decir, el mayor valor de radio iónico de los iones divalentes

perturba la adecuada unión del sustrato a la enzima, provocando un aumento en la K_{map} . De acuerdo con esta hipótesis el magnesio no puede ser sustituido por el calcio, debido a su elevado volumen.

E.II.2. El dUDP, un sustrato de la dUTPasa de *T. brucei*

Una de las peculiaridades más llamativas de la dUTPasa de *T. brucei* es la capacidad de hidrolizar eficientemente el dUDP. Esta característica es compartida con las dUTPasas de la familia de las diméricas, así como con las dUTPasas-dCTPasas de los fagos T2 y T4 de *E. coli*, los cuales tienen la propiedad de hidrolizar de forma eficiente los derivados difosfato dCDP y dUDP (Greenberg, 1966; Warner y Barnes, 1966). La analogía funcional apoyaría nuevamente la hipótesis de un origen ancestral común de todas estas enzimas que componen la familia de las dUTPasas diméricas.

En las otras familias de dUTPasas, el dUDP se comporta como un inhibidor competitivo, presentando valores de K_i entre 3 y 17 μM (Larsson *et al.*, 1996; Nord *et al.*, 1997). De hecho, a partir de la estructura del complejo dUTPasa-dUDP del FIV se ha establecido el papel del fosfato γ , cuya ausencia no permite una correcta ordenación del brazo flexible y una orientación adecuada del sustrato en el sitio activo, impidiéndose por lo tanto la hidrólisis (Prasad *et al.*, 2000).

Esta capacidad de hidrolizar el dUDP parece en principio una ventaja adicional para el mantenimiento de los niveles intracelulares de dUTP y dUMP. El dUDP es un metabolito intermedio que se genera como consecuencia de la reducción de UDP por la enzima ribonucleótido reductasa o bien por una fosforilación de dUMP en ocasiones en las que se produce una acumulación de este nucleótido. En situaciones normales el dUDP sufre una fosforilación a dUTP, el cual a continuación sería hidrolizado por la dUTPasa. La conversión de dUDP a dUMP en *T. brucei* se anticipa a la fosforilación, canalizando de forma más efectiva el tráfico de los desoxirribonucleótidos de uracilo hacia la formación de derivados de timina.

La enzima presenta valores de constante de especificidad (k_{cat}/K_m) del mismo orden para ambos sustratos. La menor K_m para el dUTP podría justificarse en base a la mayor toxicidad celular de este nucleótido y por lo tanto la necesidad mantener los niveles suficientemente bajos como para evitar su incorporación al DNA por la DNA polimerasa, aunque la velocidad de reacción sea parecida.

La finalización del proyecto genoma ha permitido establecer un mapa metabólico de las distintas reacciones implicadas en la síntesis *de novo* de pirimidinas así como las rutas de recuperación de pirimidinas. Este análisis junto con la búsqueda en bases de datos de GeneDB (www.genedb.org) de ortólogos de la dCTP desaminasa y de la dCMP desaminasa ha puesto de manifiesto que en *T. brucei* no existe ninguna enzima que lleve a cabo la desaminación del nucleótido de citosina tanto a nivel trifosfato (dCTP desaminasa), como ocurre en procariotas, como en la forma monofosfato (dCMP desaminasa), como tiene lugar en eucariotas. Sin embargo, se ha identificado una posible citidina desaminasa (Tb09.160.1680) que podría catalizar la desaminación de la citidina a uracilo en la forma tanto de ribonucleósido como desoxirribonucleósido (desoxicitidina a desoxiuridina) pero nunca en la forma de nucleótido. Por otra parte la caracterización de la especificidad de la ribonucleótido reductasa de tripanosomátidos pone de manifiesto que es capaz de reducir únicamente nucleósido difosfato y no los trifosfato (Hofer *et al.*, 1998). Esto sugiere que la totalidad del dUMP para la síntesis *de novo* de dTMP procede exclusivamente del UMP que mediante una fosforilación por una posible uridilato quinasa seguido de una reducción por medio de la ribonucleósido difosfato reductasa daría lugar a dUDP. Una vez sintetizado el dUDP, la reacción catalizada por la dUTPasa sería un paso obligado para la producción de dUMP. El dUDP sería fosforilado a dUTP por la nucleósido difosfato quinasa o hidrolizado directamente a dUMP por medio de la dUTPasa. Estas evidencias sugieren que la dUTPasa ha evolucionado en estos organismos hacia la capacidad de hidrólisis de ambos nucleótidos (dUTP y dUDP) para asegurar una eficiente síntesis de dUMP y finalmente de timidilato. Por lo tanto de acuerdo con estas consideraciones el papel de la dUTPasa en la ruta de biosíntesis *de novo* de pirimidinas sería esencial.

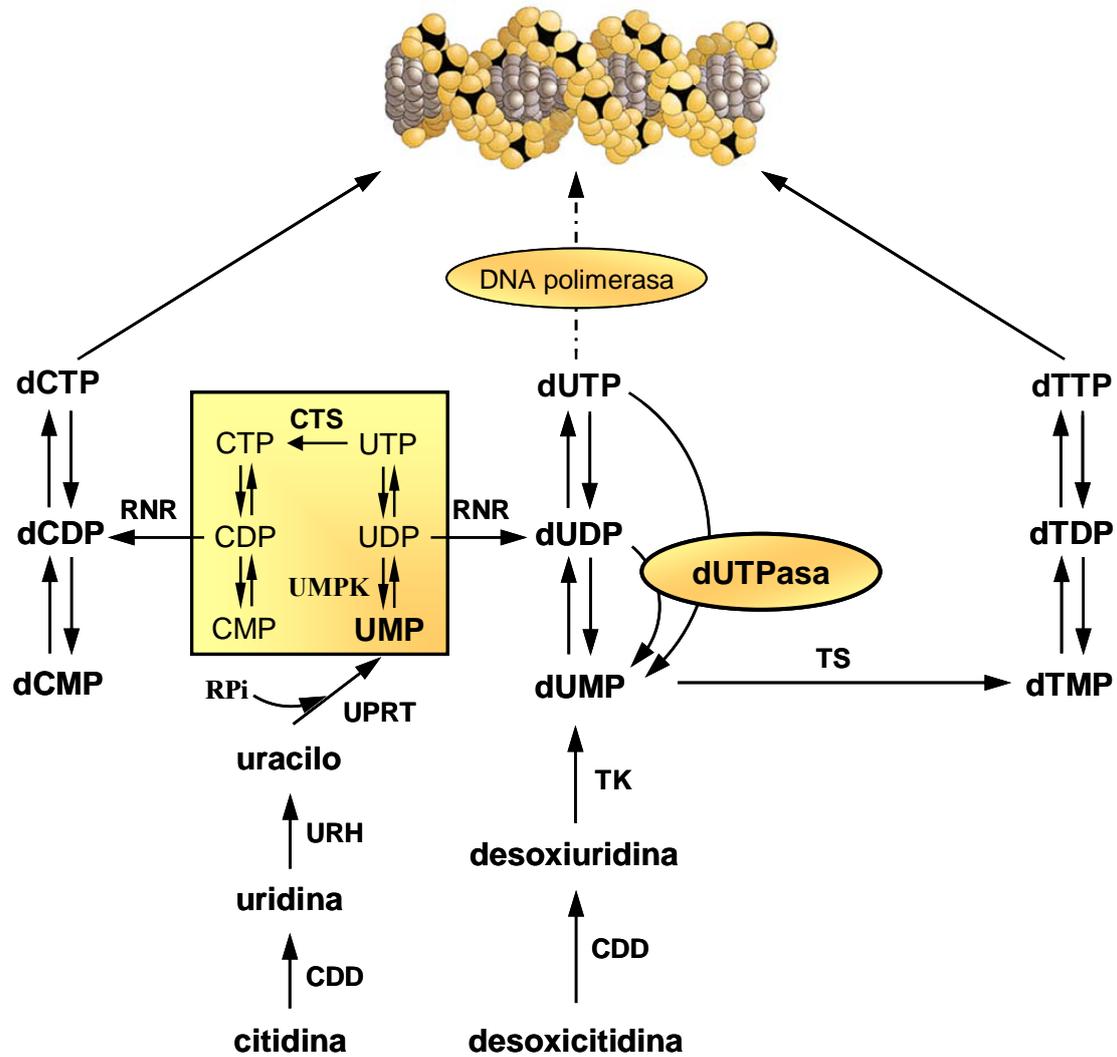


Figura E.II.1. Biosíntesis de nucleótidos de pirimidina a partir de UMP y ruta de recuperación del uracilo. CTS, citidina trifosfato sintasa; RNR, ribonucleótido reductasa; TS, timidilato sintasa; dUTPasa, desoxiuridina trifosfato nucleótido hidrolasa; CDD, citidina desaminasa; URH, uridina ribohidrolasa; UPRT, uracil fosforribosil transferasa; UMPK, uridilato quinasa; TK, timidina quinasa; RPi, grupo ribosa fosfato.

E.II.3. Especificidad de sustrato de la dUTPasa de *T. brucei*

Otra característica destacada de la dUTPasa de *T. brucei* es la alta capacidad de discriminación tanto de la base como del azúcar del sustrato, demostrando ser una enzima muy específica para el dUTP de entre todos los nucleótidos trifosfato. No se estudió la posible hidrólisis de todos los nucleósidos difosfato habituales en la célula, pero los datos obtenidos con los derivados trifosfato inducen a pensar que es probable

que los correspondientes nucleósidos difosfato no sean buenos sustratos, teniendo en cuenta que la falta de actividad se debe a la discriminación de la base y/o azúcar del nucleótido y no a la agrupación trifosfato.

En condiciones en las que tiene lugar una hidrólisis completa del dUTP no se apreció actividad sobre ninguno de los demás nucleótidos ensayados. A partir de la estructura de la enzima de *T. cruzi* se ha determinado que las características del ligando son reconocidas por reordenamientos estructurales específicos, los cuales confieren la alta selectividad de unión en el sitio activo. La base de uracilo se une a la enzima a través de enlaces de hidrógeno selectivos que se establecen con los átomos de la cadena lateral de los residuos Asn26, Gln22 y Trp61. Cuando se produce un cambio en la base del nucleótido, como es el caso del dCTP, se produce una exclusión del sitio activo por una repulsión entre el residuo Trp61 y el grupo amino radial de la citosina debido a las cargas parciales positivas de ambos grupos. En el caso del dTTP, el plano del uracilo es posicionado próximo y en ángulo recto al plano del residuo Trp62, por lo tanto la timina no podría acomodarse en este sitio debido a impedimentos estéricos causados por el grupo metilo de dicha base. En lo que se refiere a la especificidad sobre el azúcar, la desoxirribosa se encuentra entre dos residuos aromáticos (Phe84 y His83) y forma enlaces de hidrógeno con la Asn201. Estos residuos excluyen la ribosa del UTP y la impiden colocarse en la hendidura de la estructura formada por estos residuos ya que el grupo hidrófilo extra de la ribosa podría forzar un enfrentamiento del ligando con los respectivos planos de los residuos implicados. Finalmente, en lo que se refiere a la agrupación fosfato, son necesarios al menos dos grupos fosfato para el completo reclutamiento del dominio móvil hacia la conformación activa generando el número de enlaces de hidrógeno formados entre el fosfato β y los residuos de este dominio (Harkiolaki *et al.*, 2004).

Todos los residuos implicados en la discriminación del sustrato de la enzima de *T. cruzi* se encuentran en la enzima de *T. brucei* lo que hace pensar que la especificidad de esta enzima se pueda explicar de la misma manera que la enzima de *T. cruzi*.

En definitiva la dUTPasa de *T. brucei* presenta un conjunto de propiedades que están de acuerdo con su papel central en la eliminación del dUTP de la mezcla intracelular de nucleótidos

E.III. LOCALIZACIÓN INTRACELULAR DE LA dUTPasa DE *Trypanosoma brucei*

Mientras que la biosíntesis de pirimidinas es un proceso citosólico en muchos organismos (Evans y Guy, 2004) existen evidencias de que enzimas como la ribonucleótido reductasa, timidilato sintasa y la dUTPasa se encuentran asociadas a la maquinaria de replicación. De acuerdo con esta observación la dUTPasa estaría asociada a la horquilla de replicación e impidiendo *in situ* la incorporación del dUTP al DNA. Por otra parte, a diferencia de la mayoría de los eucariotas que tienen cientos de mitocondrias individuales, los tripanosomas contienen una única mitocondria. El DNA mitocondrial de tripanosomátidos es único y característico ya que está constituido por una red de numerosos círculos de DNA interconectados entre si formando una estructura discooidal denominada kinetoplasto. La replicación del kinetoplasto y del DNA nuclear tiene lugar de forma independiente y es lógico pensar que en cada organelo existe una maquinaria de replicación eficiente aunque se han descrito proteínas que son específicas de la replicación del kinetoplasto (Liu *et al.*, 2005).

Los resultados obtenidos en este estudio tanto a partir de datos de inmunofluorescencia con el anticuerpo antiTbdUPasa de *T. brucei* como del análisis por microscopía electrónica de parásitos inmunomarcados con oro coloidal en tripomastigotes de la forma procíclica de *T. brucei* salvaje revelaron una clara localización nuclear. No se encontró proteína asociada al kinetoplasto donde se encuentra el DNA de la única mitocondria que poseen estos parásitos. En el caso de la enzima de *T. brucei*, el hecho de que sólo se encuentre en el núcleo y no en el kinetoplasto es llamativo. Es posible que los niveles de dUTP en la mitocondria se regulan mediante procesos que impiden la interiorización o la síntesis de este nucleótido.

En la mayoría de organismos eucariotas, las dUTPasas presentan una localización nuclear. Así mismo, la dUTPasa codificada por distintas especies de herpesvirus, como HSV-1 (Wohlrab *et al.*, 1982) o PrV (Jons y Mettenleiter, 1996) se encuentra principalmente en el núcleo de la célula huésped, aunque excepcionalmente se puede encontrar actividad en citoplasma como en el caso de HSV-2 (Wohlrab *et al.*, 1982) o RGV (*Rana grylio virus*) (Zhao *et al.*, 2007). En el caso de la enzima humana, existen dos isoformas de dUTPasa codificadas por un mismo gen con una localización

dual; nuclear (DUT-N) y mitocondrial (DUT-M), las cuales surgen por el uso de exones 5' alternativos para dar lugar al transcrito (Ladner *et al.*, 1996).

En el caso de los fagos T2 y T4 de *E. coli* la dUTPasa-dCTPasa se encuentra formando un complejo multienzimático denominado T4 desoxirribonucleósido trifosfato (dNTP) sintasa, en las que participan al menos ocho enzimas codificadas por el fago y dos codificadas por la célula huésped (Chiu *et al.*, 1977; Wheeler *et al.*, 1996).

Una predicción de las posibles interacciones entre la dUTPasa y otras proteínas en bases de datos de *Saccharomyces* (<http://string.embl.de>) indican la existencia de probables interacciones con enzimas de diversas rutas como la biosíntesis de pirimidinas (timidilato sintasa, desoxicitidilato desaminasa, nucleosido difosfato quinasa, timidilato quinasa, uridilato quinasa), reparación por escisión de bases (uracil DNA glicosilasa, AP endonucleasa 1, AP endonucleasa 2), reparación por escisión de nucleótidos (endonucleasa de DNA de cadena simple (RAD1)), replicación de DNA (PCNA) además de otras rutas metabólicas.

Finalmente en *Drosophila* se han identificado patrones de interacción de la dUTPasa mediante varias técnicas (estudios comparativos de *Western* y *far-Western blots* y mediante *surface plasmon resonance sensograms*) los cuales dependen del desarrollo. Sin embargo es necesario corroborar estos resultados mediante otras técnicas (Bekesi *et al.*, 2004)

En el presente trabajo se han realizado intentos de establecer la posible asociación de la dUTPasa de *T. brucei* con otras proteínas nucleares mediante la utilización del “TAP-tag” y el aislamiento de complejos. Pero desafortunadamente en las condiciones estudiadas no se identificaron complejos estables. Técnicas de inmunoprecipitación y análisis proteómicos constituyen una aproximación adicional a la identificación de interacciones proteína-proteína y se están utilizando en la actualidad en el laboratorio para identificar posibles interacciones funcionales importantes para el papel biológico de la dUTPasa durante la replicación.

E.IV. LA dUTPasa DE *Trypanosoma brucei* ES NECESARIA PARA LA PROLIFERACIÓN CELULAR

Desde el punto de vista estricto, el uracilo es mutagénico y desencadena procesos de reparación y por tanto debe ser eliminado del DNA genómico. De acuerdo con esta concepción existen mecanismos muy eficientes que eliminan el uracilo tanto del “pool” intracelular de nucleótidos como del DNA. Sin embargo, tal y como se ha mencionado en la introducción, al mismo tiempo, el uracilo parece jugar un papel esencial mucho más complejo en determinados procesos biológicos como es la hipermutación somática, la defensa antiviral y la quimioterapia antitumoral.

Con el fin de profundizar en el papel del dUTP en tripanosomátidos y determinar las consecuencias de una perturbación de los niveles de este nucleótido sobre la viabilidad celular, el “pool” intracelular de nucleótidos y el daño en el DNA, se han generado líneas de *Trypanosoma* donde se han modulado los niveles de dUTPasa mediante la utilización de RNA de interferencia.

El RNA de interferencia (RNAi) es un proceso natural de silenciamiento génico descubierto en *Caenorhabditis elegans* como una respuesta a la presencia de RNA de doble cadena. Este fenómeno ha sido descrito posteriormente en muchos organismos como en células de mamífero y plantas. El proceso de RNAi y sus rutas relacionadas no sólo está implicado en la respuesta a ácidos nucleicos tanto exógenos como endógenos que pueden ser patogénicos para la célula, si no que también está involucrado en procesos celulares básicos, tales como regulación de genes y formación de heterocromatina (Volpe *et al.*, 2002) y su mantenimiento (Lippman *et al.*, 2003), metilación de DNA e histonas (Zilberman *et al.*, 2003), eliminación de DNA (Mochizuki *et al.*, 2002), silenciamiento de promotores (Mette *et al.*, 2000) y control del desarrollo (Han *et al.*, 2001; Lau *et al.*, 2001). En *T. brucei* fue descrito por primera vez en 1998 (Ngo *et al.*, 1998), proporcionando una herramienta muy poderosa para llevar a cabo análisis de función de genes y determinar la esencialidad de esos genes para este parásito, y en general en una gran variedad de organismos.

El mecanismo general por el que tiene lugar el silenciamiento comienza por el reconocimiento de RNAs de doble cadena por una enzima denominada Dicer, la cual procesa dicho RNA en pequeños fragmentos de RNA del orden de 21-22 nucleótidos denominados pequeños RNAs de interferencia (siRNA). A continuación estos siRNAs son incorporados a un complejo formado por varios componentes denominado complejo de silenciamiento inducido por RNA (RISC). En este complejo se produce el reconocimiento específico del mRNA diana mediante las cadenas complementarias de los diferentes siRNAs desencadenando un proceso de degradación de dicho mRNA, impidiendo por tanto la traducción a proteína (Hannon, 2002).

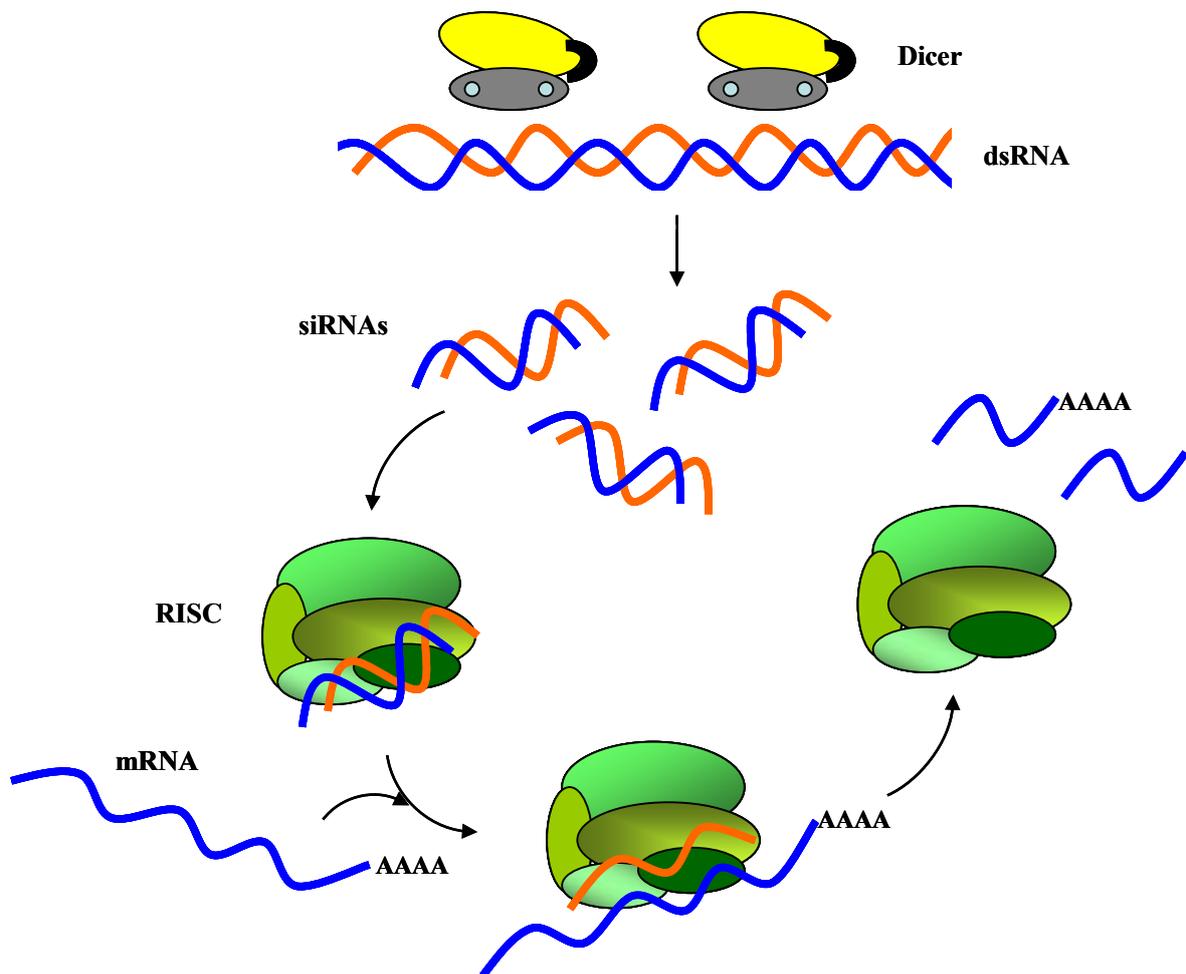


Figura E.IV.1. Modelo del mecanismo de degradación de mRNAs mediante RNAi. En primer lugar un RNA de doble cadena es reconocido y procesado en pequeños RNAs de doble cadena (siRNAs) por la enzima Dicer. A continuación, los siRNAs son incorporados en el complejo multiproteico RISC, el cual mediante las cadenas complementarias de siRNAs selecciona específicamente el mRNA que va a ser degradado.

Uno de los problemas principales de esta técnica es que en ningún caso se puede alcanzar una degradación del 100 % del mRNA, y por lo tanto los niveles de proteína nunca pueden ser abolidos completamente. Como la cantidad requerida por la célula de una proteína particular difiere de una proteína a otra, la ausencia de fenotipo de crecimiento tras la inducción del RNAi no prueba que la proteína no sea esencial para la viabilidad de la célula. Además, aún después de apreciarse un fenotipo claro de inhibición del crecimiento tras varios días post-inducción, los cultivos pueden recuperar un crecimiento normal. Esta pérdida del efecto del silenciamiento puede ocurrir por mutaciones en los promotores T7 utilizados para generar el RNA de doble cadena o en los operadores de tetraciclina, por la pérdida de los insertos de RNAi, por defectos en la maquinaria del RNAi, o por fenómenos epigenéticos (Motyka y Englund, 2004). Sin embargo la modulación de los niveles de proteína por RNAi resulta de gran utilidad para el estudio de genes esenciales ya que se puede estudiar el fenotipo resultante de una depleción de los niveles de una enzima que tiene funciones críticas en el metabolismo celular estableciendo su función a partir de las deficiencias observadas. Tal es el caso de la dUTPasa que ha sido descrito como una proteína esencial en todos los organismos analizados hasta la fecha.

Para el análisis de la función del gen *DUT* en *T. brucei* el RNA de doble cadena se utilizaron dos estrategias: 1) promotores T7 enfrentados; 2) estructura tallo-lazo o “stuffer”. En ambos casos se estudió el efecto en las dos formas de tripomastigotes en cultivo, sanguíneas y procíclicas, de *T. brucei*. Ambas estrategias han sido utilizadas con éxito en la inducción de RNAi en *T. brucei*, si bien en estudios comparativos la estrategia utilizando el sistema tallo-lazo ha resultado ser algo más robusto (Motyka y Englund, 2004).

En el caso de las formas sanguíneas, tanto para la primera como la segunda estrategia, tras la disminución de los niveles de dUTPasa no se observaron valores significativos de inhibición del crecimiento cuando eran cultivados en el medio de cultivo complementado con suero bovino fetal normal. Sin embargo, cuando el medio utilizado se complementa con una mezcla de suero bovino fetal dializado y un suero sintético denominado Serum Plus, la inducción del RNAi produjo una drástica disminución de la tasa de crecimiento. Una posible explicación a esta observación podría ser la presencia en medios ricos con suero bovino fetal de compuestos, tales como nucleótidos, nucleósidos, bases, o precursores de estos compuestos, que son utilizados

por los parásitos para compensar el desequilibrio ocasionado por una disminución en los niveles de dUTPasa sobre la relación dUTP/dTTP. Adicionalmente es concebible que la reducción de los niveles de proteína que alcanzó un 80 % para el caso de la estrategia de promotores enfrentados y un 90 % para la estructura tallo-lazo no fuera suficiente como para generar un fenotipo visible de pérdida de crecimiento en medios muy ricos. Como se ha comentado anteriormente, es posible que esta proteína residual fuera suficiente para mantener un idóneo balance dUTP/dTTP de tal manera que el proceso de replicación tenga lugar correctamente.

Cuando el silenciamiento se llevó a cabo en tripomastigotes de la forma procíclica, la inducción del fenómeno produjo una significativa inhibición del crecimiento, mostrando una correlación inversamente proporcional entre los niveles de dUTPasa y la disminución de la proliferación. Este resultado se obtuvo en ambos tipos de sistema de generación de RNA de doble cadena cuando se cultivan los parásitos en el medio de cultivo MEM-Pros. En el caso de producir el RNA de doble cadena mediante los promotores T7 enfrentados, la inhibición del crecimiento alcanzó un valor máximo del 55 %, asociada a una reducción de dUTPasa del 90 %, mientras que al utilizar la estrategia de la estructura tallo-lazo la inhibición del crecimiento llegó al 80 % con una depleción de enzima próxima a la totalidad (sin llegar al 100 %). Cuando el estudio de la proliferación celular se llevó a cabo en el medio de cultivo SDM-79, y el RNAi se genera por la estrategia de los promotores T7 enfrentados, no se aprecia fenotipo de pérdida de viabilidad. Sin embargo cuando se utiliza la estrategia de la estructura tallo-lazo tiene lugar una menor tasa de crecimiento al inducir el RNAi. Los resultados obtenidos del RNAi sobre la forma procíclica estarían de acuerdo con el hecho de que una mayor disminución de niveles de proteína hace el proceso más deletéreo para la célula. Además podemos decir que el medio de cultivo utilizado influye marcadamente la proliferación, posiblemente por la presencia de compuestos que compensan la disminución de los niveles de dUTPasa y que estimula o bien la síntesis *de novo* del dTTP o la ruta de recuperación de timidina. Por otra parte es factible que de resultar alterada la incorporación de dUTP al DNA, *Trypanosoma brucei* tolere un alto contenido de uracilo en su DNA lo cual puede ser indicativo de una elevada eficiencia de reparación por mecanismos cuya función sea la eliminación de sitios abásicos.

E.V. LA dUTPasa CONTROLA LOS NIVELES INTRACELULARES DE dUTP

La acumulación de los niveles intracelulares de dUTP ha sido propuesta como la base de la citotoxicidad causada por la inhibición de la biosíntesis de timidilato en diferentes tipos celulares (Sedwick *et al.*, 1981; Ingraham *et al.*, 1986; Curtin *et al.*, 1991). Además, se ha demostrado que la depleción de la actividad dUTPasa provoca un incremento en los niveles de dUTP que es tóxico para la célula, aunque esta toxicidad puede ser parcialmente revertida en ciertas condiciones mediante la incorporación de timidina del medio como se ha descrito en *Saccharomyces cerevisiae* tras crear un mutante permeable a este nucleósido (Gadsden *et al.*, 1993).

Se ha utilizado un ensayo basado en la incorporación de nucleótidos intracelulares utilizando un oligonucleótido sintético cebador para evaluar la concentración de dUTP y dTTP en formas procíclicas. La depleción de actividad dUTPasa produce un incremento de la concentración intracelular de dUTP y por lo tanto una disminución significativa en la relación dTTP/dUTP. En estas condiciones se produciría una incorporación aumentada de uracilo en el DNA debido a su uso por parte de la DNA polimerasa. El uracilo debe ser eliminado generándose sitios abásicos de forma masiva lo que sería el proceso responsable de la citotoxicidad. En levadura, un acúmulo de sitios abásicos provoca la acumulación de roturas de hebra simple 3'-bloqueados que posteriormente son convertidos a roturas de doble cadena lo que conlleva la muerte celular y el arresto en G2/M (Guillet *et al.*, 2006).

La observación de que la presencia de timidina revierte el fenotipo de pérdida de viabilidad corroboraría la idea de que el aumento de disponibilidad del dUTP y el cociente dTTP/dUTP es clave para la citotoxicidad. Al contrario de levadura, *Trypanosoma brucei* posee la maquinaria enzimática necesaria para la recuperación de pirimidinas, incluyendo una timidina quinasa (Tb10.70.7270) y una timidilato quinasa (Tb927.8.3510) si bien el transporte de este nucleósido es poco eficiente. La presencia de altas concentraciones de timidina produce una reversión parcial de la pérdida de viabilidad. Sin embargo a las concentraciones ensayadas la timina no genera el mismo resultado. En *T. brucei* se han identificado transportadores específicos y eficientes de nucleótidos pirimidínicos, *TbU1* que transporta uracilo y uridina y un transportador *TbC1* que incorpora citosina. No parecen existir transportadores de citidina, timina o timidina, si bien estos dos últimos son interiorizados en un proceso no saturable y por

tanto se concluye que corresponde a una interiorización por difusión pasiva con lo que la recuperación eficiente de timina, timidina y citidina y su contribución al “pool” intracelular de dTMP se ha puesto en entredicho (Gudin *et al.*, 2006). De hecho ha sido necesario la adición de timidina a concentraciones muy altas para obtener una recuperación del crecimiento lo que estaría de acuerdo con una incorporación deficiente de este nucleótido en condiciones fisiológicas.

La hipersensibilidad al metotrexato observado en formas sanguíneas nuevamente sugiere que una depleción de los niveles de la dUTPasa genera un aumento en la concentración intracelular de dUTP. El metotrexato es un inhibidor muy eficiente de la dihidrofolato reductasa que en *Trypanosoma* está asociada a la timidilato sintasa en una enzima bifuncional. Existen múltiples trabajos que demuestran que la utilización de antifolatos interrumpen la síntesis de timidilato al interrumpir la generación del metileno tetrahidrofolato, el cofactor necesario para la síntesis del dTMP. La interrupción de la reacción de metilación genera un aumento en la concentración intracelular del sustrato de la reacción, el dUMP, que a su vez es fosforilado a dUTP. Un aumento en la incorporación de dUTP al DNA es un proceso claramente identificado que tiene lugar en la terapia antitumoral con antifolatos y genera una serie de lesiones responsables de la muerte de células tumorales (Koehler y Ladner, 2004). Era concebible pensar que un aumento en los niveles intracelulares de dUTP como consecuencia de una disminución de la dUTPasa contribuiría a acentuar los procesos derivados del tratamiento con un inhibidor de la dihidrofolato reductasa.

Efectivamente, células que presentan niveles disminuidos de dUTPasa son hipersensibles al MTX y presentan una inhibición del crecimiento mucho más acusada que cuando se estudian ambos tratamientos por separado. Es interesante destacar que la hipersensibilidad es más acusada en el caso de formas sanguíneas donde la inhibición del crecimiento tras la depleción de la dUTPasa fue menos pronunciada.

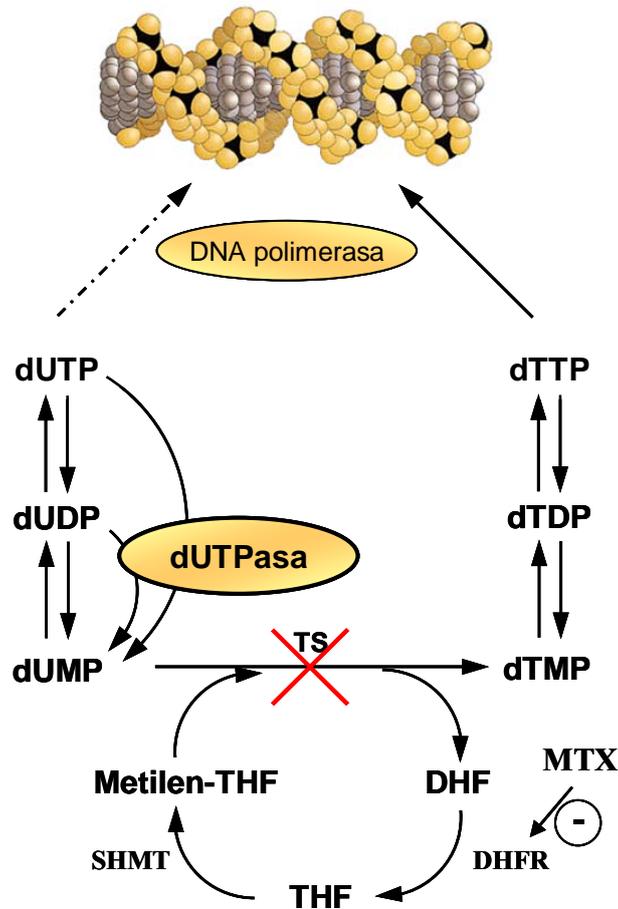


Figura E.V.1. Ruta de transferencia del grupo metilo en la síntesis de dTMP. dUTPasa, desoxiuridina trifosfato nucleótido hidrolasa; TS, timidilato sintasa; DHFR, dihidrofolato reductasa; SHMT, serina hidroximetil transferasa; DHF, dihidrofolato; THF, tetrahidrofolato; MTX, metotrexato.

E.VI. LA DEPLECIÓN DE LA dUTPasa GENERA DEFECTOS EN EL CICLO CELULAR

El ciclo celular de *Trypanosoma brucei* presenta una serie de peculiaridades debido a que existe una serie de orgánulos únicos que deben duplicarse y a que el kinetoplasto y el DNA nuclear se replican de forma independiente. La replicación del DNA del kinetoplasto comienza antes que la del núcleo. El proceso tiene una duración corta y se completa justo antes de completarse la fase S. Tras finalizar la fase S, el núcleo replicado entra en mitosis y, en el caso de las formas procíclicas, uno de los núcleos se sitúa entre los dos kinetoplastos. La citocinesis comienza a continuación para

generar dos células hijas. La progresión del ciclo celular está controlada por quinasas dependientes de ciclina al igual que en el resto de las células eucariotas aunque la existencia de “checkpoints” moleculares que controlan la progresión ordenada y precisa del ciclo está por confirmar (Hamarton, 2007).

T. brucei tiene 11 pares diploides de cromosomas (1-6 Mb), varios cromosomas de tamaño intermedio (200-900 Kb) y aproximadamente 100 minicromosomas (50-150 Kb) además de los maxi y minicírculos del DNA mitocondrial. La mitosis tiene lugar sin que haya una condensación cromosómica evidente. La citocinesis tiene lugar mediante la generación de un surco de división que sigue una trayectoria helicoidal a lo largo de un eje longitudinal de la célula. Las distintas fases del ciclo celular y la progresión del mismo en *T. brucei* se muestra en la figura E.VI.1.

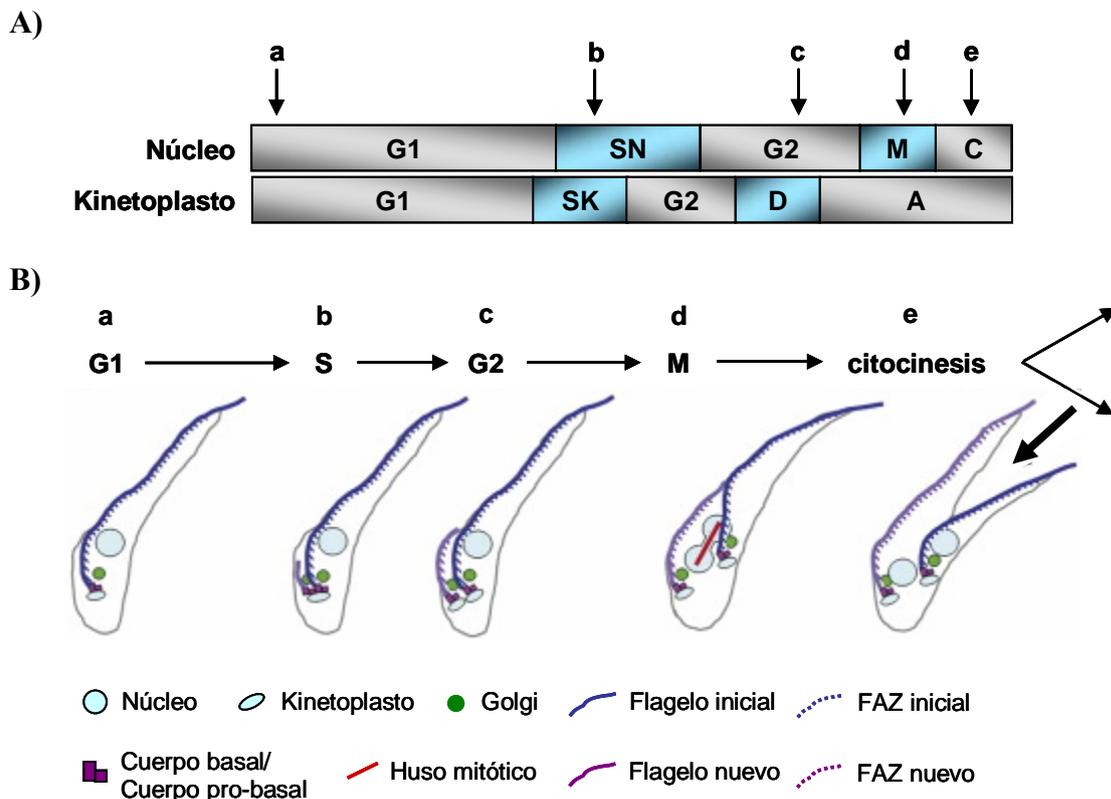


Figura E.VI.1. Ciclo celular de la forma procíclica de *Trypanosoma brucei*. A) El ciclo celular de *T. brucei* se separa en dos componentes, uno nuclear y otro del kinetoplasto. La replicación del kinetoplasto (SK) se inicia antes de la fase S nuclear, es considerablemente más corta y consecuentemente la segregación del kinetoplasto (D) ocurre antes de comenzar la mitosis nuclear (M). La fase denominada A en el ciclo del kinetoplasto se refiere a una fase durante la cual tiene lugar un movimiento de los cuerpos basales a otra posición del parásito. B) Representación esquemática de las células en las diferentes fases del ciclo celular. La flecha negra indica la dirección y posición del surco de división.

El efecto ocasionado por la disminución de la actividad dUTPasa a nivel del ciclo celular se estudió mediante citometría de flujo y se determinó el número de células que estaban presentes en cada fase del ciclo celular. El análisis se hizo en formas procíclicas a lo largo de seis días tras la inducción con doxiciclina y en condiciones en que hay una inhibición muy significativa de la proliferación celular. Este análisis mostró una drástica reducción del número de células tras seis días de inducción que se encontraban en fase G1 (del 62 % al 26% de la población total), acompañado de un aumento de casi tres veces en el número de células en fase S (del 10 % al 27 %). El número de células en fase G2/M sufrió un ligero incremento a lo largo de la inducción del RNAi, aunque no tan notable como en la fase S, pasando de un 23 % en el control a un 27 % a los seis días post-inducción. Finalmente, destacar la aparición de un pico sub-G1 el cual podría representar una población de células apoptóticas con DNA fragmentado resultantes del drástico arresto y alteraciones en el ciclo celular (Tu *et al.*, 2006).

Para llevar a cabo un estudio más detallado de las consecuencias de la disminución de la dUTPasa en el ciclo celular y determinar si se producen alteraciones morfológicas se realizó una tinción del DNA con DAPI. El seguimiento de las distintas fases del ciclo celular se realiza mediante la determinación del número de núcleos (N) y kinetoplastos (K) que presenta la célula en un microscopio de fluorescencia. El estudio mostró una serie de alteraciones tanto a nivel morfológico como en el número de núcleos y kinetoplastos presentes en el parásito. En primer lugar la población que exhibía una distribución de 1N1K disminuyó de un 76 % a un 55 % después de la inducción del RNAi de la dUTPasa. Resulto de interés además que un 22.4 % de las células presentaban un aumento considerable en el tamaño del núcleo (1N*1K), lo que podría deberse a que tiene lugar un proceso activo de síntesis de DNA pero sin que se produzca el proceso de mitosis. En cambio, la población con una distribución de 1N2K sufrió un notable incremento del 11 % al 19.3 %, pero nuevamente el núcleo de un 13 % exhibió un tamaño mayor al de células normales (1N*2K). En este caso, esta morfología podría deberse a que se ha producido un bloqueo de la mitosis sin que se haya producido la división del kinetoplasto. El número de células con una distribución de 2N2K, las cuales han sufrido mitosis, disminuyó considerablemente de un 11.2 % hasta un 4% sin que se apreciara un aumento en el tamaño del núcleo. Todas estas observaciones sugieren un arresto en la transición de la fase G2 a la mitosis. La formación de nuevas células seguramente tuvo lugar previo a la depleción de la dUTPasa o corresponden a células

que han escapado al efecto del RNAi. Un hecho curioso fue la presencia de una significativa población de células anucleadas (14.8 %) que contienen un único kinetoplasto (0N1K). Este tipo de células, denominadas zoides, podrían surgir de un eficiente proceso de división celular de células con una distribución 1N*2K, dando lugar también a células 1N*1K. Esta distribución sugiere que el progreso a través de la citocinesis y división celular es conducido y completado por la segregación del kinetoplasto, en condiciones de arresto de la mitosis. Otra población observada fue la que tenía un número anormal tanto de núcleos como de kinetoplastos. Este tipo de células (XNXK) surgen a partir de varias etapas de replicación sin que se produzca la división celular. Lo que indica que con una baja frecuencia, también existe una alteración de la citocinesis.

En conclusión, los resultados obtenidos por medio de la citometría de flujo y del estudio por microscopía sugieren que una disminución de los niveles de dUTPasa producen severas alteraciones a lo largo del ciclo celular, como una ralentización del proceso de replicación del DNA, un arresto en la transición G2→M y en menor medida un bloqueo de la citocinesis y de la división celular. Es probable que la gama de alteraciones observadas sean el resultado de una acumulación de sitios abásicos tras una reparación generalizada de DNA conteniendo uracilo. También es posible que un contenido elevado en uracilo sea tóxico *per se* al alterar la unión de proteínas de unión a DNA necesarias para la transcripción y la estructura de la cromatina.

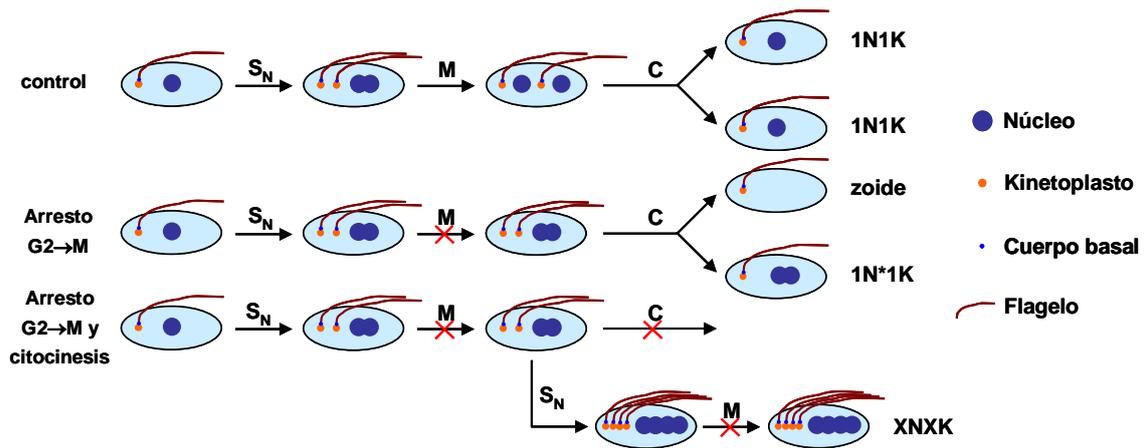


Figura E.VI.2. Modelo demostrativo de las distintas respuestas a arresto en fase G2/M en *Trypanosoma brucei*. S_N, fase S nuclear; M, mitosis; C, citocinesis.

E.VII. LA DISMINUCIÓN DE LA ACTIVIDAD dUTPasa ACTIVA LOS MECANISMOS DE REPARACIÓN POR ESCISIÓN DE BASES

La aparición de sitios abásicos como consecuencia de la inserción errónea de uracilo durante la replicación implica el reconocimiento de la base errónea por parte de la uracil DNA glicosilasa que escinde la base dejando un sitio abásico. El paso siguiente en el proceso de reparación por escisión de bases es la actuación de la AP endonucleasa que rompe la cadena de DNA en el lado 5' del sitio abásico generando un extremo 3' OH libre que posteriormente puede ser reparado mediante dos rutas: una "short patch" que implica a la DNA polimerasa β y que supone la eliminación de un solo nucleótido mientras que en la "long patch" se produce la eliminación o desplazamiento de un cierto número de nucleótidos generándose un "flap" en 5' que es procesado posteriormente por FEN1.

T. brucei contiene una sola uracil DNA glicosilasa en su genoma al igual que *T. cruzi* (Pena-Diaz *et al.*, 2004). En cuanto a AP endonucleasas, presentan dos enzimas potencialmente implicadas en BER y que son de la familia de la APE1 (humana)/Exo III (*E. coli*). Una de ellas ha sido estudiada (Gallego *et al.*, 2005) mientras la segunda que se asemeja a APE2 humana/APN2 (levadura) todavía está por caracterizar.

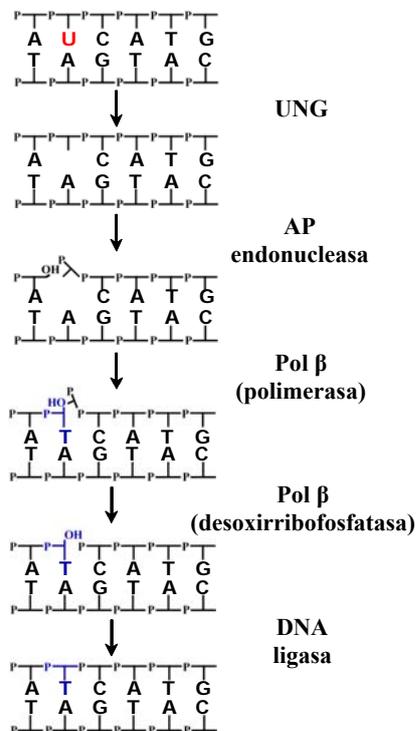


Figura E.VII.1. Pasos catalíticos de la ruta de reparación de bases de uracilo incorporadas al DNA mediante la ruta de "short patch". La incorporación errónea de una base de uracilo al DNA desencadena un proceso de reparación de la base errónea que comienza por la escisión de esta por la uracil DNA glicosilasa (UNG) generando un sitio abásico, el cual es procesado por la AP endonucleasa. En la ruta de reparación por "short patch", la DNA polimerasa (pol) β sintetiza un único nucleótido y a continuación una actividad adicional desoxirribosofatasa elimina el grupo dRp 5'. Finalmente la reparación se completa por la acción de una DNA ligasa.

La depleción de la actividad dUTPasa mediante RNAi genera una pronunciada actividad de la uracil DNA glicosilasa en células inducidas con doxiciclina. Este aumento es de aproximadamente 100 veces si se compara con las células de la línea parental (*T. brucei* 449). Sorprendentemente sin embargo, la actividad glicosilasa medida en extractos de células sin inducir también estaba fuertemente aumentada con respecto a la línea celular parental. Existía la posibilidad de que la inducción con doxiciclina y/o la pérdida de viabilidad constituyeran estímulos de carácter inespecífico que produjeran una actividad uracil DNA glicosilasa. Por ello analizamos los niveles en dos líneas celulares de RNAi disponibles en el laboratorio, presentando una de ellas un fenotipo de pérdida de viabilidad tras la inducción. Sin embargo la activación de la uracil DNA glicosilasa parece ser específica de las líneas transfectadas con el RNAi-DUT. Una posible explicación es que existiera una serie de cambios adaptativos durante el proceso de selección de la línea celular que expresa el RNAi-DUT. Una pequeña cantidad de expresión constitutiva en ausencia de doxiciclina es posible y puede que haya generado una respuesta de activación de la glicosilasa que estaría fuertemente regulada por los niveles intracelulares de dUTP. En cualquier caso los niveles de dUTPasa medidos por *western blot* son muy semejantes en la línea celular parental y la línea celular RNAi-DUT sin inducir. Por otra parte un *northern blot* con una sonda específica del RNAi demostró que de existir una expresión constitutiva, ésta ocurre a niveles muy bajos.

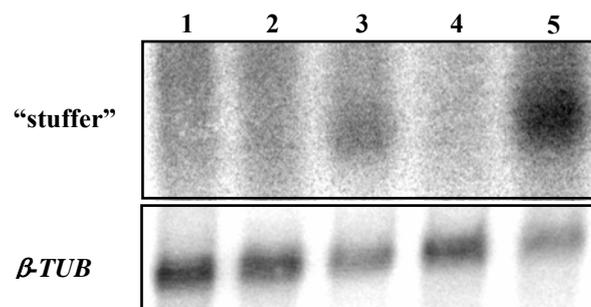


Figura E.VII.2. Northern blot de la expresión constitutiva de RNAi. Los niveles de mRNA correspondientes a distintas líneas celulares se determinaron utilizando una sonda específica del RNAi (secuencia del “stuffer”). Carril 1, *T. brucei* 449; carriles 2 y 3, línea celular RNAi-PDF no inducida e inducida respectivamente; y carriles 4 y 5, línea celular RNAi-DUT no inducida e inducida respectivamente. La normalización se realizó con una sonda del gen de la β -tubulina.

Además, sorprendentemente cuando se midieron los niveles de mRNA de la uracil DNA glicosilasa mediante *northern blot* en las distintas cepas, sólo se obtuvieron diferencias pequeñas (1.5 veces) entre la cepa parental y la inducida. Esta observación sugiere que la regulación de los niveles de la glicosilasa en respuesta a la depleción de la dUTPasa ocurre a nivel post-transcripcional. Estudios futuros determinarán si esta regulación ocurre a nivel traduccional o post- traduccional. En este sentido es interesante destacar que la uracil DNA glicosilasa nuclear (UNG2) humana está sujeta a un mecanismo de regulación por fosforilación de manera que una defosforilación en el residuo Thr6 produce una disminución en la actividad UNG2. Este proceso, mediado por una fosfatasa denominada PPM1D, puede tener la función biológica de inactivar la actividad uracil DNA glicosilasa una vez que se haya completado la reparación del DNA (Lu *et al.*, 2004). En la secuencia de *T. brucei* este residuo de treonina se encuentra conservado (Thr5) y asimismo se ha identificado una proteína fosfatasa putativa homóloga a la fosfatasa PP1MD (PP2C; Tb11.01.6540).

Mientras que se produce una clara activación de la uracil DNA glicosilasa en células que producen el RNAi-DUT solo se ha observado un ligero aumento en la actividad AP endonucleasa. Es posible que la actividad endonucleasa constitutiva sea de por sí elevada o que otras endonucleasas estén implicadas en el proceso de reparación. La mayor actividad DNA glicosilasa por otra parte es nuevamente indicativo de que una importante consecuencia de la depleción de los niveles intracelulares de dUTPasa es un aumento de la incorporación de dUTP durante la replicación en *Trypanosoma brucei*.

E.VIII. UNA DISMINUCIÓN EN LOS NIVELES DE URACIL DNA GLICOSILASA NO AFECTA A LA PROLIFERACIÓN CELULAR PERO ACENTÚA EL FENOTIPO DE LAS CÉLULAS RNAi-DUT

Dado el papel central de la uracil DNA glicosilasa en preservar la integridad genética hemos analizado mediante RNAi la importancia de la uracil DNA glicosilasa en proliferación. Mientras que determinados eucariotas contienen varias uracil DNA glicosilasas como es el caso de células humanas (UNG1, UNG2, uracil DNA glicosilasa monofuncional específica de cadena sencilla (SMUG1), timina DNA glicosilasa (TDG)) solo se ha identificado una uracil DNA glicosilasa en el genoma de *T. brucei* al igual que

en levaduras donde existe una sola enzima que desempeñe esta función. Mientras que la dUTPasa es un gen esencial en *Saccharomyces cerevisiae*, la uracil DNA glicosilasa es dispensable y mutantes *ung1* que presentan una deleción en el gen son viables (Guillet *et al.*, 2006). Hemos investigado las consecuencias de la depleción mediante RNAi de la actividad glicosilasa en *Trypanosoma*. Una disminución significativa de los niveles de mRNA no resultó en una disminución de la proliferación ni en ningún efecto morfológico evidente, lo que sugiere que esta actividad tampoco es un proceso esencial en tripanosomátidos

Al realizar la doble interferencia una primera observación tras el análisis de múltiples clones fue que mientras que el silenciamiento por separado mediante el RNAi de los genes *DUT* y *UNG* ocurre de una manera eficiente y se consigue una reducción de más del 80% del mRNA en las líneas celulares obtenidas para la doble interferencia, no fue posible disminuir en más de un 40 % el mRNA para la actividad glicosilasa mientras que los niveles de proteína dUTPasa descienden en un 80 %. Por otra parte la doble interferencia no produjo una reversión del fenotipo de pérdida de viabilidad en las condiciones en las que se ha descrito para otros tipos celulares. Más bien lo contrario pues se observó una acentuación de la inhibición del crecimiento y de los efectos sobre el ciclo celular. Así tras seis días de inducción del doble RNAi hay una disminución drástica del número de células 1N1K y un aumento muy pronunciado de células 1N*1K y 1N*2K. El análisis mediante FACS indica una disminución acusada de células en fase G1 y es de destacar que el pico sub-G1 es algo menos distinguible, lo cual puede ser indicativo de una fragmentación del DNA menos acusada.

Interesantemente, en *Caenorhabditis elegans* se ha demostrado que la depleción de la actividad dUTPasa mediante RNAi produce también un incremento de la incorporación errónea de uracilo en el DNA. La depleción de la dUTPasa interrumpió el desarrollo, causó letalidad embrionaria y condujo a una activación de la parada del ciclo celular y apoptosis. Estos fenotipos se manifestaron como resultado del procesamiento del uracilo presente en el DNA por la uracil DNA glicosilasa (UNG-1). Una disminución de la actividad uracil glicosilasa revierte parcialmente este fenotipo. Sorprendentemente, una mutación en el gen “checkpoint” *clk-2* rescató el fenotipo de letalidad y los defectos en el desarrollo, eliminando el arresto del ciclo celular y apoptosis por la reducción de los niveles de dUTPasa. Estos datos muestran una interacción genética entre UNG-1 y la

activación de la ruta de reparación del DNA dañado por *clk-2* tras una incorporación de uracilo al DNA (Dengg *et al.*, 2006).

En relación con esta última observación parece ser que en *Trypanosoma* existen diferencias fundamentales en el control del ciclo celular entre las distintas formas de vida y que determinados “checkpoint” esenciales de células eucarióticas están ausentes en *T. brucei* (Hammarton, 2007). La existencia de un “checkpoint” semejante al de *Caenorhabditis* y su activación por la actuación de la uracil DNA glicosilasa en *Trypanosoma* está por demostrar.

En definitiva células donde se induce una depleción combinada de la actividad dUTPasa y uracil glicosilasa muestran alteraciones profundas en la mitosis y el ciclo celular. Estudios futuros determinarán la importancia exacta de la uracil glicosilasa en el mantenimiento de la integridad genética en estos organismos y su contribución a la letalidad generada por un aumento en la concentración intracelular de dUTP.

CONCLUSIONES

F. CONCLUSIONES

1. La proteína recombinante dUTPasa de *Trypanosoma brucei*, purificada a homogeneidad mediante una combinación de cromatografía de hidroxapatito y de intercambio iónico, se comporta en estado nativo como una proteína homodimérica, y predicciones de estructura secundaria establecen que pertenece a la superfamilia de todo- α nucleótido hidrolasas.
2. Los parámetros cinéticos obtenidos con dUTP como sustrato son del mismo orden a los descritos para otras dUTPasas y confirman la alta especificidad de esta familia de enzimas por nucleótidos cuya base es el uracilo. El nucleósido difosfato dUDP es un sustrato específico de la enzima que presenta parámetros cinéticos similares a los obtenidos para el dUTP y comparables a los de otras dUTPasas diméricas lo que corrobora el papel relevante de esta enzima en el proceso de síntesis de nucleótidos de timina.
3. El análisis mediante técnicas de inmunofluorescencia e inmunocitoquímica y microscopía electrónica indica que la dUTPasa de *Trypanosoma brucei* se localiza exclusivamente en el núcleo.
4. La depleción de la dUTPasa mediante RNA de interferencia produce una disminución significativa de la proliferación celular tanto en la forma sanguínea como procíclica de *Trypanosoma brucei*. El fenotipo de pérdida de viabilidad puede ser revertido mediante la adición exógena de timidina.
5. La disminución de los niveles de dUTPasa se correlaciona con un aumento en los niveles intracelulares de dUTP que induce un desequilibrio en la relación dUTP/dTTP y un aumento en la incorporación de uracilo al DNA.
6. Las líneas celulares deficientes en dUTPasa presentan hipersensibilidad a metotrexato, un inhibidor de la enzima bifuncional dihidrofolato reductasa-timidilato sintasa que produce un incremento en la concentración intracelular de dUTP.

7. El análisis mediante citometría de flujo y la observación directa de la morfología celular por microscopia muestra anomalías significativas en la progresión del ciclo celular en las líneas celulares deficientes en dUTPasa. Se observa un incremento del número de células en fase S lo que sugiere una ralentización de la replicación del DNA. Asimismo, tiene lugar un arresto en la transición de G2 a mitosis, así como un bloqueo en la citocinesis.

8. El silenciamiento del gen *DUT* en formas procíclicas de *Trypanosoma brucei* induce un incremento de 100 veces en la actividad uracil DNA glicosilasa con respecto a la línea celular parental, probablemente como respuesta a una incorporación masiva de uracilo en el DNA.

9. Los estudios de silenciamiento del gen *DUT* mediante RNA de interferencia sugieren que la dUTPasa es una enzima esencial para la viabilidad celular y el mantenimiento de la integridad genética.

BIBLIOGRAFÍA

G. BIBLIOGRAFÍA

- Agabian, N. (1990). Trans splicing of nuclear pre-mRNAs. *Cell* 61, 1157-1160.
- Aitcheson, N., Talbot, S., Shapiro, J., Hughes, K., Adkin, C., Butt, T., Sheader, K., and Rudenko, G. (2005). VSG switching in *Trypanosoma brucei*: antigenic variation analysed using RNAi in the absence of immune selection. *Mol Microbiol* 57, 1608-1622.
- Akiyama, M., Maki, H., Sekiguchi, M., and Horiuchi, T. (1989). A specific role of MutT protein: to prevent dG.dA mispairing in DNA replication. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86, 3949-3952.
- Amiguet-Vercher, A., Perez-Morga, D., Pays, A., Poelvoorde, P., Van Xong, H., Tebabi, P., Vanhamme, L., and Pays, E. (2004). Loss of the mono-allelic control of the VSG expression sites during the development of *Trypanosoma brucei* in the bloodstream. *Mol Microbiol* 51, 1577-1588.
- Arnheim, N., and Erlich, H. (1992). Polymerase chain reaction strategy. *Annu Rev Biochem* 61, 131-156.
- Arrebola, R., Olmo, A., Reche, P., Garvey, E.P., Santi, D.V., Ruiz-Perez, L.M., and Gonzalez-Pacanowska, D. (1994). Isolation and characterization of a mutant dihydrofolate reductase-thymidylate synthase from methotrexate-resistant *Leishmania* cells. *J Biol Chem* 269, 10590-10596.
- Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A., and Struhl, K. (eds.) (1997). *Current Protocols in Molecular Biology*. John Wiley & Sons, Inc.: New York.
- Ayusawa, D., Shimizu, K., Koyama, H., Takeishi, K., and Seno, T. (1983). Unusual aspects of human thymidylate synthase in mouse cells introduced by DNA-mediated gene transfer. *J Biol Chem* 258, 48-53.
- Baldo, A.M., and McClure, M.A. (1999). Evolution and horizontal transfer of dUTPase-encoding genes in viruses and their hosts. *J Virol* 73, 7710-7721.
- Beck, C.F., Eisenhardt, A.R., and Neuhard, J. (1975). Deoxycytidine triphosphate deaminase of *Salmonella typhimurium*. Purification and characterization. *J Biol Chem* 250, 609-616.
- Bekesi, A., Zagyva, I., Hunyadi-Gulyas, E., Pongracz, V., Kovari, J., Nagy, A.O., Erdei, A., Medzihradzsky, F.K., and Vertessy, B.G. (2004). Developmental regulation of dUTPase expression in *Drosophila melanogaster*. *J Biol Chem*.
- Bellofatto, V., and Cross, G.A. (1989). Expression of a bacterial gene in a trypanosomatid protozoan. *Science* 244, 1167-1169.
- Bennett, S.E., and Mosbaugh, D.W. (1992). Characterization of the *Escherichia coli* uracil-DNA glycosylase.inhibitor protein complex. *J Biol Chem* 267, 22512-22521.

- Berens, R.L., Krug, E.C., and Marr, J.J. (eds.) (1995). Purine and Pyrimidine metabolism. *Biochemistry and Molecular Biology of Parasites*.
- Berens, R.L., Marr, J.J., LaFon, S.W., and Nelson, D.J. (1981). Purine metabolism in *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol* 3, 187-196.
- Bergman, A.C., Nyman, P.O., and Larsson, G. (1998). Kinetic properties and stereospecificity of the monomeric dUTPase from herpes simplex virus type 1. *FEBS Lett* 441, 327-330.
- Bernier-Villamor, V., Camacho, A., Hidalgo-Zarco, F., Perez, J., Ruiz-Perez, L.M., and Gonzalez-Pacanowska, D. (2002). Characterization of deoxyuridine 5'-triphosphate nucleotidohydrolase from *Trypanosoma cruzi*. *FEBS Lett* 526, 147-150.
- Bessman, M.J., Frick, D.N., and O'Handley, S.F. (1996). The MutT proteins or "Nudix" hydrolases, a family of versatile, widely distributed, "housecleaning" enzymes. *J Biol Chem* 271, 25059-25062.
- Bhatnagar, S.K., and Bessman, M.J. (1988). Studies on the mutator gene, mutT of *Escherichia coli*. Molecular cloning of the gene, purification of the gene product, and identification of a novel nucleoside triphosphatase. *J Biol Chem* 263, 8953-8957.
- Biebinger, S., Wirtz, L.E., Lorenz, P., and Clayton, C. (1997). Vectors for inducible expression of toxic gene products in bloodstream and procyclic *Trypanosoma brucei*. *Mol Biochem Parasitol* 85, 99-112.
- Bjornberg, O., and Nyman, P.O. (1996). The dUTPases from herpes simplex virus type 1 and mouse mammary tumour virus are less specific than the *Escherichia coli* enzyme. *J Gen Virol* 77 (Pt 12), 3107-3111.
- Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72, 248-254.
- Bringaud, F., Riviere, L., and Coustou, V. (2006). Energy metabolism of trypanosomatids: adaptation to available carbon sources. *Mol Biochem Parasitol* 149, 1-9.
- Brocchieri, L. (2001). Low-complexity regions in *Plasmodium* proteins: in search of a function. *Genome Res* 11, 195-197.
- Brockstedt, E., Rickers, A., Kostka, S., Laubersheimer, A., Dorken, B., Wittmann-Liebold, B., Bommert, K., and Otto, A. (1998). Identification of apoptosis-associated proteins in a human Burkitt lymphoma cell line. Cleavage of heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1 by caspase 3. *J Biol Chem* 273, 28057-28064.
- Bruzik, J.P., Van Doren, K., Hirsh, D., and Steitz, J.A. (1988). Trans splicing involves a novel form of small nuclear ribonucleoprotein particles. *Nature* 335, 559-562.

- Bullock, W.O., Fernández, J.M., and Short, J.M. (1987). XL1Blue: A high efficiency plasmid transforming recA Escherichia coli strain with beta-galactosidase selection. *Biotechniques* 5, 376-378.
- Burgis, N.E., Brucker, J.J., and Cunningham, R.P. (2003). Repair system for noncanonical purines in Escherichia coli. *J Bacteriol* 185, 3101-3110.
- Camacho, A., Hidalgo-Zarco, F., Bernier-Villamor, V., Ruiz-Perez, L.M., and Gonzalez-Pacanowska, D. (2000). Properties of Leishmania major dUTP nucleotidohydrolase, a distinct nucleotide-hydrolysing enzyme in kinetoplastids. *Biochem J* 346 Pt 1, 163-168.
- Canman, C.E., Radany, E.H., Parsels, L.A., Davis, M.A., Lawrence, T.S., and Maybaum, J. (1994). Induction of resistance to fluorodeoxyuridine cytotoxicity and DNA damage in human tumor cells by expression of Escherichia coli deoxyuridinetriphosphatase. *Cancer Res* 54, 2296-2298.
- Canman, C.E., Lawrence, T.S., Shewach, D.S., Tang, H.Y., and Maybaum, J. (1993). Resistance to fluorodeoxyuridine-induced DNA damage and cytotoxicity correlates with an elevation of deoxyuridine triphosphatase activity and failure to accumulate deoxyuridine triphosphate. *Cancer Res* 53, 5219-5224.
- Carruthers, V.B., and Cross, G.A. (1992). High-efficiency clonal growth of bloodstream- and insect-form Trypanosoma brucei on agarose plates. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 8818-8821.
- Chen, R., Wang, H., and Mansky, L.M. (2002). Roles of uracil-DNA glycosylase and dUTPase in virus replication. *J Gen Virol* 83, 2339-2345.
- Chern, C.J., MacDonald, A.B., and Morris, A.J. (1969). Purification and properties of a nucleoside triphosphate pyrophosphohydrolase from red cells of the rabbit. *J Biol Chem* 244, 5489-5495.
- Chiu, C.S., Ruettinger, T., Flanagan, J.B., and Greenberg, G.R. (1977). Role of deoxycytidylate deaminase in deoxyribonucleotide synthesis in bacteriophage T4 DNA replication. *J Biol Chem* 252, 8603-8608.
- Chowdhury, S.F., Villamor, V.B., Guerrero, R.H., Leal, I., Brun, R., Croft, S.L., Goodman, J.M., Maes, L., Ruiz-Perez, L.M., Pacanowska, D.G., and Gilbert, I.H. (1999). Design, synthesis, and evaluation of inhibitors of trypanosomal and leishmanial dihydrofolate reductase. *J Med Chem* 42, 4300-4312.
- Clayton, C.E., Estevez, A.M., Hartmann, C., Alibu, V.P., Field, M., and Horn, D. (2005). Down-regulating gene expression by RNA interference in Trypanosoma brucei. *Methods Mol Biol* 309, 39-60.
- Coderre, J.A., Beverley, S.M., Schimke, R.T., and Santi, D.V. (1983). Overproduction of a bifunctional thymidylate synthetase-dihydrofolate reductase and DNA amplification in methotrexate-resistant Leishmania tropica. *Proc Natl Acad Sci U S A* 80, 2132-2136.

- Cohen, D., Heng, H.H., Shi, X.M., McIntosh, E.M., Tsui, L.C., and Pearlman, R.E. (1997). Assignment of the human dUTPase gene (DUT) to chromosome 15q15-q21. 1 by fluorescence in situ hybridization. *Genomics* 40, 213-215.
- Cone, R., Bonura, T., and Friedberg, E. (1980). Inhibitor of uracil-DNA glycosylase induced by bacteriophage PBS2. Purification and preliminary characterization. *J. Biol. Chem.* 255, 10354-10358.
- Curotto de Lafaille, M.A., Laban, A., and Wirth, D.F. (1992). Gene expression in *Leishmania*: analysis of essential 5' DNA sequences. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 2703-2707.
- Curtin, N.J., Harris, A.L., and Aherne, G.W. (1991). Mechanism of cell death following thymidylate synthase inhibition: 2'-deoxyuridine-5'-triphosphate accumulation, DNA damage, and growth inhibition following exposure to CB3717 and dipyridamole. *Cancer Res* 51, 2346-2352.
- de Koning, H.P., and Jarvis, S.M. (1998). A highly selective, high-affinity transporter for uracil in *Trypanosoma brucei brucei*: evidence for proton-dependent transport. *Biochem Cell Biol* 76, 853-858.
- Dengg, M., Garcia-Muse, T., Gill, S.G., Ashcroft, N., Boulton, S.J., and Nilsen, H. (2006). Abrogation of the CLK-2 checkpoint leads to tolerance to base-excision repair intermediates. *EMBO Rep* 7, 1046-1051.
- Deutsch, W.A. (1995). Why do pupating insects lack an activity for the repair of uracil-containing DNA? One explanation involves apoptosis. *Insect Mol Biol* 4, 1-5.
- Deutsch, W.A., and Spiering, A.L. (1982). A new pathway expressed during a distinct stage of *Drosophila* development for the removal of dUMP residues in DNA. *J Biol Chem* 257, 3366-3368.
- Dunn, W., Chou, C., Li, H., Hai, R., Patterson, D., Stolc, V., Zhu, H., and Liu, F. (2003). Functional profiling of a human cytomegalovirus genome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 14223-14228.
- el-Hajj, H.H., Wang, L., and Weiss, B. (1992). Multiple mutant of *Escherichia coli* synthesizing virtually thymineless DNA during limited growth. *J Bacteriol* 174, 4450-4456.
- el-Hajj, H.H., Zhang, H., and Weiss, B. (1988). Lethality of a dut (deoxyuridine triphosphatase) mutation in *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, 1069-1075.
- Ellenberger, T.E., and Beverley, S.M. (1989). Multiple drug resistance and conservative amplification of the H region in *Leishmania major*. *J Biol Chem* 264, 15094-15103.
- Elliott, M.J., Stribinskiene, L., and Lock, R.B. (1998). Expression of Bcl-2 in human epithelial tumor (HeLa) cells enhances clonogenic survival following exposure to 5-fluoro-2'-deoxyuridine or staurosporine, but not following exposure to etoposide or doxorubicin. *Cancer Chemother Pharmacol* 41, 457-463.

Estevez, A.M., Lehner, B., Sanderson, C.M., Ruppert, T., and Clayton, C. (2003). The roles of intersubunit interactions in exosome stability. *J Biol Chem* 278, 34943-34951.

Estevez, A.M., Kempf, T., and Clayton, C. (2001). The exosome of *Trypanosoma brucei*. *Embo J* 20, 3831-3839.

Evans, D.R., and Guy, H.I. (2004). Mammalian pyrimidine biosynthesis: fresh insights into an ancient pathway. *J Biol Chem* 279, 33035-33038.

Feinberg, A.P., and Vogelstein, B. (1983). A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal Biochem* 132, 6-13.

Fiser, A., and Vertessy, B.G. (2000). Altered subunit communication in subfamilies of trimeric dUTPases. *Biochem Biophys Res Commun* 279, 534-542.

Fleischmann, J., Kremmer, E., Muller, S., Sommer, P., Kirchner, T., Niedobitek, G., and Grasser, F.A. (1999). Expression of deoxyuridine triphosphatase (dUTPase) in colorectal tumours. *Int J Cancer* 84, 614-617.

Frederico, L.A., Kunkel, T.A., and Shaw, B.R. (1993). Cytosine deamination in mismatched base pairs. *Biochemistry* 32, 6523-6530.

Gadsden, M.H., McIntosh, E.M., Game, J.C., Wilson, P.J., and Haynes, R.H. (1993). dUTP pyrophosphatase is an essential enzyme in *Saccharomyces cerevisiae*. *Embo J* 12, 4425-4431.

Gallego, C., Estevez, A.M., Farez, E., Ruiz-Perez, L.M., and Gonzalez-Pacanowska, D. (2005). Overexpression of AP endonuclease protects *Leishmania major* cells against methotrexate induced DNA fragmentation and hydrogen peroxide. *Mol Biochem Parasitol* 141, 191-197.

Galperin, M.Y., Moroz, O.V., Wilson, K.S., and Murzin, A.G. (2006). House cleaning, a part of good housekeeping. *Mol Microbiol* 59, 5-19.

Guerra-Giraldez, C., Quijada, L., and Clayton, C.E. (2002). Compartmentation of enzymes in a microbody, the glycosome, is essential in *Trypanosoma brucei*. *J Cell Sci* 115, 2651-2658.

Guillet, M., Van Der Kemp, P.A., and Boiteux, S. (2006). dUTPase activity is critical to maintain genetic stability in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res* 34, 2056-2066.

Giroir, L.E., and Deutsch, W.A. (1987). *Drosophila* deoxyuridine triphosphatase. Purification and characterization. *J Biol Chem* 262, 130-134.

Goeddel, D.V., Yansura, D.G., and Caruthers, M.H. (1978). How lac repressor recognizes lac operator. *Proc Natl Acad Sci U S A* 75, 3578-3582.

Gopaul, D.N., Meyer, S.L., Degano, M., Sacchettini, J.C., and Schramm, V.L. (1996). Inosine-uridine nucleoside hydrolase from *Crithidia fasciculata*. *Genetic*

characterization, crystallization, and identification of histidine 241 as a catalytic site residue. *Biochemistry* 35, 5963-5970.

Gouet, P., Courcelle, E., Stuart, D.I., and Metz, F. (1999). ESPript: analysis of multiple sequence alignments in PostScript. *Bioinformatics* 15, 305-308.

Goulian, M., Bleile, B., and Tseng, B.Y. (1980). Methotrexate-induced misincorporation of uracil into DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 77, 1956-1960.

Greenberg, M.L., Chanana, A.D., Cronkite, E.P., Schiffer, L.M., and Stryckmans, P.A. (1966). Tritiated thymidine as a cytotoxic agent in human leukemia. *Blood* 28, 851-859.

Greenberg, G.R. (1966). New dUTPase and dUDPase activities after infection of *Escherichia coli* by T2 bacteriophage. *Proc Natl Acad Sci U S A* 56, 1226-1232.

Gros, L., Castillo-Acosta, V.M., Jimenez Jimenez, C., Sealey-Cardona, M., Vargas, S., Manuel Estevez, A., Yardley, V., Rattray, L., Croft, S.L., Ruiz-Perez, L.M., Urbina, J.A., Gilbert, I.H., and Gonzalez-Pacanowska, D. (2006). New azasterols against *Trypanosoma brucei*: role of 24-sterol methyltransferase in inhibitor action. *Antimicrob Agents Chemother* 50, 2595-2601.

Gudin, S., Quashie, N.B., Candlish, D., Al-Salabi, M.I., Jarvis, S.M., Ranford-Cartwright, L.C., and de Koning, H.P. (2006). *Trypanosoma brucei*: A survey of pyrimidine transport activities. *Exp Parasitol*.

Guillet, M., and Boiteux, S. (2003). Origin of endogenous DNA abasic sites in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 23, 8386-8394.

Guillet, M., Van Der Kemp, P.A., and Boiteux, S. (2006). dUTPase activity is critical to maintain genetic stability in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res* 34, 2056-2066.

Hammarton, T.C. (2007). Cell cycle regulation in *Trypanosoma brucei*. *Mol Biochem Parasitol*.

Hammond, D.J., Gutteridge, W.E., and Opperdoes, F.R. (1981). A novel location for two enzymes of de novo pyrimidine biosynthesis in trypanosomes and *Leishmania*. *FEBS Lett* 128, 27-29.

Hannon, G.J. (2002). RNA interference. *Nature* 418, 244-251.

Hardeland, U., Bentele, M., Jiricny, J., and Schar, P. (2003). The versatile thymine DNA-glycosylase: a comparative characterization of the human, *Drosophila* and fission yeast orthologs. *Nucleic Acids Res* 31, 2261-2271.

Harkiolaki, M., Dodson, E.J., Bernier-Villamor, V., Turkenburg, J.P., Gonzalez-Pacanowska, D., and Wilson, K.S. (2004). The crystal structure of *Trypanosoma cruzi* dUTPase reveals a novel dUTP/dUDP binding fold. *Structure (Camb)* 12, 41-53.

- Hidalgo-Zarco, F., Camacho, A.G., Bernier-Villamor, V., Nord, J., Ruiz-Perez, L.M., and Gonzalez-Pacanowska, D. (2001). Kinetic properties and inhibition of the dimeric dUTPase-dUDPase from *Leishmania major*. *Protein Sci* 10, 1426-1433.
- Hidalgo-Zarco, F., and Gonzalez-Pazanowska, D. (2001). Trypanosomal dUTPases as potential targets for drug design. *Curr Protein Pept Sci* 2, 389-397.
- Hofer, A., Ekanem, J.T., and Thelander, L. (1998). Allosteric regulation of *Trypanosoma brucei* ribonucleotide reductase studied in vitro and in vivo. *J Biol Chem* 273, 34098-34104.
- Hokari, S., Horikawa, S., Tsukada, K., and Sakagishi, Y. (1995). Expression of deoxyuridine triphosphatase during liver regeneration in rat. *Biochem Mol Biol Int* 37, 583-590.
- Huschtscha, L.I., Bartier, W.A., Ross, C.E., and Tattersall, M.H. (1996). Characteristics of cancer cell death after exposure to cytotoxic drugs in vitro. *Br J Cancer* 73, 54-60.
- Hwang, K.Y., Chung, J.H., Kim, S.H., Han, Y.S., and Cho, Y. (1999). Structure-based identification of a novel NTPase from *Methanococcus jannaschii*. *Nat Struct Biol* 6, 691-696.
- Ingraham, H.A., Dickey, L., and Goulian, M. (1986). DNA fragmentation and cytotoxicity from increased cellular deoxyuridylate. *Biochemistry* 25, 3225-3230.
- Ivanetich, K.M., and Santi, D.V. (1990). Bifunctional thymidylate synthase-dihydrofolate reductase in protozoa. *Faseb J* 4, 1591-1597.
- Johansson, E., Fano, M., Bynck, J.H., Neuhard, J., Larsen, S., Sigurskjold, B.W., Christensen, U., and Willemoes, M. (2005). Structures of dCTP deaminase from *Escherichia coli* with bound substrate and product: reaction mechanism and determinants of mono- and bifunctionality for a family of enzymes. *J Biol Chem* 280, 3051-3059.
- Johnston, L.H., and Lowndes, N.F. (1992). Cell cycle control of DNA synthesis in budding yeast. *Nucleic Acids Res* 20, 2403-2410.
- Jons, A., Gerdts, V., Lange, E., Kaden, V., and Mettenleiter, T.C. (1997). Attenuation of dUTPase-deficient pseudorabies virus for the natural host. *Vet Microbiol* 56, 47-54.
- Jons, A., and Mettenleiter, T.C. (1996). Identification and characterization of pseudorabies virus dUTPase. *J Virol* 70, 1242-1245.
- Kavli, B., Otterlei, M., Slupphaug, G., and Krokan, H.E. (2007). Uracil in DNA-General mutagen, but normal intermediate in acquired immunity. *DNA Repair (Amst)* 6, 505-516.
- Knighton, D.R., Kan, C.C., Howland, E., Janson, C.A., Hostomska, Z., Welsh, K.M., and Matthews, D.A. (1994). Structure of and kinetic channelling in bifunctional dihydrofolate reductase-thymidylate synthase. *Nat Struct Biol* 1, 186-194.

- Koehler, S.E., and Ladner, R.D. (2004). Small interfering RNA-mediated suppression of dUTPase sensitizes cancer cell lines to thymidylate synthase inhibition. *Mol Pharmacol* 66, 620-626.
- Kouzminova, E.A., and Kuzminov, A. (2004). Chromosomal fragmentation in dUTPase-deficient mutants of *Escherichia coli* and its recombinational repair. *Mol Microbiol* 51, 1279-1295.
- Kremmer, E., Sommer, P., and Grasser, F.A. (1997). Epstein-Barr virus-encoded deoxyuridine triphosphate nucleotidohydrolase (dUTPase): a potential target for drug therapy. *Transplant Proc* 29, 812-814.
- Kunz, B.A., and Kohalmi, S.E. (1991). Modulation of mutagenesis by deoxyribonucleotide levels. *Annu Rev Genet* 25, 339-359.
- Kunz, B.A., Kohalmi, S.E., Kunkel, T.A., Mathews, C.K., McIntosh, E.M., and Reidy, J.A. (1994). International Commission for Protection Against Environmental Mutagens and Carcinogens. Deoxyribonucleoside triphosphate levels: a critical factor in the maintenance of genetic stability. *Mutat Res* 318, 1-64.
- LaCount, D.J., Bruse, S., Hill, K.L., and Donelson, J.E. (2000). Double-stranded RNA interference in *Trypanosoma brucei* using head-to-head promoters. *Mol Biochem Parasitol* 111, 67-76.
- Ladner, R.D., and Caradonna, S.J. (1997). The human dUTPase gene encodes both nuclear and mitochondrial isoforms. Differential expression of the isoforms and characterization of a cDNA encoding the mitochondrial species. *J Biol Chem* 272, 19072-19080.
- Ladner, R.D., Carr, S.A., Huddleston, M.J., McNulty, D.E., and Caradonna, S.J. (1996). Identification of a consensus cyclin-dependent kinase phosphorylation site unique to the nuclear form of human deoxyuridine triphosphate nucleotidohydrolase. *J Biol Chem* 271, 7752-7757.
- Ladner, R.D., Lynch, F.J., Groshen, S., Xiong, Y.P., Sherrod, A., Caradonna, S.J., Stoehlmacher, J., and Lenz, H.J. (2000). dUTP nucleotidohydrolase isoform expression in normal and neoplastic tissues: association with survival and response to 5-fluorouracil in colorectal cancer. *Cancer Res* 60, 3493-3503.
- Ladner, R.D., McNulty, D.E., Carr, S.A., Roberts, G.D., and Caradonna, S.J. (1996). Characterization of distinct nuclear and mitochondrial forms of human deoxyuridine triphosphate nucleotidohydrolase. *J Biol Chem* 271, 7745-7751.
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- Larsson, G., Nyman, P.O., and Kvassman, J.O. (1996a). Kinetic characterization of dUTPase from *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 271, 24010-24016.

- Larsson, G., Svensson, L.A., and Nyman, P.O. (1996b). Crystal structure of the Escherichia coli dUTPase in complex with a substrate analogue (dUDP). *Nat Struct Biol* 3, 532-538.
- Lau, G.T., Wong, O.G., Chan, P.M., Kok, K.H., Wong, R.L., Chin, K.T., Lin, M.C., Kung, H.F., and Chow, K.L. (2001). Embryonic XMab2112 expression is required for gastrulation and subsequent neural development. *Biochem Biophys Res Commun* 280, 1378-1384.
- Lawhorn, B.G., Mehl, R.A., and Begley, T.P. (2004). Biosynthesis of the thiamin pyrimidine: the reconstitution of a remarkable rearrangement reaction. *Org Biomol Chem* 2, 2538-2546.
- Lee, R.C., and Ambros, V. (2001). An extensive class of small RNAs in *Caenorhabditis elegans*. *Science* 294, 862-864.
- Lerner, D.L., Wagaman, P.C., Phillips, T.R., Prospero-Garcia, O., Henriksen, S.J., Fox, H.S., Bloom, F.E., and Elder, J.H. (1995). Increased mutation frequency of feline immunodeficiency virus lacking functional deoxyuridine-triphosphatase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 7480-7484.
- Liang, X., Tang, M., Manns, B., Babiuk, L.A., and Zamb, T.J. (1993). Identification and deletion mutagenesis of the bovine herpesvirus 1 dUTPase gene and a gene homologous to herpes simplex virus UL49.5. *Virology* 195, 42-50.
- Lichtenstein, D.L., Rushlow, K.E., Cook, R.F., Raabe, M.L., Swardson, C.J., Kociba, G.J., Issel, C.J., and Montelaro, R.C. (1995). Replication in vitro and in vivo of an equine infectious anemia virus mutant deficient in dUTPase activity. *J Virol* 69, 2881-2888.
- Lippman, Z., May, B., Yordan, C., Singer, T., and Martienssen, R. (2003). Distinct mechanisms determine transposon inheritance and methylation via small interfering RNA and histone modification. *PLoS Biol* 1, E67.
- Lirette, R., and Caradonna, S. (1990). Inhibition of phosphorylation of cellular dUTP nucleotidohydrolase as a consequence of herpes simplex virus infection. *J Cell Biochem* 43, 339-353.
- Liu, B., Liu, Y., Motyka, S.A., Agbo, E.E., and Englund, P.T. (2005). Fellowship of the rings: the replication of kinetoplast DNA. *Trends Parasitol* 21, 363-369.
- Lu, X., Bocangel, D., Nannenga, B., Yamaguchi, H., Appella, E., and Donehower, L.A. (2004). The p53-induced oncogenic phosphatase PPM1D interacts with uracil DNA glycosylase and suppresses base excision repair. *Mol Cell* 15, 621-634.
- Maki, H., and Sekiguchi, M. (1992). MutT protein specifically hydrolyses a potent mutagenic substrate for DNA synthesis. *Nature* 355, 273-275.
- Mathews, C.K. (1993). Enzyme organization in DNA precursor biosynthesis. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 44, 167-203.

- Matthews, K.R., Tschudi, C., and Ullu, E. (1994). A common pyrimidine-rich motif governs trans-splicing and polyadenylation of tubulin polycistronic pre-mRNA in trypanosomes. *Genes Dev* 8, 491-501.
- McGeehan, J.E., Depledge, N.W., and McGeoch, D.J. (2001). Evolution of the dUTPase gene of mammalian and avian herpesviruses. *Curr Protein Pept Sci* 2, 325-333.
- McGeoch, D.J. (1990). Protein sequence comparisons show that the 'pseudoproteases' encoded by poxviruses and certain retroviruses belong to the deoxyuridine triphosphatase family. *Nucleic Acids Res* 18, 4105-4110.
- McIntosh, E.M., Ager, D.D., Gadsden, M.H., and Haynes, R.H. (1992). Human dUTP pyrophosphatase: cDNA sequence and potential biological importance of the enzyme. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 8020-8024.
- McIntosh, E.M., and Haynes, R.H. (1997). dUTP pyrophosphatase as a potential target for chemotherapeutic drug development. *Acta Biochim Pol* 44, 159-171.
- McIntosh, E.M., Looser, J., Haynes, R.H., and Pearlman, R.E. (1994). MluI site-dependent transcriptional regulation of the *Candida albicans* dUTPase gene. *Curr Genet* 26, 415-421.
- Mette, M.F., Aufsatz, W., van der Winden, J., Matzke, M.A., and Matzke, A.J. (2000). Transcriptional silencing and promoter methylation triggered by double-stranded RNA. *Embo J* 19, 5194-5201.
- Meuth, M. (1989). The molecular basis of mutations induced by deoxyribonucleoside triphosphate pool imbalances in mammalian cells. *Exp Cell Res* 181, 305-316.
- Michels, P.A., Bringaud, F., Herman, M., and Hannaert, V. (2006). Metabolic functions of glycosomes in trypanosomatids. *Biochim Biophys Acta* 1763, 1463-1477.
- Mildvan, D., Spritzler, J., Grossberg, S.E., Fahey, J.L., Johnston, D.M., Schock, B.R., and Kagan, J. (2005). Serum neopterin, an immune activation marker, independently predicts disease progression in advanced HIV-1 infection. *Clin Infect Dis* 40, 853-858.
- Milhausen, M., Nelson, R.G., Sather, S., Selkirk, M., and Agabian, N. (1984). Identification of a small RNA containing the trypanosome spliced leader: a donor of shared 5' sequences of trypanosomatid mRNAs? *Cell* 38, 721-729.
- Minasov, G., Teplova, M., Stewart, G.C., Koonin, E.V., Anderson, W.F., and Egli, M. (2000). Functional implications from crystal structures of the conserved *Bacillus subtilis* protein Maf with and without dUTP. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 6328-6333.
- Mochizuki, K., Fine, N.A., Fujisawa, T., and Gorovsky, M.A. (2002). Analysis of a piwi-related gene implicates small RNAs in genome rearrangement in tetrahymena. *Cell* 110, 689-699.
- Mol, C.D., Harris, J.M., McIntosh, E.M., and Tainer, J.A. (1996). Human dUTP pyrophosphatase: uracil recognition by a beta hairpin and active sites formed by three separate subunits. *Structure* 4, 1077-1092.

- Moroz, O.V., Harkiolaki, M., Galperin, M.Y., Vagin, A.A., Gonzalez-Pacanowska, D., and Wilson, K.S. (2004). The crystal structure of a complex of *Campylobacter jejuni* dUTPase with substrate analogue sheds light on the mechanism and suggests the "basic module" for dimeric d(C/U)TPases. *J Mol Biol* 342, 1583-1597.
- Moroz, O.V., Murzin, A.G., Makarova, K.S., Koonin, E.V., Wilson, K.S., and Galperin, M.Y. (2005). Dimeric dUTPases, HisE, and MazG belong to a new superfamily of all-alpha NTP pyrophosphohydrolases with potential "house-cleaning" functions. *J Mol Biol* 347, 243-255.
- Motyka, S.A., and Englund, P.T. (2004). RNA interference for analysis of gene function in trypanosomatids. *Curr Opin Microbiol* 7, 362-368.
- Navarro, M., and Gull, K. (2001). A pol I transcriptional body associated with VSG mono-allelic expression in *Trypanosoma brucei*. *Nature* 414, 759-763.
- Ngo, H., Tschudi, C., Gull, K., and Ullu, E. (1998). Double-stranded RNA induces mRNA degradation in *Trypanosoma brucei*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 14687-14692.
- Nguyen, C., Kasinathan, G., Leal-Cortijo, I., Musso-Buendia, A., Kaiser, M., Brun, R., Ruiz-Perez, L.M., Johansson, N.G., Gonzalez-Pacanowska, D., and Gilbert, I.H. (2005). Deoxyuridine Triphosphate Nucleotidohydrolase as a Potential Antiparasitic Drug Target. *J Med Chem* 48, 5942-5954.
- Nord, J., Larsson, G., Kvassman, J.O., Rosengren, A.M., and Nyman, P.O. (1997). dUTPase from the retrovirus equine infectious anemia virus: specificity, turnover and inhibition. *FEBS Lett* 414, 271-274.
- Noskov, V.N., Staak, K., Shcherbakova, P.V., Kozmin, S.G., Negishi, K., Ono, B.C., Hayatsu, H., and Pavlov, Y.I. (1996). HAM1, the gene controlling 6-N-hydroxylaminopurine sensitivity and mutagenesis in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 12, 17-29.
- Olmo, A., Arrebola, R., Bernier, V., Gonzalez-Pacanowska, D., and Ruiz-Perez, L.M. (1995). Co-existence of circular and multiple linear amplicons in methotrexate-resistant *Leishmania*. *Nucleic Acids Res* 23, 2856-2864.
- Papageorgiou, I.G., Yakob, L., Al Salabi, M.I., Diallinas, G., Soteriadou, K.P., and De Koning, H.P. (2005). Identification of the first pyrimidine nucleobase transporter in *Leishmania*: similarities with the *Trypanosoma brucei* U1 transporter and antileishmanial activity of uracil analogues. *Parasitology* 130, 275-283.
- Pardo, E.G., and Gutierrez, C. (1990). Cell cycle- and differentiation stage-dependent variation of dUTPase activity in higher plant cells. *Exp Cell Res* 186, 90-98.
- Parsels, L.A., Parsels, J.D., Wagner, L.M., Loney, T.L., Radany, E.H., and Maybaum, J. (1998). Mechanism and pharmacological specificity of dUTPase-mediated protection from DNA damage and cytotoxicity in human tumor cells. *Cancer Chemother Pharmacol* 42, 357-362.

- Pena-Diaz, J., Akbari, M., Sundheim, O., Esther Farez-Vidal, M., Andersen, S., Sneve, R., Gonzalez-Pacanowska, D., Krokan, H.E., and Slupphaug, G. (2004). Trypanosoma cruzi Contains a Single Detectable Uracil-DNA Glycosylase and Repairs Uracil Exclusively Via Short Patch Base Excision Repair. *J Mol Biol* 342, 787-799.
- Perry, K.L., Watkins, K.P., and Agabian, N. (1987). Trypanosome mRNAs have unusual "cap 4" structures acquired by addition of a spliced leader. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84, 8190-8194.
- Pham, P., Bransteitter, R., and Goodman, M.F. (2005). Reward versus risk: DNA cytidine deaminases triggering immunity and disease. *Biochemistry* 44, 2703-2715.
- Price, R.A., and Frato, J. (1975). *Bacillus subtilis* deoxyuridinetriphosphatase and its Bacteriophage PBS-2 induced inhibitor. *The Journal of Biological Chemistry* 250, 8804-8811.
- Phillips, T.A., VanBogelen, R.A., and Neidhardt, F.C. (1984). Ion gene product of *Escherichia coli* is a heat-shock protein. *J Bacteriol* 159, 283-287.
- Prasad, G.S., Stura, E.A., Elder, J.H., and Stout, C.D. (2000). Structures of feline immunodeficiency virus dUTP pyrophosphatase and its nucleotide complexes in three crystal forms. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 56 (Pt 9), 1100-1109.
- Priet, S., Gros, N., Navarro, J.M., Boretto, J., Canard, B., Querat, G., and Sire, J. (2005). HIV-1-associated uracil DNA glycosylase activity controls dUTP misincorporation in viral DNA and is essential to the HIV-1 life cycle. *Mol Cell* 17, 479-490.
- Pu, W.T., and Struhl, K. (1992). Uracil interference, a rapid and general method for defining protein-DNA interactions involving the 5-methyl group of thymines: the GCN4-DNA complex. *Nucleic Acids Res* 20, 771-775.
- Pyles, R.B., Sawtell, N.M., and Thompson, R.L. (1992). Herpes simplex virus type 1 dUTPase mutants are attenuated for neurovirulence, neuroinvasiveness, and reactivation from latency. *J Virol* 66, 6706-6713.
- Reche, P., Arrebola, R., Olmo, A., Santi, D.V., Gonzalez-Pacanowska, D., and Ruiz-Perez, L.M. (1994). Cloning and expression of the dihydrofolate reductase-thymidylate synthase gene from *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol* 65, 247-258.
- Reichard, P. (1988). Interactions between deoxyribonucleotide and DNA synthesis. *Annu Rev Biochem* 57, 349-374.
- Robello, C., Navarro, P., Castanys, S., and Gamarro, F. (1997). A pteridine reductase gene ptr1 contiguous to a P-glycoprotein confers resistance to antifolates in *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol* 90, 525-535.
- Robinson, N.P., Burman, N., Melville, S.E., and Barry, J.D. (1999). Predominance of duplicative VSG gene conversion in antigenic variation in African trypanosomes. *Mol Cell Biol* 19, 5839-5846.

- Rode, W., Dabrowska, M., Zielinski, Z., Golos, B., Wranicz, M., Felczak, K., and Kulikowski, T. (2000). *Trichinella spiralis* and *Trichinella pseudospiralis*: developmental patterns of enzymes involved in thymidylate biosynthesis and pyrimidine salvage. *Parasitology* 120 (Pt 6), 593-600.
- Romeike, B.F., Bockeler, A., Kremmer, E., Sommer, P., Grasser, F., and Krick, C. (2005). Immunohistochemical detection of dUTPase in intracranial tumors. *Pathol Res Pract* 201, 727-732.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T. (eds.) (1989). *Molecular cloning: A laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press: Cold Spring Harbor, NY.
- Sanger, F., Nicklen, S., and Coulson, A.R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74, 5463-5467.
- Saraswat, V., Massiah, M.A., Lopez, G., Amzel, L.M., and Mildvan, A.S. (2002). Interactions of the products, 8-oxo-dGMP, dGMP, and pyrophosphate with the MutT nucleoside triphosphate pyrophosphohydrolase. *Biochemistry* 41, 15566-15577.
- Schimanski, B., Brandenburg, J., Nguyen, T.N., Caimano, M.J., and Gunzl, A. (2006). A TFIIB-like protein is indispensable for spliced leader RNA gene transcription in *Trypanosoma brucei*. *Nucleic Acids Res* 34, 1676-1684.
- Sedwick, W.D., Kutler, M., and Brown, O.E. (1981). Antifolate-induced misincorporation of deoxyuridine monophosphate into DNA: inhibition of high molecular weight DNA synthesis in human lymphoblastoid cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 78, 917-921.
- Segel, I.H. (ed.) (1975). *Enzyme Kinetics: Behaviour and Analysis of Rapid Equilibrium and Steady-State Enzyme-System*. Wiley Interscience, John Wiley and Sons.
- Shao, H., Robek, M.D., Threadgill, D.S., Mankowski, L.S., Cameron, C.E., Fuller, F.J., and Payne, S.L. (1997). Characterization and mutational studies of equine infectious anemia virus dUTPase. *Biochim Biophys Acta* 1339, 181-191.
- Shapiro, T.A., and Englund, P.T. (1995). The structure and replication of kinetoplast DNA. *Annu Rev Microbiol* 49, 117-143.
- Sherman, P.A., and Fyfe, J.A. (1989). Enzymatic assay for deoxyribonucleoside triphosphates using synthetic oligonucleotides as template primers. *Anal Biochem* 180, 222-226.
- Shi, H., Djikeng, A., Mark, T., Wirtz, E., Tschudi, C., and Ullu, E. (2000). Genetic interference in *Trypanosoma brucei* by heritable and inducible double-stranded RNA. *Rna* 6, 1069-1076.
- Simpson, A.M., Neckelmann, N., de la Cruz, V.F., Muhich, M.L., and Simpson, L. (1985). Mapping and 5' end determination of kinetoplast maxicircle gene transcripts from *Leishmania tarentolae*. *Nucleic Acids Res* 13, 5977-5993.

Sommer, P., Kremmer, E., Bier, S., Konig, S., Zalud, P., Zeppezauer, M., Jones, J.F., Mueller-Lantsch, N., and Grasser, F.A. (1996). Cloning and expression of the Epstein-Barr virus-encoded dUTPase: patients with acute, reactivated or chronic virus infection develop antibodies against the enzyme. *J Gen Virol* 77 (Pt 11), 2795-2805.

Song, M.J., Hwang, S., Wong, W.H., Wu, T.T., Lee, S., Liao, H.I., and Sun, R. (2005). Identification of viral genes essential for replication of murine gamma-herpesvirus 68 using signature-tagged mutagenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 3805-3810.

Southern, E.M. (1974). An improved method for transferring nucleotides from electrophoresis strips to thin layers of ion-exchange cellulose. *Anal Biochem* 62, 317-318.

Spielmann, T., and Beck, H.P. (2000). Analysis of stage-specific transcription in plasmodium falciparum reveals a set of genes exclusively transcribed in ring stage parasites. *Mol Biochem Parasitol* 111, 453-458.

Strahler, J.R., Zhu, X.X., Hora, N., Wang, Y.K., Andrews, P.C., Roseman, N.A., Neel, J.V., Turka, L., and Hanash, S.M. (1993). Maturation stage and proliferation-dependent expression of dUTPase in human T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 4991-4995.

Stuart, K.D., Schnauffer, A., Ernst, N.L., and Panigrahi, A.K. (2005). Complex management: RNA editing in trypanosomes. *Trends Biochem Sci* 30, 97-105.

Studebaker, A.W., Lafuse, W.P., Kloesel, R., and Williams, M.V. (2005). Modulation of human dUTPase using small interfering RNA. *Biochem Biophys Res Commun* 327, 306-310.

Studier, F.W., and Moffatt, B.A. (1986). Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J Mol Biol* 189, 113-130.

Sung, J.S., and Demple, B. (2006). Roles of base excision repair subpathways in correcting oxidized abasic sites in DNA. *Febs J* 273, 1620-1629.

Swart, W.J., Jr., and Warner, H.R. (1985). Isolation and partial characterization of a bacteriophage T5 mutant unable to induce thymidylate synthetase and its use in studying the effect of uracil incorporation into DNA on early gene expression. *J Virol* 54, 86-91.

Tamanoi, F., and Okazaki, T. (1978). Uracil incorporation into nascent DNA of thymine-requiring mutant of *Bacillus subtilis* 168. *Proc Natl Acad Sci U S A* 75, 2195-2199.

Tarbouriech, N., Buisson, M., Seigneurin, J.M., Cusack, S., and Burmeister, W.P. (2005). The Monomeric dUTPase from Epstein-Barr Virus Mimics Trimeric dUTPases. *Structure (Camb)* 13, 1299-1310.

Taylor, J.E., and Rudenko, G. (2006). Switching trypanosome coats: what's in the wardrobe? *Trends Genet* 22, 614-620.

Tinkelenberg, B.A., Fazzone, W., Lynch, F.J., and Ladner, R.D. (2003). Identification of sequence determinants of human nuclear dUTPase isoform localization. *Exp Cell Res* 287, 39-46.

Titz, B., Hauser, R., Engelbrecher, A., and Uetz, P. (2007). The *Escherichia coli* protein YjjG is a house-cleaning nucleotidase in vivo. *FEMS Microbiol Lett*.

Tu, X., Kumar, P., Li, Z., and Wang, C.C. (2006). An aurora kinase homologue is involved in regulating both mitosis and cytokinesis in *Trypanosoma brucei*. *J Biol Chem* 281, 9677-9687.

Turelli, P., Guiguen, F., Mornex, J.F., Vigne, R., and Querat, G. (1997). dUTPase-minus caprine arthritis-encephalitis virus is attenuated for pathogenesis and accumulates G-to-A substitutions. *J Virol* 71, 4522-4530.

Turnquist, R.L., and Hansen, G. (eds.) (1973). *The enzymes*. Ed. Boyer P.D. Academic Press: New York.

Tschudi, C., and Ullu, E. (1988). Polygene transcripts are precursors to calmodulin mRNAs in trypanosomes. *Embo J* 7, 455-463.

Tye, B.K., Nyman, P.O., and Lehman, I.R. (1978). Excision repair of uracil during replication of phiX174 DNA in vitro. *Biochem Biophys Res Commun* 82, 434-441.

Tye, B.K., Nyman, P.O., Lehman, I.R., Hochhauser, S., and Weiss, B. (1977). Transient accumulation of Okazaki fragments as a result of uracil incorporation into nascent DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74, 154-157.

van den Hoff, M.J., Moorman, A.F., and Lamers, W.H. (1992). Electroporation in 'intracellular' buffer increases cell survival. *Nucleic Acids Res* 20, 2902.

Wilson, C.M. (1983). Staining of proteins on gels: comparisons of dyes and procedures. *Methods Enzymol* 91, 236-247.

Volpe, T.A., Kidner, C., Hall, I.M., Teng, G., Grewal, S.I., and Martienssen, R.A. (2002). Regulation of heterochromatic silencing and histone H3 lysine-9 methylation by RNAi. *Science* 297, 1833-1837.

Wang, L., and Weiss, B. (1992). *dcd* (dCTP deaminase) gene of *Escherichia coli*: mapping, cloning, sequencing, and identification as a locus of suppressors of lethal *dut* (dUTPase) mutations. *J Bacteriol* 174, 5647-5653.

Warner, H.R., and Barnes, J.E. (1966). Evidence for a dual role for the bacteriophage T4-induced deoxycytidine triphosphate nucleotidohydrolase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 56, 1233-1240.

Wheeler, L.J., Ray, N.B., Ungermann, C., Hendricks, S.P., Bernard, M.A., Hanson, E.S., and Mathews, C.K. (1996). T4 phage gene 32 protein as a candidate organizing factor

for the deoxyribonucleoside triphosphate synthetase complex. *J Biol Chem* 271, 11156-11162.

Whittingham, J.L., Leal, I., Nguyen, C., Kasinathan, G., Bell, E., Jones, A.F., Berry, C., Benito, A., Turkenburg, J.P., Dodson, E.J., Ruiz Perez, L.M., Wilkinson, A.J., Johansson, N.G., Brun, R., Gilbert, I.H., Gonzalez Pacanowska, D., and Wilson, K.S. (2005). dUTPase as a platform for antimalarial drug design: structural basis for the selectivity of a class of nucleoside inhibitors. *Structure (Camb)* 13, 329-338.

Wickstead, B., Ersfeld, K., and Gull, K. (2003). The mitotic stability of the minichromosomes of *Trypanosoma brucei*. *Mol Biochem Parasitol* 132, 97-100.

Wilson, D.M., 3rd, and Bohr, V.A. (2007). The mechanics of base excision repair, and its relationship to aging and disease. *DNA Repair (Amst)* 6, 544-559.

Williams, M.V., and Studebaker, A.W. (2004). Down-regulation of human deoxyuridine triphosphate nucleotidohydrolase (dUTPase) using small interfering RNA (siRNA). *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids* 23, 1467-1470.

Wirtz, E., Leal, S., Ochatt, C., and Cross, G.A. (1999). A tightly regulated inducible expression system for conditional gene knock-outs and dominant-negative genetics in *Trypanosoma brucei*. *Mol Biochem Parasitol* 99, 89-101.

Wohlrab, F., Garrett, B.K., and Francke, B. (1982). Control of expression of the herpes simplex virus-induced deoxypyrimidine triphosphatase in cells infected with mutants of herpes simplex virus types 1 and 2 and intertypic recombinants. *J Virol* 43, 935-942.

Wu, B., Liu, Y., Zhao, Q., Liao, S., Zhang, J., Bartlam, M., Chen, W., and Rao, Z. (2007). Crystal structure of RS21-C6, involved in nucleoside triphosphate pyrophosphohydrolysis. *J Mol Biol* 367, 1405-1412.

Wu, B., Liu, Y., Zhao, Q., Liao, S., Zhang, J., Bartlam, M., Chen, W., and Rao, Z. (2007). Crystal structure of RS21-C6, involved in nucleoside triphosphate pyrophosphohydrolysis. *J Mol Biol* 367, 1405-1412.

Wu, M., Shen, J., Zhan, J., and Yu, Y. (2006). dUTP Pyrophosphatase, its appearance in extracellular compartment may serve as a potential biomarker for N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine exposure in mammalian cells. *Proteomics* 6, 3001-3007.

Zhao, Z., Ke, F., Gui, J., and Zhang, Q. (2007). Characterization of an early gene encoding for dUTPase in *Rana grylio* virus. *Virus Res* 123, 128-137.

Zilberman, D., Cao, X., and Jacobsen, S.E. (2003). ARGONAUTE4 control of locus-specific siRNA accumulation and DNA and histone methylation. *Science* 299, 716-719.