



Universidad de Granada

ipbln

INSTITUTO DE PARASITOLOGÍA Y BIOMEDICINA
"LÓPEZ-NEYRA"



CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA Y FUNCIONAL DE LAS PÉPTIDO DEFORMILASAS DE Tripanosomátidos

CARLOS ALBERTO RODRÍGUES POVEDA

Tesis Doctoral

Noviembre 2010

Editor: Editorial de la Universidad de Granada
Autor: Carlos Alberto Rodríguez Poveda
D.L.: GR 1982-2011
ISBN: 978-84-694-1171-1

**CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA Y FUNCIONAL DE
LAS PÉPTIDO DEFORMILASAS DE *Trypanosoma***

Memoria presentada por el Licenciado
Carlos Alberto Rodrigues Poveda para
optar al grado de Doctor en Biología

Granada, Noviembre de 2010

Carlos Alberto Rodrigues Poveda

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

Luis Miguel Ruiz Pérez

Investigadora Científica

Científico Titular

AGRADECIMIENTOS

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar mi eterno agradecimiento a la Dra. González Pacanoswka “Lola” y al Dr. Luis Miguel Ruiz Pérez, por hacer posible nuestro viaje a España, por aceptar dirigir este trabajo y por poner a mi disposición todos los recursos necesarios para desarrollarlo. Por su paciencia ante mi insistencia y por su estricta orientación en los momentos críticos, porque con su trato me hicieron sentir como parte de una familia y por haberse ganado todo mi cariño y admiración.

Al Dr. Julio Urbina por su confianza y apoyo a lo largo de todos estos años, por ser el principal artífice de mi formación científica, por darme la oportunidad de iniciarme en la investigación bajo su supervisión en Venezuela y por permitirme la oportunidad de vivir esta maravillosa experiencia... a él mi permanente admiración y agradecimiento.

A la Howard Hugues Medical Institute por financiar el viaje a España y subvencionar mi trabajo.

A todos mis compañeros: Guiomar Pérez, Victor Castillo, Cristina Bosch, Cristina Requena, Paula Sánchez, Eliseo Recio, Pilar Olivella, Marco Sealey, Alex Muso, Jana Carrero, Fernando Aguilar y Aurora Constan por hacerme sentir como miembro de una hermandad y por todos los buenos momentos tanto dentro como fuera del laboratorio.

A los Dres. Antonio Vidal y Antonio Estévez por las interesantes discusiones científicas y por toda su aportación en los planteamientos experimentales ejecutados a lo largo de este trabajo.

A los Dres. Francisco Gamarro y Santiago Castanys y a todo su grupo por la colaboración prestada, principalmente a los Dres. Maria Pérez y Francisco “Patxi” Muñoz, así como también a Luis Carvalho e Ignacio, por su buena disposición cada vez que necesitábamos de asesoría para la ejecución de los experimentos requeridos, igualmente quiero agradecer al Dres. Jenny Campos y Jean Mathieu Bart por su desinteresada y oportuna asistencia, especialmente en el manejo del microscopio y el análisis de las imágenes.

A toda la gente del Instituto de Parasitología y Biomedicina López Neyra, desde personal científico titular, personal de investigación predoctoral (becarios) y

AGRADECIMIENTOS

postdoctoral, a todos los encargados de los diferentes servicios, desde administración, departamento de informática, biblioteca, servicios de secuenciación, animalario, síntesis de oligos, esterilización, seguridad y mantenimiento integral de instalaciones y equipos...a todos gracias por su colaboración y amistad.

Al Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC), especialmente al Dr. Gonzalo Visbal y a su grupo, por llevar a cabo todos los análisis lipídicos.

Al servicio de Microscopía Electrónica del Centro de Instrumentación Científica (CIC) de la Universidad de Granada.

A Joaquín Martínez por las sugerencias y aportes gráficos para el diseño de la portada.

Al Sr. David Teixeira por todas sus enseñanzas a lo largo de todos estos años y su apoyo incondicional, tanto dentro como fuera de Venezuela.

A toda mi familia y amigos en Venezuela.

Agradecer especialmente a mi esposa Andreina Peralta por todo su cariño, paciencia y comprensión durante los años dedicados a la realización de este trabajo.

A mi querida Granada y a toda su gente.

DEDICATORIA

DEDICATORIA

Esta Tesis va dedicada a toda esa gente que sufre de enfermedades olvidadas y que aun conservan la esperanza de una vida mas digna.

A mi querida Madre, a mi hermano y muy especialmente a mi querida esposa... solo Dios y tu saben cuanto me has hecho crecer...

A Dios por cada respiro.

ÍNDICE

INDICE

A. INTRODUCCIÓN	1
A.I. INTRODUCCIÓN.....	1
A.I.1. Enfermedades Olvidadas.....	1
A.II. ASPECTOS RELEVANTES DE LA FAMILIA <i>TRYPANOSOMATIDAE</i>	1
A.II.1. Taxonomía y ciclo de vida.....	1
A.II.2. Epidemiología y transmisión.....	2
A.II.3. <i>Trypanosoma brucei</i>	2
A.II.4. <i>Trypanosoma cruzi</i>	3
A.III. INICIO Y PROGRESIÓN DE LA ENFERMEDAD.....	4
A.III.1. Tripanosomiasis africana.....	7
A.III.2. Enfermedad de Chagas.....	7
A.IV. QUIMIOTERAPIA CONTRA LA TRIPANOSOMIASIS.....	8
A.V. ASPECTOS RELEVANTES DE LA BIOQUÍMICA DE <i>T. brucei</i>	10
A.V.1. Características del metabolismo mitocondrial.....	10
A.V.2. Metabolismo energético.....	13
A.V.3. Forma sanguínea.....	14
A.V.4. Forma procíclica.....	16
A.V.5. Traducción mitocondrial.....	17
A.V.6. Iniciación de la traducción mitocondrial en <i>T. brucei</i>	20
A.V.7. Aminoacilación de RNAt.....	20
A.V.8. AaRS en eucariotas.....	20
A.VI. PROCESAMIENTO POST-TRADUCCIONAL.....	21
A.VII. PÉPTIDO DEFORMILASA (PDF).....	21
A.VII.1. Características estructurales de la PDF.....	23
A.VII.2. Sitio de unión del cofactor metálico.....	26
A.VII.3. Localización intracelular de la PDF en células eucariotas.....	28
A.VII.4. Clasificación de las PDFs.....	28
A) PDFs de tipo 1.....	29
B) PDFs de tipo 2.....	30

C) PDFs de tipo 3.....	30
A.VII.5. PDF como blanco para el diseño de antibióticos y antitumorales.....	32
A.VIII. RUTA DE ESCISIÓN DE METIONINA N-TERMINAL (NME).....	33
A.IX. LAS PÉPTIDO DEFORMILASAS DE TRIPANOSOMÁTIDOS COMO DIANAS TERAPÉUTICAS FRENTE A ENFERMEDADES PROTOZOARIAS.....	37
B. MATERIALES Y MÉTODOS.....	41
B.I. MATERIALES.....	41
B.I.1. LÍNEAS CELULARES.....	41
B.I.1.1. Parásitos.....	41
B.I.1.2. Bacterias.....	41
B.I.2. MEDIOS DE CULTIVO.....	42
B.I.2.1. Para parásitos.....	42
B.I.3. MATERIAL PARA BIOLOGÍA MOLECULAR.....	51
B.I.3.1. Vectores.....	51
B.I.3.2. Oligonucleótidos.....	52
B.I.3.3. Sondas fluorescentes.....	52
B.I.4. SOFTWARE.....	53
B.II. MÉTODOS.....	54
B.II.1. CULTIVO Y MANIPULACIÓN DE CÉLULAS.....	54
B.II.1.1. Parásitos.....	54
B.II.1.2. Bacterias.....	56
B.II.2. TÉCNICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR.....	57
B.II.3. TÉCNICAS PARA EL ESTUDIO DE LA PROTEÍNA.....	57
B.II.3.1. Aislamiento y clonación de los genes PDF-1 y PDF-2 de <i>Trypanosoma brucei</i> , <i>Leishmania major</i> , <i>Trypanosoma cruzi</i> . Diseño de truncamientos para expresión de la proteína en forma soluble.....	57
B.II.3.2. Aislamiento del gen <i>def</i> de <i>E. coli</i> y obtención de extractos bacterianos que sobreexpresan la proteína.....	62
B.II.3.3. Purificación de la TcPDF-1 recombinante.....	64
B.II.3.4. Caracterización cinética de la proteína recombinante PDF-1 de <i>T. cruzi</i>	65
B.II.4. TÉCNICAS INMUNOLÓGICAS.....	67
B.II.4.1. Obtención de anticuerpos policlonales frente a la Δ N37TcPDF-1 y Δ N61TcPDF-2 de <i>T. cruzi</i>	67

B.II.4.2. Transferencia de proteínas, <i>Western blot</i>	65
B.II.4.3. Inmunodetección.....	68
B.II.5. ESTUDIO DE LA LOCALIZACIÓN INTRACELULAR DE LA PDF-1 y PDF2 DE <i>T. brucei</i>	68
B.II.5.1. Inmunofluorescencia.....	69
B.II.6. SILENCIAMIENTO MEDIANTE RNAi DE LA EXPRESIÓN DE LA PDF-1 y PDF-2 EN LA FORMA PROCICLIA Y SANGUÍNEA DE <i>T. brucei</i>	70
B.II.6.1. Construcción de plásmidos para el silenciamiento génico mediante RNAi.....	70
B.II.6.2. Estudio del efecto del RNAi sobre el crecimiento celular.....	71
B.II.6.3. Estudio del efecto de un doble silenciamiento de los genes de la PDF-1 y de la MTF en <i>T. brucei</i>	71
B.II.7. Doble reemplazo alélico condicionado del gen PDF-1 en la forma sanguínea de <i>T. brucei</i>	75
B.II.7.1. Construcción de plásmidos para el doble reemplazo alélico condicionado de PDF-1.....	75
B.II.8. Transfección estable por electroporación.....	77
B.II.8.1. Estudio del efecto del RNAi de la PDF-1 y PDF-2 sobre la proliferación celular.....	78
B.II.8.2. Análisis por Northern blot.....	79
B.II.8.3. Análisis por Southern blot.....	79
B.II.9. Estudios de microscopía electrónica de transmisión.....	79
B.III. DETERMINACIÓN DEL EFECTO COMBINADO DEL RNAI Y DE LOS FÁRMACOS OLIGOMICINA, TERBINAFINA Y KETOCONAZOL SOBRE LA PROLIFERACIÓN CELULAR.....	80
B.III.1.1. Análisis mediante FACS y microscopía de fluorescencia de la función mitocondrial en la forma procíclica y sanguínea de <i>T. brucei</i>	81
B.IV. ESTUDIOS SOBRE EL METABOLISMO DE LÍPIDOS DE LA FORMA PROCÍCLICA DE <i>T. brucei</i>	81
B.IV.1.1. Extracción y cuantificación de ácidos grasos totales.....	81
B.IV.1.2. Marcaje metabólico con [3H]mevalonato.....	82
B.IV.1.3. Separación y caracterización de la fracción de lípidos neutros.....	82
B.IV.1.4. Separación, identificación y cuantificación de la fracción de lípidos neutros.....	83
B.IV.2. Tinción con rojo Nilo y Filipina.....	84

C. OBJETIVOS	85
D. RESULTADOS	89
D.I. AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DEL GEN DE LA PÉPTIDO DEFORMILASA 1 Y 2 DE <i>Trypanosoma brucei</i> Y <i>Trypanosoma cruzi</i>	91
D.I.1. Aislamiento de los genes PDF-1 y PDF-2 de <i>T. brucei</i> y <i>T. cruzi</i>	91
D.II. EXPRESIÓN DE LAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES PDF-1 Y PDF-2 DE <i>T.</i> <i>cruzi</i> EN EL SISTEMA HETERÓLOGO <i>E. coli</i>	92
D.II.1. Construcción del sistema de expresión para TcPDF-1 y TcPDF-2.....	92
D.III. PURIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN CINÉTICA DE LA PDF-1 Y PDF-2 DE <i>T. brucei</i>	92
D.III.1. Purificación de la proteína recombinante Δ N37TcPDF-1.....	92
D.III.2. Determinación de la masa molecular de la PDF-1 nativa de <i>T. cruzi</i>	97
D.III.3. Determinación cuantitativa de la actividad TcPDF-1.....	98
D.III.4. Determinación de km , v_{max} y k_{cat} para el F-MAS.....	99
D.III.5. Efecto de la fuerza iónica y del ión divalente: activación e inhibición por cofactores metálicos.....	103
D.III.6. Efecto de agentes quelantes de iones sobre la actividad de la PDF-1 de <i>T.</i> <i>cruzi</i>	105
D.III.7. Efecto de inhibidores de metaloproteasas sobre la actividad de la PDF-1 de <i>T.</i> <i>cruzi</i>	106
D.III.8. Efecto de la actinonina sobre la actividad de la PDF-1 de <i>T. cruzi</i>	108
D.IV. LOCALIZACIÓN INTRACELULAR DE PDF-1 Y PDF-2 DE <i>T. brucei</i>	110
D.IV.1. Obtención de anticuerpos policlonales frente a la PDF-1 y PDF-2 de <i>T.</i> <i>cruzi</i>	110
D.IV.1.1. Estudio de la especificidad del anticuerpo anti-TcPDF-2 y anti-TcPDF-1 mediante <i>Western blot</i>	110
D.IV.1.2. Estudios de inmunofluorescencia.....	112
D.V. PAPEL DE LA PDF-1 Y PDF-2 DE <i>T. brucei</i> EN LA PROLIFERACIÓN CELULAR.....	113
D.V.1. Construcción de plásmidos para el silenciamiento génico mediante RNAi de PDF-1 y PDF-2.....	114
D.V.2. Transfección de <i>T. brucei</i>	115
D.V.4. Estudio del efecto del RNAi de PDF1 y PDF2 sobre la proliferación celular...	115

D.V.4.1. La depleción de PDF-1 y PDF-2 genera alteraciones de la proliferación de las formas procíclicas de <i>T. brucei</i>	116
D.V.5. Consecuencias de la depleción de TbPDF-1 y TbPDF-2 sobre la función mitocondrial.....	117
D.V.6. Una reducción de los niveles de PDF-1 y PDF-2 producen alteraciones en la ultraestructura celular en la forma procíclica de <i>T. brucei</i>	120
D.VI. EFECTO DEL SILENCIAMIENTO DE PDF-1 Y PDF-2 SOBRE EL METABOLISMO LIPÍDICO.....	122
D.VI.1. Cuantificación del contenido de ácidos grasos totales en parásitos donde se han deplecionado los niveles de PDF-1 y PDF-2.....	125
D.VI.2. La inhibición de la expresión de TbPDF1 produce alteraciones en la composición de esteroides.....	126
D.VII. EFECTO DE LA DEPLECIÓN DE LA ACTIVIDAD PDF-1 SOBRE LA SENSIBILIDAD A OLIGOMICINA.....	135
D.VIII. ANÁLISIS DE LOS REQUERIMIENTOS DE ACTIVIDAD TRANSFORMILASA EN <i>Trypanosoma brucei</i>	138
D.VIII.1. Construcción de plásmidos para el silenciamiento génico mediante RNAi de la MTF de <i>Trypanosoma brucei</i>	139
D.VIII.1.2. Estudio del efecto del RNAi de la MTF y del doble RNAi de la PDF-1 y MTF sobre la proliferación celular.....	140
D.VIII.1.3. Silenciamiento del gen de la MTF.....	140
D.VIII.1.4. Efecto del doble silenciamiento mediante RNAi de los genes de la PDF-1 y MTF de <i>T. brucei</i>	141
D.IX. PAPEL BIOLÓGICO DE LA PÉPTIDO DEFORMILASA EN LAS FORMAS SANGUÍNEAS.....	142
D.X. ESTUDIOS DE DOBLE REEMPLAZO ALÉLICO DE PDF-1 EN LA FORMA SANGUÍNEA DE <i>Trypanosoma brucei</i>	143
D.XI. CÉLULAS DEFICIENTES EN PDF-1 PRESENTAN ALTERACIONES EN EL POTENCIAL DE MEMBRANA MITOCONDRIAL Y SON HIPERSENSIBLES A OLIGOMICINA.....	150
D.XII. EFECTO DE LA ACTINONINA EN LA FORMA PROCÍCLICA Y SANGUÍNEA DE <i>Trypanosoma brucei</i>	154
E. DISCUSIÓN.....	155

E.I. ANÁLISIS COMPARATIVO DE LAS SECUENCIA DE PROTEÍNAS DE LAS PDFS DE TRIPANOSOMÁTIDOS.....	159
E.II. ANÁLISIS COMPARATIVOS DE SECUENCIAS DE PDFs EUCARIOTAS Y PROCARIOTAS.....	161
E.III. EXPRESIÓN, PURIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LA PROTEÍNA RECOMBINANTE DE <i>Trypanosoma cruzi</i>	167
E.III.1. Caracterización cinética de la PDF-1 de <i>Trypanosoma cruzi</i>	170
E.III.2. La PDF-1 de <i>Trypanosoma cruzi</i> es activa frente a un péptido formilado: el formil-metionil-alanil-serina (f-MAS) como sustrato.....	170
E.III.3. Requerimiento de iones divalentes.....	172
E.III.4. Sensibilidad a inhibidores de metaloproteasas.....	174
E.IV. LOCALIZACIÓN INTRACELULAR.....	176
E.V. PDF-1 Y PDF-2 SON NECESARIAS PARA LA PROLIFERACIÓN CELULAR EN LA FORMA PROCÍCLICA DE <i>Trypanosoma brucei</i>	177
E.V.1. La interferencia de la expresión de PDF-1 y PDF-2 produce alteraciones en el potencial de membrana mitocondrial en la forma procíclica de <i>Trypanosoma brucei</i> ..	179
E.VI. EFECTOS DE LA INTERFERENCIA GENÉTICA DE PDF-1 Y PDF-2 SOBRE LA MORFOLOGÍA MITOCONDRIAL Y EL METABOLISMO LIPÍDICO EN LA FORMA PROCÍCLICA DE <i>Trypanosoma brucei</i>	185
E.VII. EFECTO DE LA DEPLECIÓN DE PDF-1 Y PDF-2 EN LA FORMA SANGUÍNEA DE <i>Trypanosoma brucei</i>	190
E.VII.1. Papel hipotético adicional de las PDFs de tripanosomátidos y de eucariotas en general.....	193
F. CONCLUSIONES.....	197
G. BIBLIOGRAFÍA.....	201

ABREVIATURAS

ABREVIATURAS

- Aars.** Aminoacil-RNAt sintetasa.
- A.** Absorbancia.
- Ae.** Actividad específica.
- Amp.** Ampicilina.
- AMP.** Adenosina monofosfato.
- ATP.** Adenosina trifosfato.
- ATPasa.** Adenosina trifosfatasa
- BLA.** Blastidina.
- BLE.** Bleomicina.
- BSA.** Albúmina sérica bovina.
- °C** Grados centígrados.
- cDNA.** DNA complementario.
- Cis.** Cisteína
- cm.** Centímetro.
- col.** Colaboradores.
- COI.** Citocromo c oxidasa
- c.p.m.** Cuentas por minuto.
- CR.** Regiones ricas
- CYb.** Complejo citocromo b
- Da.** Dalton.
- DAPI.** diclorhidrato de 4',6-diamidino-2-fenilindol.
- DIC.** Contraste interdiferencial.
- DNA.** Ácido desoxirribonucleico.
- D.O.** Densidad óptica.
- DOX.** Doxiciolina.
- EDTA.** Ácido etilén diamino tetraacético.
- FADH.** flavín adenín dinucleótido reducido.
- FITC.** Fluoresceína.
- FLPC.** Cromatografía Líquida rápida de Proteínas.

f-MAS. Formil-metionil-alanil-serina.
f-Met. Formil-metionina
Gli. Glicina.
Glu. Glutamato
GPI. Glicosilfosfatidil inositol.
GTP. Guanosin trifosfato
h. Hora.
His. Histidina
HPLC. Cromatografía líquida de alto rendimiento
HYG. Higromicina.
IC₅₀. Dosis inhibitoria de crecimiento 50.
IF2. Factor de iniciación 2
IgG. Inmunoglobulina G
IPTG. Isopropil-β-D-tiogalactopiranosido.
kb. Kilobase.
k_{cat}. Constante catalítica.
kDa. Kilodalton.
K_i. Constante de inhibición.
K_m. Constante de Michaelis.
LB. Luria bertonii
M. Molar.
MAP. Metionina aminopeptidasa.
MEM. Medio mínimo esencial
MIC. Concentración mínima inhibitoria.
min. Minuto.
mg. Miligramo.
mL. Mililitro.
mM. Milimolar.
MOPS. Ácido 3-[N-morfolino]-propano sulfónico.
MTF. Metionina transformilasa
NADPH. Nicotiamida adenina dinucleótido fosfato.
NADH. Nicotiamida adenina dinucleótido reducido
ng. Nanogramo.

- nM.** Nanomolar.
- NME.** Escisión de metionina N-terminal.
- OMS.** Organización mundial de la salud.
- PAC.** Puromicina N-acetil transferasa.
- PARP.** Proteína acidica repetitiva de prociclica.
- pb.** Pares de bases.
- PBS.** Tampón fosfato salino.
- PCR.** Reacción en cadena de la DNA polimerasa.
- PDF.** Péptido deformilasa.
- pI.** Punto Isoeléctrico.
- PPi.** Pirofosfato.
- RNA.** Ácido ribonucleico.
- RNAi.** RNA de interferencia.
- mRNA.** Ácido ribonucleico mensajero.
- tRNA** Acido ribonucleico de transferencia
- gRNA.** Acido ribonucleico guía.
- rRNA** Acido ribonucleico ribosomal
- tRNA^{Met-i}** Acido ribonucleico de transferencia de metioninina de iniciación.
- tRNA^{Met-e}** Acido ribonucleico de transferencia de metioninina de elongación.
- RP.** Proteína ribosoma
- s.** Segundo
- SBF.** Suero bovino fetal.
- SDS.** Dodecil sulfato sódico.
- SDS-PAGE.** Electroforesis desnaturalizante en gel de poliacrilamida.
- TAO.** Oxidasa terminal alternativa.
- TEMED.** N,N,N',N'- Tetrametil-etilenodiamino.
- TLC.** Cromatografía en capa fina.
- Tet.** Tetraciclina.
- μL.** Microlitro.
- μM.** Micromolar.
- UTR.** Regiones sin traducir.
- V.** Voltio.
- V_{max}.** Velocidad máxima.

VSG. Glicoproteína variante de superficie.

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

Introducción

A. INTRODUCCIÓN

A.I. INTRODUCCIÓN

A.I.1. Enfermedades olvidadas

Las enfermedades olvidadas constituyen en términos generales un grupo de condiciones patológicas crónicas, incapacitantes y desfigurantes que afectan a millares de personas en todo el mundo, que no disponen de tratamientos eficaces y adecuados y que se presentan mayoritariamente en escenarios de extrema pobreza, especialmente en poblaciones rurales. En su mayoría se trata de enfermedades tropicales infecciosas que afectan fundamentalmente a la población más pobre, como la malaria, la enfermedad de Chagas, la leishmaniasis y la enfermedad del sueño, entre otras, que globalmente generan un impacto devastador en la humanidad.

Protozoarios parásitos de la familia *Trypanosomatidae* figuran entre algunos de los agentes causantes de estas enfermedades y a pesar de que la biología básica de estos organismos ha sido objeto de estudio intenso, este conocimiento no ha repercutido en el desarrollo de herramientas terapéuticas efectivas para la población afectada. Estas enfermedades han sido sistemáticamente relegadas por los responsables de los programas de investigación, tanto del sector público como del sector privado ya que los afectados no representan un entorno lo suficientemente lucrativo que justifique una inversión de la industria farmacéutica en investigación y desarrollo de nuevos medicamentos para estas enfermedades (www.dndi.org).

A.II. ASPECTOS RELEVANTES DE LA FAMILIA *Trypanosomatidae*

A.II.1. Taxonomía y ciclo de vida

La familia *Trypanosomatidae* pertenece a un grupo biológico peculiar del super reino Eukaryota, clase Zoomastigofora, orden Kinetoplástida, género *Trypanosoma*, subgénero Trypanozoon. Entre los kinetoplástidos se reconocen varios géneros que incluyen tripanosomas de vida libre (*Leptomonas*), parásitos exclusivamente de invertebrados (*Critidia spp* y *Leptomonas spp*, entre otros), parásitos de plantas e invertebrados (*Phytomonas spp*) y parásitos de vertebrados e invertebrados (como

Trypanosoma spp y *Leishmania spp*). Estos últimos incluyen a las especies parásitas del hombre.

El género *Trypanosoma* se caracteriza por utilizar dos huéspedes, uno vertebrado y otro invertebrado, para completar su ciclo de vida. En términos generales presentan similitud entre las especies, son flagelados unicelulares que son transmitidos por insectos vectores, comparten fases de multiplicación local en su hospedador humano lo que va seguido de la diseminación y localización en órganos específicos donde pueden causar daños potencialmente letales. Sin embargo, existen diferencias entre ellos en cuanto a las manifestaciones clínicas de las enfermedades que producen y la susceptibilidad a los tratamientos.

A.II.2. Epidemiología y transmisión

Existen dos grandes grupos dentro del género *Trypanosoma* dependiendo de su distribución geográfica y patogenicidad. Ambos son transmitidos a través de insectos. El tripanosoma africano autóctono de ese continente causa una enfermedad conocida como enfermedad del sueño, es transmitido a través de la saliva de la mosca tsetse, y vive y se replica en el torrente sanguíneo de su huésped vertebrado. La otra variedad confinada al hemisferio oeste causa la tripanosomiasis americana o enfermedad de Chagas, es transmitida a través de las heces de insectos que pertenecen a la subfamilia *Triatominae* de la familia *Reduviidae* (Orden Hemiptera) y es un parásito intracelular del hospedador vertebrado.

A.II.3. *Trypanosoma brucei*

Comprende 3 subespecies morfológicamente idénticas pero que difieren en su capacidad de infectar distintos huéspedes. Dos de ellas causan tripanosomiasis africana. En el oeste y centro de África, *T. brucei gambiense* causa una forma crónica de la enfermedad del sueño que representa el 90% de los casos totales y con un tiempo variable en cuanto a la aparición de las manifestaciones clínicas de la enfermedad que a menudo, cuando son detectadas, el paciente ya tiene afectado significativamente el sistema nervioso central.

En el este y sur de África, *T. brucei rhodesiense* causa una forma aguda que representa un 10% de los casos donde en semanas o meses después es posible detectar los primeros síntomas que indican que está afectado el sistema nervioso central. La infección con cualquiera de las especies es fatal si no es tratada. *T. brucei brucei* no

infecta al ser humano pero causa la enfermedad en muchas especies de animales salvajes y domésticos, en algunos casos con importantes repercusiones económicas negativas ya que es capaz de infectar al ganado produciendo una enfermedad conocida como nagana.

T. brucei es transmitido por la mosca tsetse del género *Glossina* (orden Díptera) la cual se encuentra exclusivamente en África en una zona que se extiende desde el sur del Sáhara hasta el norte del desierto de Kalahari (entre 14° norte y 29 ° sur del ecuador). Como resultado de ello, la incidencia de la tripanosomiasis africana humana tiene una distribución espacial discreta. Se reconocen casi 300 focos activos separados y algo más de 60 millones de personas están en riesgo de contraer la enfermedad en 36 de los 52 países de África. Muchos focos son áreas rurales por lo que estas cifras pueden estar sustancialmente infravaloradas (figura A.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 allí la vigilancia disminuyó por lo que los casos de contagio aumentaron hasta llegar a unos 40.000 por año a finales del siglo 20 aunque estos datos no reflejaban la realidad y se estimó que existían entre 300.000 y 500.000 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 50.000 y 70.000 casos por año. Menos del 10 % de la población está protegida y la OMS estima que cerca de medio millón de personas son portadoras de esta enfermedad potencialmente fatal.

A.II.4. *Trypanosoma cruzi*

En 1985 la organización mundial de la salud estimó que cerca de 100 millones de personas en América Latina estaban en riesgo de adquirir la enfermedad de Chagas con una prevalencia de infección de *T. cruzi* estimada en 18 millones de casos. Dado que el 15-30 % de la población infectada desarrolla los síntomas de la enfermedad, cerca de 5 millones de personas pueden manifestar los síntomas clínicos atribuibles a la enfermedad de Chagas. Los programas de control del vector han conseguido reducir la transmisión en años recientes (figura A.1.).



Figura A.1. Distribución geográfica de *Trypanosoma cruzi* y *Trypanosoma brucei*.

A.III. INICIO Y PROGRESIÓN DE LA ENFERMEDAD

La tripanosomiasis humana africana y la enfermedad de Chagas son enfermedades crónicas, potencialmente fatales que experimentan diferentes estadios en su curso natural. Después de la infección no existe inmunidad adquirida y no hay vacunas. A diferencia de *Trypanosoma cruzi* y muchos otros protozoarios que adoptan una existencia intracelular que les protege de la inmunidad humoral del huésped, *Trypanosoma brucei* es estrictamente extracelular, está expuesto totalmente a la respuesta inmune del hospedador, aunque al igual que *T. cruzi* pueden evadirla para establecer la infección. Una densa cubierta de glicoproteínas altamente inmunogénica protege contra la lisis mediada por el complemento. Una vez que la maduración específica del anticuerpo ha tenido lugar, las inmunoglobulinas reconocen y lisan a la población de parásitos que transportan la misma proteína de superficie. Sin embargo, un pequeño porcentaje de cada nueva generación cambia a una nueva glicoproteína antigénicamente diferente permitiendo la supervivencia.

La activación policlonal de células B y la elevación en la producción de IgM son características de la tripanosomiasis humana. Estas reacciones pueden estar

asociadas con respuestas a estas glicoproteínas de superficie variantes y podrían estar involucradas en la inmunosupresión general asociada a la enfermedad.

En el caso de *Trypanosoma cruzi* tras la entrada al huésped mamífero, invade la célula hospedadora donde los macrófagos tienen un importante papel en la respuesta temprana a la infección y en el transporte de parásitos a otros sitios del cuerpo donde se transforman de tripomastigotes a amastigotes replicativos dentro de las células antes de diferenciarse a tripomastigotes sanguíneos que abandonan la célula para subsecuentemente invadir otro tipo celular.

La superficie del parásito está cubierta con glicoproteínas de tipo mucina las cuales poseen una porción N-terminal expuesta que está unida a la membrana por glicosilfosfatidil inositol (GPI) y tienen un papel importante en la protección de la superficie del parásito y la adhesión celular así como también en la activación de macrófagos del hospedador.

Aunque el tripanosoma africano ha recibido más atención con respecto a la variación antigénica, las mucinas de *T. cruzi* tienen un papel similar en la diversificación de la respuesta inmune del huésped. *T. cruzi* es un potente estimulador de la inmunidad celular y la inducción de citoquinas proinflamatorias de macrófagos es importante en el control de la infección y una consecuencia de la enfermedad de Chagas. Las proteínas de superficie variables del tripanosoma africano parecen tener un papel similar.

Figura A.2.1 Ciclo de vida de *T. brucei* (derecha). La tripanosomiasis africana es causada por la infección con las subespecies *T.b. rhodesiense* o *T.b. gambiense*. Cerca de 20 especies o subespecies de moscas transmiten este parásito (pero solo 1 de cada 1000 tiene las condiciones de madurez en su glándula salival para transmitir el parásito). Los tripanosomas entran en la mosca cuando ésta se alimenta durante la picadura de un humano o animal infectado. Después de un período de cuatro semanas, experimenta cambios morfológicos y fisiológicos en el tracto digestivo y en las glándulas salivares, donde se hacen infectivos. La mosca infectada ingiere parásitos a través de la piel y estos viajan a través del sistema linfático hasta el torrente sanguíneo, donde se distribuyen a través del cuerpo. El parásito continúa replicándose por fisión binaria. En el estadio final de la enfermedad los parásitos invaden el sistema nervioso central y residen en el fluido cerebroespinal y espacios intercelulares. (Stuart et al. 2008)

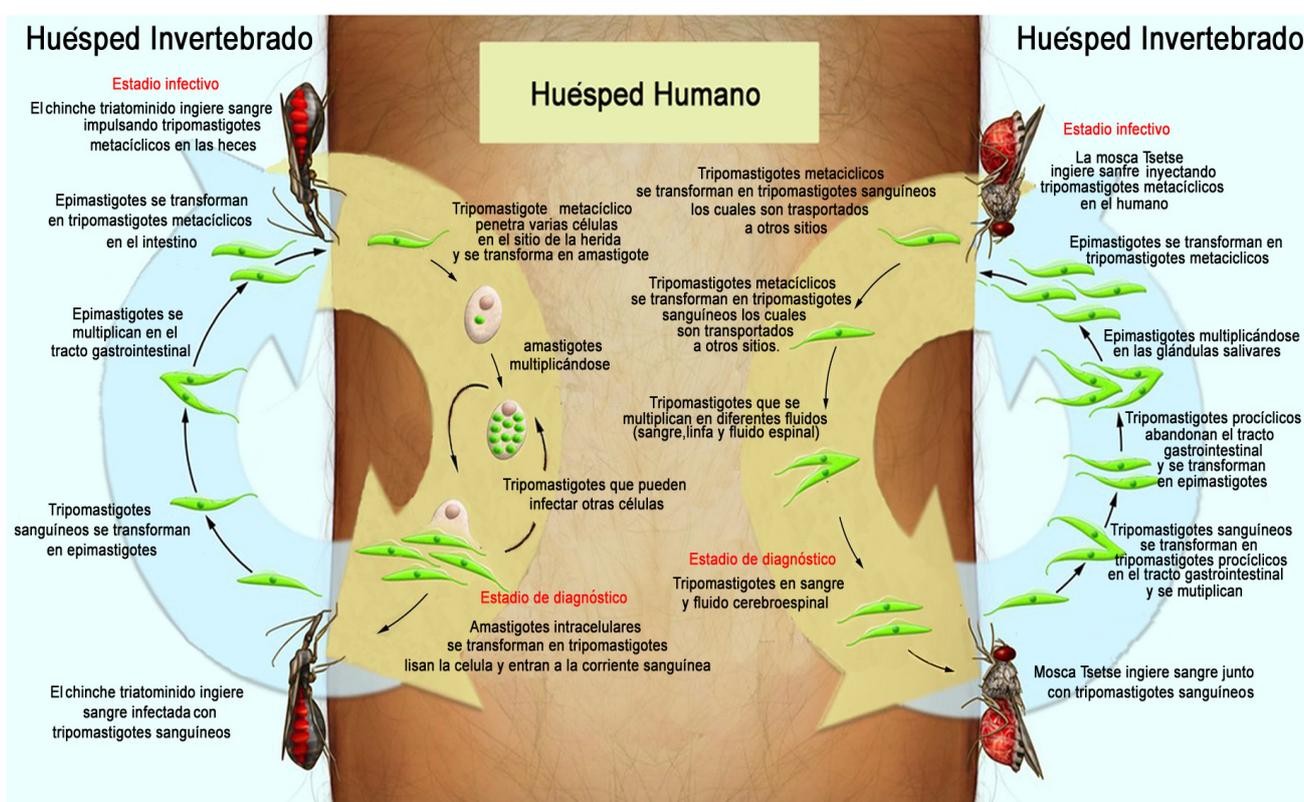


Figura A.2.2. Ciclo de vida de *T. cruzi* (izquierda). La infección con *T. cruzi* causa la enfermedad de Chagas. El parásito es transmitido a humanos por insectos de la familia *Triatominae* que se alimentan succionando sangre a medida que depositan sus heces con tripomastigotes infectivos. Estos penetran e invaden células cercanas dentro de las cuales se diferencian a amastigotes que se multiplican por fisión binaria los cuales se transforman a tripomastigotes y son liberados al torrente sanguíneo, infectando múltiples órganos y tejidos incluyendo musculatura lisa, corazón y sistema nervioso central, entre otros, donde una vez más se convierten en amastigotes. El insecto se infecta cuando ingiere sangre con tripomastigotes sanguíneos de un humano o animal infectado. En el insecto, el tripomastigote experimenta transformaciones morfológicas y fisiológicas en el tracto gastrointestinal y se diferencia a tripomastigote en el intestino (Stuart et al. 2008).

A.III.1. Tripanosomiasis africana

La enfermedad comprende 2 etapas que vienen determinadas por la progresión del parásito dentro del huésped.

Fase 1. Después de la inoculación en el sitio de infección los parásitos proliferan dando lugar a un nódulo inflamatorio o úlcera. A continuación, se extienden al nódulo linfático y alcanzan el torrente sanguíneo iniciando el estadio hemolinfático de la enfermedad el cual está asociado a dolores en las articulaciones, fiebre, dolor de cabeza, adenopatía y prurito. La rápida proliferación del parásito es contrarrestada por la respuesta inmune, pero la variación antigénica permite la evasión, dando lugar a ondas de parasitemia.

En esta fase los parásitos pueden ser detectados en la sangre, linfa o aspirados de tejidos, sin embargo, a menudo están por debajo de los niveles de detección. La infección con la especie *T. brucei rhodesiense* tiene frecuentemente un curso más agudo y puede causar fallo cardíacos, enema pulmonar o efusión pericardial que pueden ser fatales.

Fase 2. En esta etapa los parásitos invaden órganos internos entre ellos el sistema nervioso central lo que puede ocurrir en pocas semanas después de la infección con *T. brucei rhodesiense* aunque en el caso de *T. brucei gambiense* puede llevar entre varios meses o años. Se caracteriza por síntomas neurológicos severos entre ellos la alteración del ciclo de sueño, manifestación que da nombre a la enfermedad, además de alteraciones sensoriales y mentales con pérdida de peso, anormalidades endocrinas que progresivamente culminan en coma y en muerte en el caso de que a la persona infectada no se le administre un tratamiento efectivo.

A.III.2. Enfermedad de Chagas

T. cruzi es usualmente transmitido por vectores triatomíneos infectados con tripomastigotes metacíclicos. Las heces depositados por el insecto durante la ingesta causan estímulos que conducen al individuo a infligirse microabrasiones que permiten al tripomastigote atravesar la piel e invadir la célula huésped.

Fase aguda. Las manifestaciones clínicas de esta etapa comienzan 6-10 días después de la infección y pueden durar hasta 12 meses. Frecuentemente la inflamación en el sitio de infección conduce a una lesión cutánea característica que permite el diagnóstico sintomático rápido. Muchos casos agudos aparecen antes de los 15 años de

edad, principalmente entre 1 y 5 años. Usualmente la fase aguda no es detectada por presentar a menudo síntomas que son típicos de malestares comunes que se asocian a otras infecciones, aunque el diagnóstico es posible ya que los parásitos pueden ser fácilmente detectados en sangre periférica. Sin embargo, la muerte puede surgir debido a miocarditis, meningoencefalitis, hepatoesplenomegalia o linfadenopatía. Esta fase de la enfermedad finaliza cuando el balance inmunológico entre el hospedador y el parásito reduce el número de tripomastigotes circulantes, haciendo imposible la diagnosis directa.

Fase crónica: después de la fase aguda el paciente se hace asintomático. Cerca del 70-85 % de las personas infectadas continúa en este estado conocido como la forma indeterminada de la enfermedad crónica para el resto de su vida. Otro 15-30 % de los infectados desarrollarán manifestaciones clínicas que incluyen afecciones nerviosas, cardíacas y digestivas. Estas aparecen entre 10 y 25 años después de la infección inicial siendo típico en hombres de 20 a 45 años de edad.

A.IV. QUIMIOTERAPIA CONTRA LA TRIPANOSOMIASIS

En el caso de la tripanosomiasis humana africana, la quimioterapia utilizada depende de la fase de la enfermedad en la que se encuentre el paciente, por lo que el diagnóstico temprano facilita la administración del tratamiento inicial que suele ser menos tóxico y más efectivo. Una proporción sustancial de pacientes (2-12%) muere como resultado del tratamiento. En la actualidad se emplean mayoritariamente cuatro fármacos para el tratamiento de esta enfermedad. La pentamidina y la suramina se utilizan en la fase 1 previa a la fase que afecta el sistema nervioso central. Contra la fase tardía el tratamiento de primera línea es el melarsoprol. La eflornitina es útil solo contra *T. brucei gambiense* y aunque tiene pocos efectos secundarios, se requieren grandes dosis lo cual limita su uso. El nifurtimox, aunque solo está autorizado para su uso contra la enfermedad de Chagas, ha demostrado una eficacia limitada contra la tripanosomiasis africana. Ocasionalmente suele usarse un fármaco de uso veterinario conocida como berenil (Diminazene) (Figura A.3.).

Además de la correcta elección y aplicación de fármacos, el manejo efectivo de pacientes con tripanosomiasis africana humana requiere atención cualificada por parte de médicos familiarizados con las complicaciones de la enfermedad y su tratamiento.

En el caso de la enfermedad de Chagas la terapia se basa en la utilización de los compuestos heterocíclicos nifurtimox y benznidazol. El nifurtimox es un nitrofurano

introducido en la década de 1960 para el tratamiento de Chagas agudo. El fármaco produce un efecto tripanocida principalmente sobre tripomastigotes circulantes y es bien tolerada por pacientes jóvenes. Ambos fármacos inducen ocasionalmente serios efectos secundarios y ninguno es eficaz contra la forma crónica de la enfermedad.

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

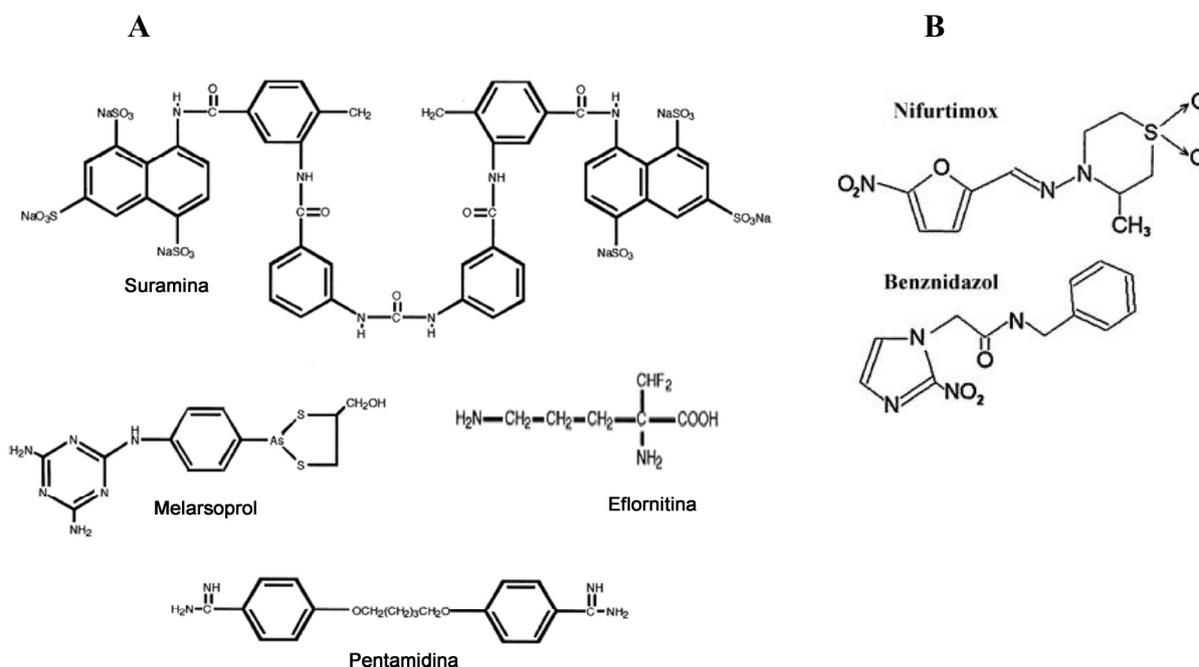


Figura A.3. Estructura química de los fármacos disponibles en la actualidad para el tratamiento de A) enfermedad del sueño y B) enfermedad de Chagas.

A.V. ASPECTOS RELEVANTES DE LA BIOQUÍMICA DE *Trypanosoma brucei*

A.V.1. Características del metabolismo mitocondrial

Parásitos de la familia *Trypanosomatidae* no son solo de interés científico debido a su importancia clínica sino que también sus características biológicas inusuales los convierten en un modelo interesante de estudio de procesos como la biogénesis organelar y la organización estructural y funcional de la mitocondria. En esta familia de protozoarios existe una única mitocondria por célula que presenta una forma alargada ocupando todo el eje longitudinal del parásito. A su vez, toda la información genómica está contenida en una estructura especial conocida como kinetoplasto y que presenta una de las organizaciones topológicas más complejas para cualquier DNA encontrado en la naturaleza (figura A.4.).

El kinetoplasto comprende una red gigante compuesta por dos tipos de DNA circulares entrelazados con una topología característica e inusual conocidos como maxicírculos y minicírculos (Feagin 2000; Liu et al. 2005; Sela et al. 2008). En diversas especies de la familia *Trypanosomatidae* los maxicírculos codifican la mayor parte de la información mitocondrial, funcionan de manera análoga al DNA organelar de otros organismos y comprenden cerca de un 10% del genoma mitocondrial en tripanosomátidos (Shapiro and Englund 1995). Aproximadamente 50 copias de cada una de estas estructuras están presentes en cada orgánulo.

El kinetoplasto codifica 13 proteínas de identidad conocida (<http://dna.kdna.ucla.edu/simpsonlab/>; Estevez and Simpson 1999) entre las cuales figuran el citocromo b del complejo bc1(CYb), las subunidades I-III de la citocromo c oxidasa (COI-III), la subunidad 6 de la adenosina-trifosfatasa (ATPasa; A6), seis subunidades del complejo de la NADH deshidrogenasa (ND1,4,5,7,9), una proteína ribosomal (S12) y dos genes ribosomales (Figura A.5. y E.I.5.). Además están presentes 5 marcos de lectura abiertos de función desconocida pero que parecen codificar componentes adicionales de la NADH dehidrogenasa (figura A.5.).

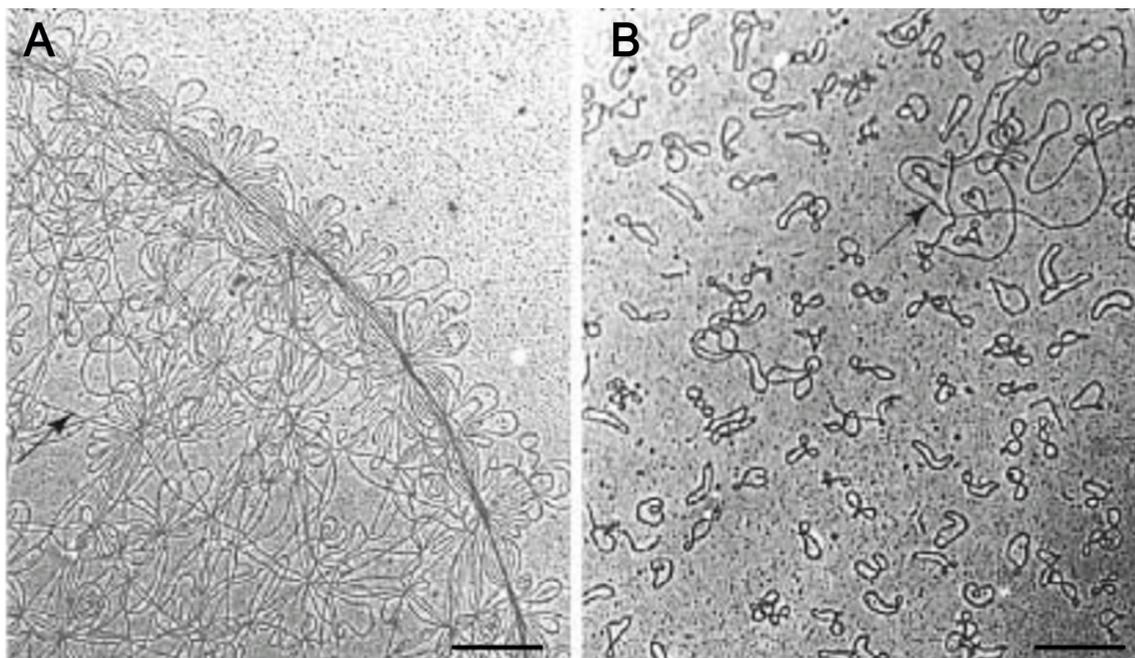


Figura A.4. Microscopía electrónica del kinetoplasto de *C. fasciculata* como ejemplo representativo de la estructura genómica organelar de tripanosomátidos. A) Segmento de la red intacta. B) Kinetoplasto descatenado por la topoisomerasa II, donde se observan minicírculos individuales y un maxicírculo. Escala 0.3 μ M (Shapiro et al. 1999) (Giglione et al. 2000; Liu et al.

La estructura de los genes presentes en los maxicírculos es inusual, y se denominan criptogenes, ya que la mayoría de los transcritos codificados deben ser procesados intensamente para generar RNAs funcionales. Este proceso es mediado por los RNAs codificados por los minicírculos y contienen la información necesaria para convertir los pre-RNA codificados por los maxicírculos en sustratos funcionales mediante un proceso que se conoce globalmente como edición de RNA (Stuart et al. 2005). Los minicírculos de tamaño más pequeño (0.65-2.5Kb) están presentes en 5000-10000 copias y conforman cerca del 90 % de la masa total de DNA formando una red entrelazada. Su única función conocida es codificar los RNAs aunque algunos estudios sugieren que pueden codificar RNAs y proteínas en varios tripanosomátidos (Fouts and Wolstenholme 1979; Rohrer et al. 1987; Shlomai and Zadok 1984; Singh and Rastogi 1999).

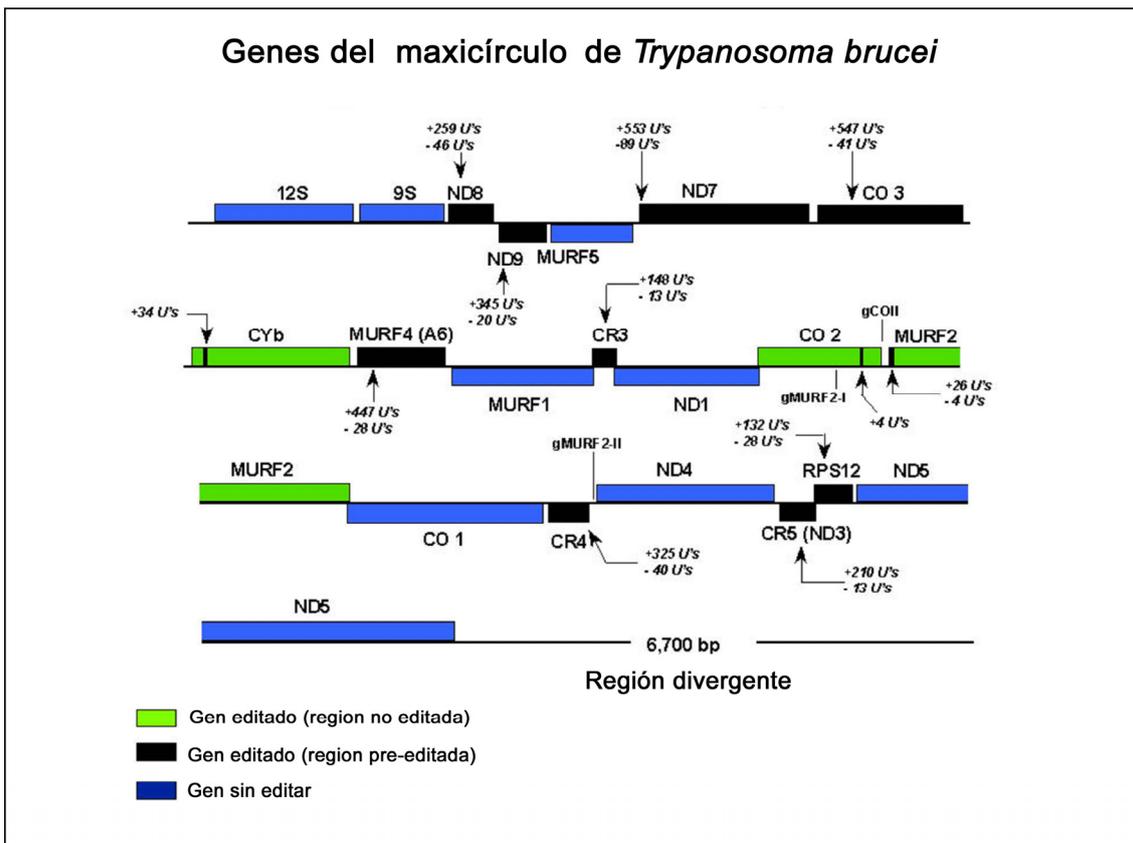


Figura A.5. Mapa genético parcial del genoma mitocondrial de *Trypanosoma brucei*. El maxicírculo se presenta de manera lineal. Genes presentados sobre la línea están en sentido 5' a 3' de izquierda a derecha y genes por debajo de la línea están en sentido 5' a 3' de derecha a izquierda. El número de uridilatos (U') añadidos y delecionados están indicados en cada región editada y el número de sitios son señalados en paréntesis. La función de la región divergente, la cual consiste en repeticiones ricas en AT en tandem de diferentes complejidades, es desconocida. 12S y 9S son los rRNA mitocondriales. CO = citocromo oxidasa, MURF = marco de lectura del maxicírculo sin identificar, ND = NADH dehidrogenasa, CYb = citocromo b, A6 = ATPasa subunidad 6, RPS12 = proteína ribosomal S12, CR1-CR5 = regiones ricas en C 1-5. <http://dna.kdna.ucla.edu>

A.V.2. Metabolismo energético

Durante las diferentes etapas del ciclo de vida los distintos miembros de la familia *Trypanosomatidae* alternan entre un huésped vertebrado y un insecto vector. Como resultado de ello, el parásito se encuentra con ambientes que difieren significativamente en cuanto a la cantidad y tipo de nutrientes disponibles así como también en la disponibilidad de oxígeno. Los cambios morfológicos que ocurren están asociados, entre otros factores, a las adaptaciones de su metabolismo energético. Todos los tripanosomátidos usan carbohidratos como sustrato para el metabolismo energético y su degradación ocurre mediante glicólisis pero la organización de esta vía es exclusiva ya que en todos los miembros de esta familia las primeras reacciones de la vía clásica Embden-Meyerhof ocurren dentro de unos orgánulos conocidos como glicosomas y que derivan evolutivamente de los peroxisomas (Figura A.6.) (Opperdoes 1987; Parsons et al. 2001). El contenido exacto de glicosomas varía entre los distintos estadios del ciclo de vida de una especie. En el caso de la forma sanguínea el 90% del contenido proteico de los orgánulos consiste en enzimas glicolíticas (Aman et al. 1985).

La mitocondria de tripanosomátidos es particular no solo a causa de su estructura, replicación y organización genómica sino también por su metabolismo energético. En general, la mitocondria de mamíferos degrada piruvato a dióxido de carbono y, por lo tanto, produce equivalentes reductores (NADH y FADH₂), los cuales son oxidados por la cadena respiratoria y el oxígeno funciona como aceptor electrónico terminal. La mitocondria de tripanosomátidos funcionan también aeróbicamente con oxígeno como aceptor final, pero en todos los casos estudiados, el piruvato no es oxidado completamente a dióxido de carbono. Por lo tanto, el metabolismo mitocondrial de tripanosomátidos puede ser considerado como intermedio entre el de mamíferos y el de muchos parásitos helmínticos y diversos organismos marinos (Tielens et al. 2002; Tielens and Van Hellemond 1998). El metabolismo glicosomal y mitocondrial ha sido estudiado con más detalle en especies de *T. brucei*, pero se pueden hacer algunas generalizaciones con respecto a otras especies de tripanosomátidos.

A.V.3. Forma sanguínea

En esta etapa del ciclo de vida de *T. brucei*, la mitocondria se caracteriza por presentar una morfología simple, sin crestas y muchas de las funciones mitocondriales como el ciclo de Krebs y la cadena respiratoria clásica están reprimidas. Sin embargo, contienen una oxidasa alternativa (TAO) a través de la cual los electrones de los sustratos oxidados son transferidos al oxígeno (Chaudhuri et al. 1998) y que parece ser esencial para la proliferación celular (Helfert et al. 2001).

La fuente exclusiva de ATP es la glucólisis (Figura A.6.). La glucosa es convertida completamente a piruvato como el único producto final y no se produce ATP por fosforilación oxidativa. Las siete primeras enzimas de la glucólisis que convierten glucosa a 3-fosfoglicerato están compartimentalizadas y la reacción final que cataliza la conversión a piruvato tiene lugar en el citoplasma (Visser et al. 1981).

Para mantener el balance redox glicosomal bajo condiciones aeróbicas, el NADH generado por la glicerol-3-fosfato deshidrogenasa es reoxidado por una lanzadera mitocondrial (glicerol-3-fosfato) la cual está acoplada a la TAO (Opperdoes et al. 1977; Clarkson et al. 1989)(figura A.6.). Los equivalentes reductores producidos en el glicosoma son transferidos a la mitocondria a través de una lanzadera clásica glicerol-3-fosfato/dihidroxi-acetona fosfato. La glicerol-3-fosfato deshidrogenasa dona electrones al pool ubiquinona/ubiquinol, y el ubiquinol reducido es entonces el donador de electrones para la TAO (Chaudhuri et al. 1998) (figura A.6.).

Sin embargo, la mitocondria contiene una ATPasa sensible a oligomicina (FoF1-H⁺ATPasa) (Williams and Frank 1990) aunque su nivel de expresión es mucho mas bajo que en la forma procíclica (Williams 1994). La función celular de este complejo sugiere que está involucrada en la generación de una fuerza protón-motora a expensas del ATP producido en la glicólisis (Nolan and Voorheis 1992; Nolan and Voorheis 2000).

Este complejo funciona en sentido inverso a su papel clásico, hidrolizando el ATP producido por la glucólisis, bombeando protones desde la matriz al espacio de la membrana interna, generando un gradiente electroquímico el cual es esencial para el importe de iones y metabolitos a la mitocondria (Brown et al. 2006; Nolan and Voorheis 1992; Schnauffer et al. 2005).

Esta función reversa del complejo de la FoF1-H⁺ATPasa es indispensable para la forma sanguínea de *Trypanosoma brucei* y es de esperar que un inhibidor que

específicamente inhiba la actividad ATP hidrolasa de este complejo, pero no la actividad ATP sintetasa convencional del hospedador tenga actividad como agentes tripanocidas (Zikova et al. 2009).

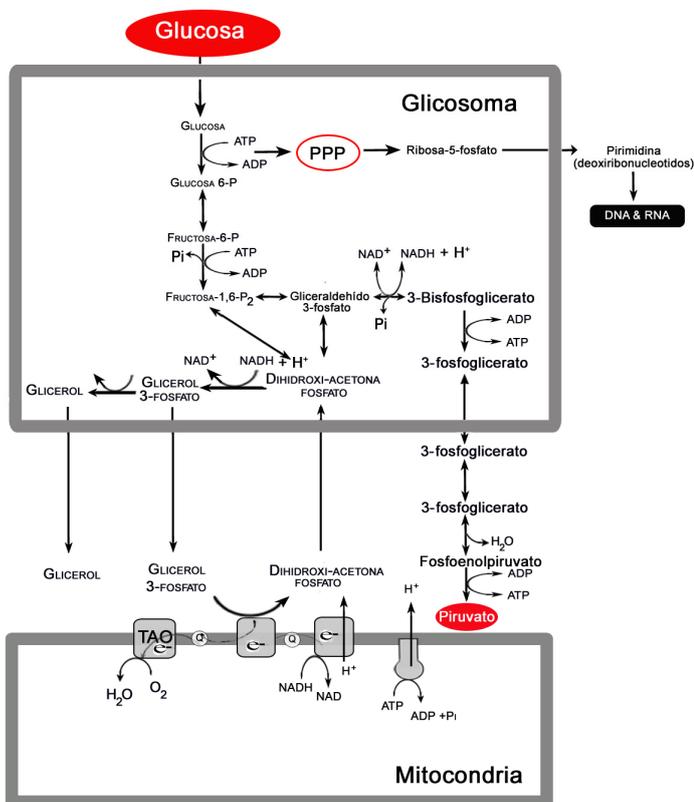


Figura A.6. Representación esquemática de las rutas involucradas en el metabolismo de carbohidratos y aminoácidos en la forma sanguínea de *Trypanosoma brucei*.

A.V.4. Forma procíclica

La transformación de la forma sanguínea a la forma procíclica está acompañada de cambios drásticos en el metabolismo energético (Durieux et al. 1991). Esta etapa del ciclo de vida presenta una mitocondria con una estructura más desarrollada y mucho más activa metabólicamente y que bajo ciertas condiciones contribuye de manera importante a la generación de ATP (Bienen et al. 1991). Del mismo modo, las formas procíclicas presentan la maquinaria enzimática completa para el metabolismo oxidativo, incluyendo una cadena respiratoria que contienen citocromos y que puede generar un gradiente de protones y dos oxidasas terminales (una citocromo oxidasa sensible a cianuro y TAO).

En esta forma del ciclo de vida los niveles de glucosa parecen determinar el flujo metabólico. En presencia de glucosa las células no dependen de la fosforilación oxidativa para la síntesis de ATP, siendo la fosforilación a nivel de sustrato la principal fuente. Sin embargo, en ausencia de glucosa las células desplazan su metabolismo al catabolismo de aminoácidos y la fosforilación oxidativa es esencial bajo estas condiciones (Besteiro et al. 2005).

En líneas generales, el ciclo de Krebs no funciona del modo usual como un ciclo completo (Hellemond et al. 2005) sino que tiene: 1) una parte catabólica donde el producto final de la glicólisis, el piruvato, puede ser metabolizado y descarboxilado oxidativamente a acetil-CoA para producir acetato y succinato (Cazzulo 1992) produciendo ATP por fosforilación a nivel de sustrato y grandes cantidades de NADH el cual es reoxidado por la cadena respiratoria y 2) otra parte anabólica que implica la formación de citrato para la biosíntesis de ácidos grasos (figura A.6.).

La actividad de la cadena de transporte electrónico para oxidar cofactores reducidos (NADH) y generar un gradiente de protones es fundamental para el mantenimiento de procesos esenciales y es empleada para la producción de ATP por la ATP sintetasa, aunque su importancia en la producción de energía en esta fase del ciclo de vida es motivo de controversia (Coustou et al. 2003).

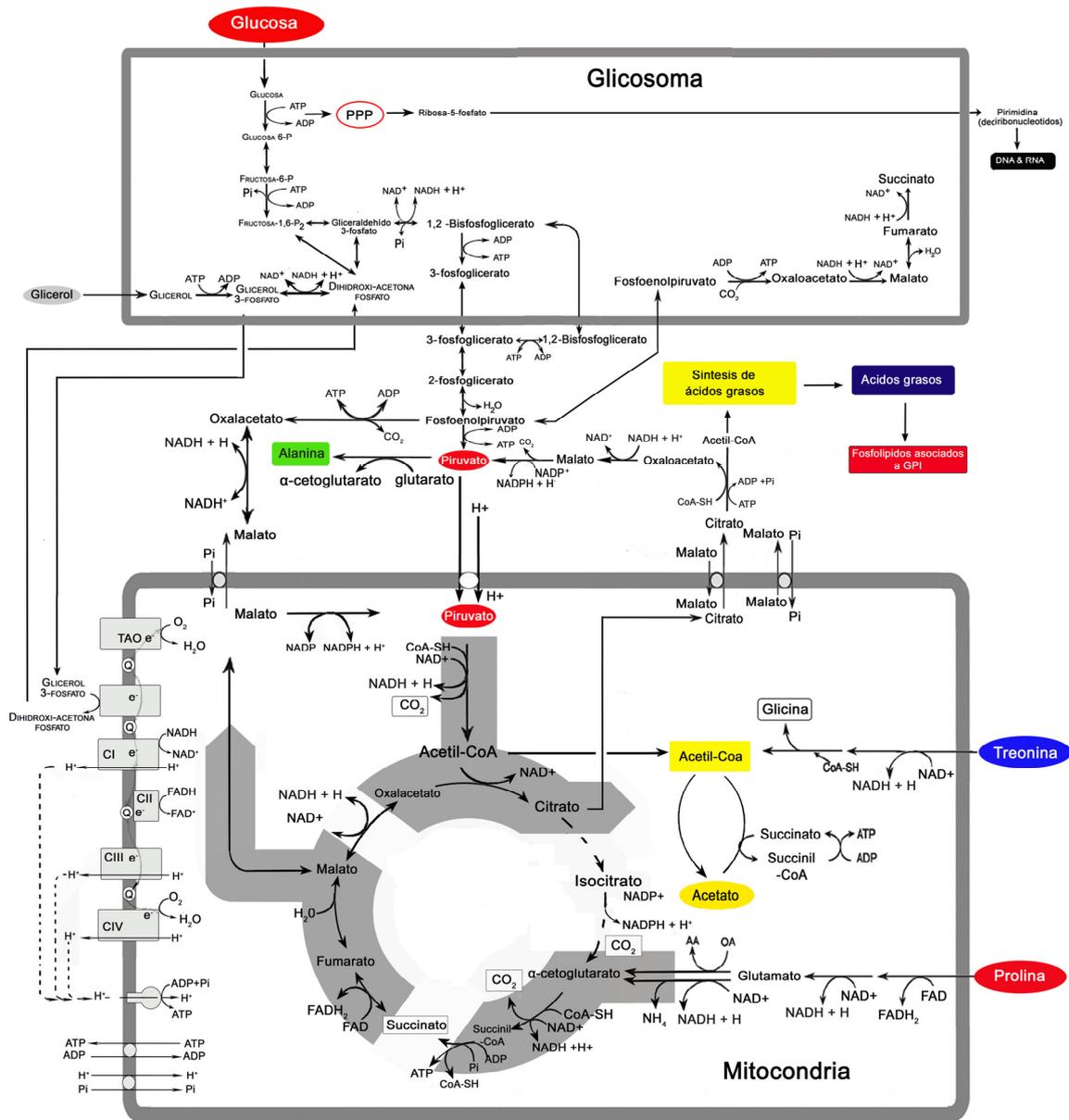


Figura A.7. Representación esquemática de las rutas involucradas en el metabolismo de carbohidratos y aminoácidos en la forma procíclica de *Trypanosoma brucei*.

A.V.5. Traducción mitocondrial

En la mayoría de células eucariotas, el genoma mitocondrial codifica sólo una pequeña fracción del proteoma organelar, de modo que la mayoría de las proteínas

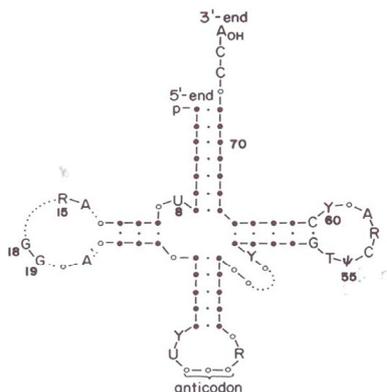
mitocondriales son codificadas en el núcleo e importadas desde el citoplasma. Además, la mitocondria contiene un sistema de traducción completo que requiere RNAs y RNAs que son codificados por el genoma organelar. En plantas y algunos hongos, un número variable de RNAs están ausentes del genoma mitocondrial y en estos organismos la carencia es compensada por el importe de una pequeña fracción de los correspondientes RNAs citosólicos. En el caso de tripanosómidos todos los RNAs necesarios para la traducción mitocondrial deben ser importados del citosol. Una característica importante del importe de RNAs citosólicos a la mitocondria es que estos son siempre de tipo eucariótico, mientras que el sistema de traducción mitocondrial es de tipo bacteriano. Una serie de adaptaciones evolutivas del sistema de traducción mitocondrial permite el reconocimiento y uso apropiados de este tipo de RNAs.

La síntesis de proteínas se inicia con metionina en eucariotas y archaeobacterias y formil metionina en bacterias y orgánulos eucariotas (Figura A.7). En estos procesos participan dos tipos de RNAs; el RNAs^{Met-i} iniciador, el cual incorpora la primera metionina del péptido naciente y es usado para la iniciación de la síntesis de proteínas y el RNAs^{Met-e} elongador el cual interviene en la inserción de metionina en las regiones internas de la cadena polipeptídica naciente (RajBhandary 1994; Blanquet et al. 2000) (figura A.7).

El RNAs^{Met-e} elongador es similar en todos los organismos pero el iniciador RNAs^{Met-i} puede ser subdividido en dos clases, el eucariótico y el de tipo bacteriano. La formilación de metionina del RNAs^{Met-i} es necesaria en bacterias y orgánulos y está catalizada por la enzima metionil-RNAs^{fMet} formil transferasa (MTF). Esta enzima está presente en orgánulos y bacterias pero ausente del citoplasma eucariótico y en archaeobacterias. El elemento de reconocimiento más importante para la MTF es el desapareamiento C-A en la posición 1-72 la cual está conservado en los RNAs^{Met-i} bacterianos (Lee et al. 1991)(figura A.8). El RNAs^{Met-i} eucariótico y de archaeobacteria contiene un A-U en vez del desapareamiento mencionado (figura A.8.). Frecuentemente en la mitocondria sólo hay un RNAs sencillo el cual actúa como un iniciador en el estado formilado y como un elongador cuando no está formilado (Takeuchi et al. 2001). En estos casos el RNAs^{Met-e} elongador se asemeja al RNAs^{Met-i}, pero sorprendentemente contiene el par de bases A1-U72 como en el caso del RNAs^{Met-i} de tipo eucariótico. Al comienzo del proceso de iniciación de la traducción, el RNAs cargado RNAs^{Met-i} está unido al factor de iniciación 2 (IF2), el cual promueve la interacción dependiente de GTP de este complejo con el ribosoma (Boelens and Gualerzi 2002). En el citoplasma,

el IF2 eucariota (eIF2) reconoce directamente al RNAt^{Met-i} eucariótico y promueve su unión al ribosoma. En bacterias y orgánulos, sin embargo, el RNAt aminoacilado debe estar formilado antes de que pueda interactuar con el IF2 de tipo bacteriano (figura A.8.).

A) RNAts de elongación



B) RNAts de iniciación

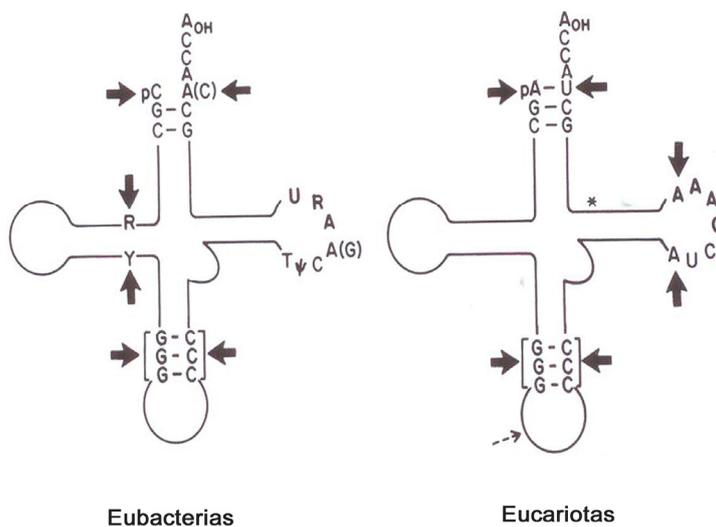


Figura A.8. Características presentes en la estructura de los RNAt. A) Estructura del RNAt de elongación representado como en la forma de trébol, incluyendo nucleótidos comunes a todos los RNAt de elongación (R=purina; Y= pirimidina). Características estructurales presentes en el RNAt de iniciación bacteriano (izquierda) y eucariótico (derecha). Las fechas indican las características distintivas de estas estructuras. (*)= sitio de modificaciones especiales en la ribosa presentes en RNAt de iniciación de hongos y plantas.

A.V.6. Iniciación de la traducción mitocondrial en *Trypanosoma brucei*

A diferencia de otros RNAts tripanosomales, el RNAt^{Met-i} está localizado exclusivamente en el citoplasma. Como consecuencia, el único RNAt presente en la mitocondria de *T. brucei* es el RNAt^{Met-e} eucariótico importado (Tan et al. 2002b). Se ha demostrado que los tripanosomátidos se adaptan a esta situación formilando una fracción del RNAt^{Met-e} importado de tipo eucariota usando una MTF, de mayor tamaño que su equivalente bacteriana y humana y con una especificidad inusual de sustrato (Tan et al. 2002a) ya que el factor IF2 de *T. brucei* sólo se asocia a través de sus dominios en el extremo C-terminal al RNAt^{Met-e} formilado pero no al sin formilar (Charriere et al. 2005).

A.V.7. Aminoacilación de RNAt

Para ser usado en la traducción cada RNAt debe ser incorporado a su aminoácido cognato. Esta reacción de dos pasos dependiente de ATP es catalizada por una enzima conocida como la aminoacil-RNAt sintetasa (aaRS). El aminoácido primero es activado por el AMP y posteriormente reacciona con el RNAt para producir el aminoacil-RNAt (LaCount et al. 2000). Salvo algunas excepciones, en general hay una sola aaRS por cada aminoácido. En un sistema de traducción definido, todos los RNAt aceptan el mismo aminoácido, son llamados isoaceptores y serán aminoacilados por el mismo aaRS. Un mecanismo que asegura que un RNAt está cargado con el aminoácido correcto se basa en la identidad de elementos en ciertas posiciones del RNAt que son específicamente reconocidas por la aaRS (Normanly and Abelson 1989). Usualmente los elementos de identidad son encontrados en el anticodón y/o el tallo aceptor. Para unos pocos RNAt, sin embargo, los elementos más importantes de reconocimiento están presentes en otras regiones de la molécula de RNAt (Giege et al. 1998).

A.V.8. AaRS en eucariotas

En muchos eucariotas que no contienen cloroplastos hay dos grupos de aaRS: un grupo se encarga de la aminoacilación en el citosol y el otro grupo de cargar RNAts en la mitocondria. Las aaRSs mitocondriales son codificadas en el núcleo e importadas a la mitocondria (Bullerwell and Gray 2004), aunque su origen evolutivo es bacteriano, así como el de los RNAts mitocondriales. Por lo tanto, es conocido que en muchos eucariotas el grupo de aaRSs mitocondriales y citosólicos se superpone y que algunas enzimas están dualmente localizadas en ambos compartimentos (Small et al. 1998).

A.VI. PROCESAMIENTO POST-TRADUCCIONAL

El procesamiento post traduccional se refiere a las modificaciones posteriores que tienen lugar en la estructura molecular de una proteína una vez sintetizada (figura A.7). Las modificaciones incluyen una serie de procesamientos enzimáticos que el polipéptido debe experimentar para progresivamente alcanzar una estructura funcionalmente activa para cumplir su papel biológico. Se producen una variedad de posibles reacciones de modificación en los extremos amino y carboxilo tales como: incorporación de oligosacáridos y grupos isoprenilo, formación de puentes disulfuro y adición de grupos prostéticos, entre otros. Sin embargo las modificaciones más comunes encontradas en las proteínas son la acetilación, metilación y fosforilación (Polevoda and Sherman 2007).

A.VII. PÉPTIDO DEFORMILASA (PDF)

La síntesis ribosomal de proteínas en bacterias y organúlos se inicia con la N-formil metionina como primer aminoácido (Adams and Capecchi 1966). Este grupo formilo debe ser estrictamente escindido para que la proteína pueda ser sometida a las modificaciones post-traduccionales necesarias para su maduración biológica (Solbiati et al. 1999). La escisión del grupo N-formilo de la metionina es catalizado por la enzima péptido deformilasa (PDF) (EC 3.5.1.31) a medida que la cadena polipeptídica emerge del ribosoma o inmediatamente después de completar el proceso de elongación (Adams 1968; Adams and Capecchi 1966; Ball and Kaesberg 1973; Livingston and Leder 1969). Al menos una PDF está presente en todos los genomas de eubacterias secuenciados hasta la fecha (Guilloteau et al. 2002).

La deformilación de péptidos nacientes es una función esencial para la proliferación en *E. coli*, *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus neumoniae* (Mazel et al. 1994; Meinnel and Blanquet 1994; Chen et al. 2000; Margolis et al. 2001). La actividad PDF fue descrita por primera vez a finales de los años sesenta en extractos crudos de *E. coli* y *B. subtilis* (Adams 1968; Adams and Capecchi 1966; Giglione et al. 2000) y aunque gran parte del conocimiento básico de esta proteína proviene de estos estudios, la actividad PDF demostró ser extremadamente inestable y variable (Adams and Capecchi 1966; Ball and Kaesberg 1973; Giglione et al. 2000; Livingston and Leder 1969), y sólo comenzó a generar interés a finales de los 90 como un posible blanco de acción de fármacos. Estas dificultades experimentales retrasaron las investigaciones

detalladas de la PDF. El clonamiento del gen *PDF* de *E. coli* (Mazel et al. 1994; Meinnel and Blanquet 1993) hizo posible purificar la proteína a homogeneidad y permitió estudiar el origen de su inestabilidad.

La primera forma altamente pura de PDF contenía Zn^{+2} como cofactor metálico asociado y la enzima fue propuesta como una metaloproteasa de Zn^{+2} debido a su similitud con termolisina y otras metaloproteasas de la matriz. (Meinnel and Blanquet 1993, Rajagopalan et al 1997; Meinnel and Blanquet 1995; Meinnel et al. 1996; Giglione et al. 2000); Ragusa et al 1998). Sin embargo, la baja actividad de la enzima *in vitro* no era consistente con la alta actividad *in vivo* (Dardel et al. 1998) lo que dió lugar a dudas en cuanto a la identidad del ión metálico fisiológico.

No fue hasta 1997 cuando se completó la purificación de una fracción de PDF activa, y se detectó que la enzima estaba asociada a un ión hierro que era muy sensible al oxígeno atmosférico (Becker et al. 1998a; Chan et al. 1997; Hu et al. 1998).

La concepción errónea de que el zinc era el ión metálico catalítico de la PDF fue debido a la fuerte afinidad que presenta la enzima por este cofactor y a la observación de que una fracción significativa de PDF aparece asociada al zinc. La adición de otros cationes divalentes como el Co^{2+} o el Ni^{2+} durante la purificación ha hecho posible obtener preparaciones estables y muy activas de la PDF bacteriana que mantienen una actividad catalítica casi idéntica a la forma nativa dependiente de hierro. (Becker et al. 1998a; Rajagopalan et al. 2000; Yuan and White 2006)(tabla A.1.).

Proteína	Sustrato	K_{cat}/K_m (M/s)
Fe^{2+} - PDF	f-ML-ρNA	3.50×10^6
Co^{2+} - PDF	f-ML-ρNA	1.11×10^6
Zn^{2+} - PDF	f-ML-ρNA	3.1×10^4
Fe^{2+} - PDF	f-MA	1.1×10^5
Ni^{2+} - PDF	F-MA	1.0×10^5

Tabla A.1. Comparación de la actividad catalítica de la PDF de *E. coli* asociada a diferentes metales (Aubart and Zalacain 2006).

A.VII.1. Características estructurales de la PDF

Todas las PDFs bacterianas están conformadas por pequeños monómeros compuestos de 160 a 200 residuos con pocas variaciones en la longitud de sus dominios amino y carboxilo terminal. En todos los casos estudiados el extremo amino es esencial para la actividad *in vitro* mientras que el C-terminal es prescindible para la actividad deformilasa *in vivo* (Durand et al. 1999; Meinnel et al. 1996).

La PDF se pliega formando un dominio compacto que consiste en hojas beta antiparalelas de 5 cadenas, un lazo beta de dos cadenas, dos alfa hélice convencionales y dos helices cortas 3_{10} (Giglione et al. 2000). En la estructura cristalina de la PDF de *E. coli*, el dominio a baja temperatura adopta un plegamiento α -hélice, pero en solución a temperatura fisiológica (30-45°C) parece tener una estructura menos organizada (figura A.9.).

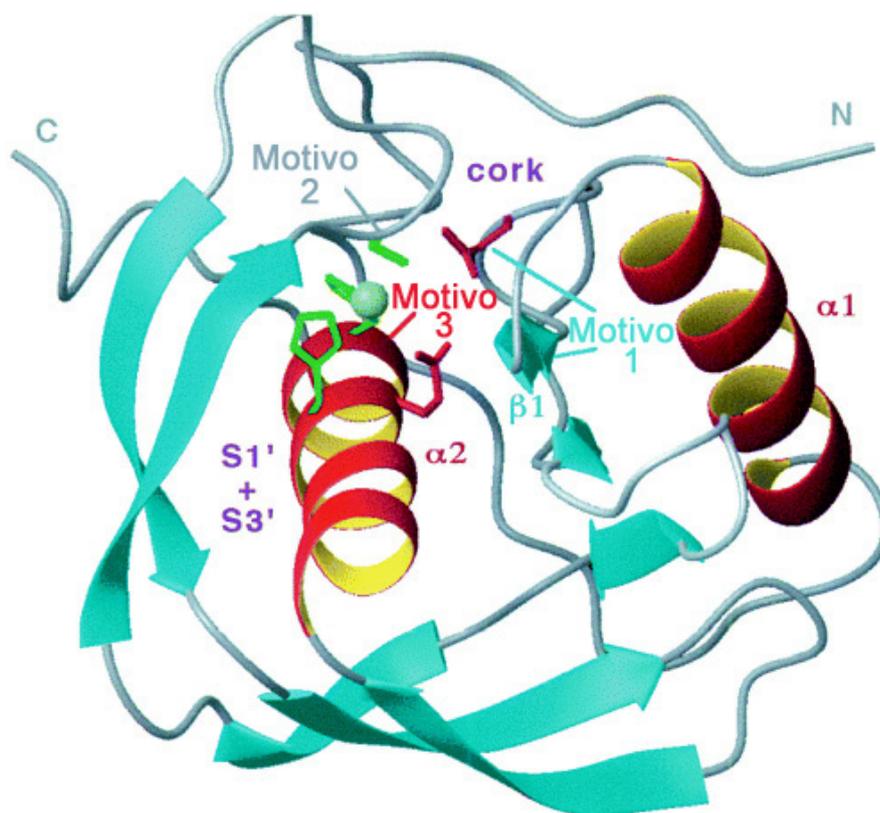


Figura A.9. Representación de la estructura del centro catalítico de la péptido deformilasa de *E. coli*. Las estructuras secundarias están diferenciadas por colores. Las regiones α -helicoidal se indican en rojo y amarillo y las regiones hoja β en azul claro mientras que el resto se indica en color gris. Las cadenas laterales de los tres residuos de unión al metal (Cis 90, His 132 e His 136) y de la Gln 50 y el Glu 133 están presentadas en verde y rojo, respectivamente. El catión metálico esta representado como una esfera verde. La localización de los tres motivos conservados, el centro hidrofóbico y los “bosillos” hidrofóbicos S1'/S3' están indicados (Dardel et al. 1998).

El alineamiento de diversas secuencias de PDFs eubacterianas (tabla A.2) ha permitido establecer que aunque las secuencias son muy diferentes, algunos residuos están significativamente conservados y conforman en conjunto tres regiones que comprenden el bolsillo catalítico de la enzima, incluyendo residuos que están involucrados en la unión al sustrato y al catión metálico: (1)GøGøAAXQ (Motivo 1), (2) EGCLS (Motivo 2) y (3) HEøDH (Motivo3) donde ø es un aminoácido hidrofóbico y X es cualquier aminoácido (Mazel et al. 1997; Lazennec and Meinnel 1997; Giglione et al. 2000) (tabla A.2.).

	Dominio1	Dominio2	Dominio3
Consenso	GXGXAAXQ	EGCLS	QHEXDHXXG
<i>Escherichia coli</i>	GIGLAATQ	EGCLS	QHEMDHLVG
<i>Vibrio cholerae</i>	GIGLAATQ	EGCLS	QHELDHLAG
<i>Haemophilus influenzae</i>	GIGLAAPQ	EGCLS	QHEIDHLNG
<i>Pseudomonas aeruginosa-1</i>	GIGLAATQ	EGCLS	QHECDHLNG
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	GIGLAATQ	EGCLS	QHELDHLMG
<i>Bordetella pertussis-1</i>	GVGLAATQ	EGCLS	QHEIDHLDG
<i>Vibrio cholerae-2</i>	GIGLAAPQ	EGCLS	QHEIDHLSG
<i>Helicobacter pylori strain 26695</i>	GIGLAAIQ	EGCLS	QHEIDHLNG
<i>Enterococcus faecalis-1</i>	GIGLAAPQ	EGCLS	QHEIDHLNG
<i>Bacillus subtilis def</i>	GVGLAAPQ	EGCLS	QHEMDHLDG
<i>Staphylococcus aureus defA</i>	<u>A</u> AGL <u>C</u> APQ	EG <u>S</u> IT	<u>L</u> HID <u>Q</u> MNG
<i>Streptococcus pneumoniae-1</i>	GVGLAAPQ	EGCLS	QHEIDHING
<i>Streptococcus mutans</i>	GVGLAAPQ	EGCLS	QHEIDHTNG
<i>Streptococcus pyogenes-1</i>	GVGLAAPQ	EGCLS	QHEIDHING
<i>Enterococcus faecalis-2</i>	GVGLAAPQ	EGCLS	QHEIDHING
<i>Bacillus subtilis ykrB</i>	GVGLAAPQ	EGCLS	QHEIDHLNG
<i>Staphylococcus aureus defB</i>	GVGLAAPQ	EGCLS	QHEIDHLNG
<i>Mycoplasma genitalium</i>	GIGIAANQ	EGCLS	QHEFDHLQG
<i>Streptococcus pneumoniae-2</i>	<u>C</u> VGLA <u>A</u> N <u>M</u>	EGCLS	QHELDHLEG
<i>Streptococcus pyogenes-2</i>	<u>C</u> LGMA <u>A</u> N <u>M</u>	EG <u>S</u> CLS	QHELDHLEG
<i>Bordetella pertussis-2</i>	GVGLAAPQ	EGCLS	QHECDHLIG
<i>Pseudomonas aeruginosa-2</i>	GVGLAAPQ	EGCLS	QHECDHLIG
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	GVGLAANQ	EGCLS	QHET <u>G</u> HLDG

Tabla A.2. Alineamientos de motivos del centro activo de diversas deformilasas procariotas. La disponibilidad de secuencias de genomas ha permitido la identificación y comparación de homólogos de PDF. Ciertas porciones del gen están altamente conservadas y corresponden al dominio catalítico de la enzima. Los pocos residuos que divergen de las secuencias consenso están subrayados (Yuan et al. 2001).

Estos motivos están cercanos en el espacio y conforman tres motivos del sitio activo, lo que inicialmente sugirió que la estructura tridimensional del sitio activo de PDF debía estar conservada (Lazennec and Meinnel 1997; Meinnel et al. 1996).

La cisteína del motivo 2 y los dos residuos de histidina del motivo 3 están involucrados en la unión del metal al sitio activo (Meinnel and Blanquet 1995), mientras que la glutamina del motivo 1 y la del motivo 2 son esenciales para la catálisis debido a que están directamente involucradas en el reconocimiento del grupo formilo y en la estabilización del estado de transición (Becker et al. 1998a; Meinnel et al. 1999; Hao et al. 1999) (figura A.10.). La cadena lateral de serina del motivo 2 establece enlaces de hidrógeno con la cadena lateral de glutamina en el motivo 1. Del mismo modo, el carboxilato del glutamato del motivo 2 y el aspartato del motivo 3 establecen puentes de hidrógeno con la cadena lateral de una arginina estrictamente conservada y que se localiza entre los motivos 2 y 3 (Becker et al. 1998a; Dardel et al. 1998). El último residuo estrictamente conservado es una asparragina, localizada entre los motivos 1 y 2. Su cadena lateral interactúa por puentes de hidrógeno con el esqueleto de un aminoácido localizado en el extremo amino de la proteína.

La glicina y la alanina conservadas del motivo 1 han demostrado ser esenciales para la catálisis. Se ha sugerido que el tamaño reducido de estas cadenas laterales deja suficiente espacio dentro de la cavidad del sitio activo para la unión del sustrato (Meinnel et al. 1999).

Otros residuos menos conservados participan en la optimización del empaquetamiento de la estructura tridimensional (Dardel et al. 1998).

En términos globales esta red de interacciones hidrofóbicas y de puentes de hidrógeno hacen que la estructura de la PDF sea muy compacta y sólida. Esto capacita a la proteína para resistir el ataque proteolítico, ciclos de plegamiento y desplegamiento, la congelación y las altas temperaturas. La solidez de la cadena polipeptídica contrasta fuertemente con la fragilidad del sitio de unión a metal.

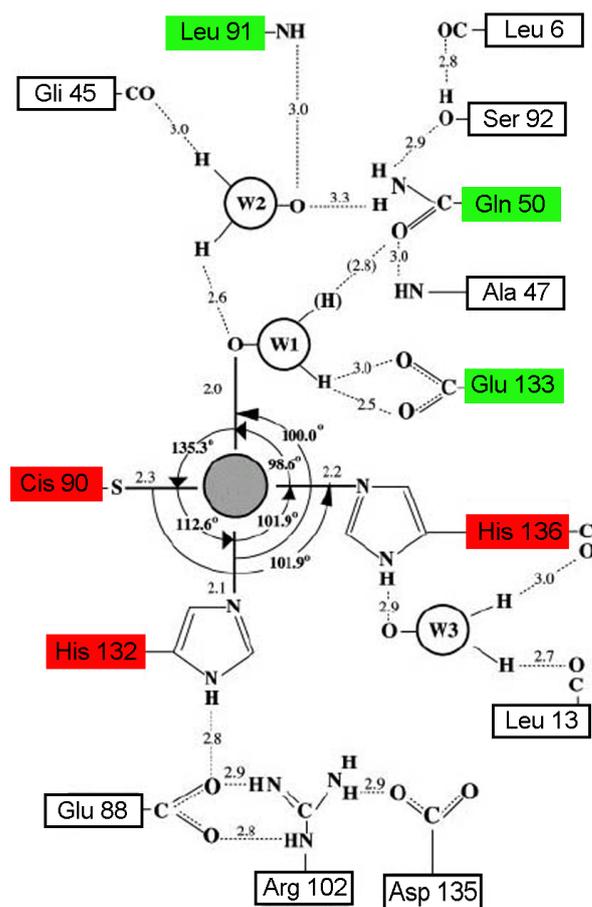


Figura A.10. Esquema de interacción entre el ión Ni^{2+} , la molécula de agua y los aminoácidos del sitio activo de la péptido deformilasa (Becker et al. 1998b).

A.VII.2. Sitio de unión del cofactor metálico

Aunque la PDF nativa emplea Fe^{2+} preferentemente en lugar de Zn^{2+} , el sitio de unión a metal de estas proteínas es un buen ejemplo de una tradicional metaloproteasa de zinc como termolisina (Vallee and Auld 1990). Contiene un motivo HEXXH que conserva un residuo de glutamato que es esencial para la catálisis y que posiblemente activa la molécula de agua unida al metal para la hidrólisis del grupo formilo del sustrato (Hao et al. 1999)(figura A.9.). Sin embargo, difiere en que la cisteína de las PDFs es el tercer residuo que participa en la unión a metal junto con las dos histidinas mientras que la termolisina usa el glutamato y otras metaloproteasas usan un tercer residuo de histidina (Meinzel and Blanquet 1995).

Las PDFs en general presentan tres bolsillos o zonas en el sitio de unión al sustrato además del sitio de unión a metal. Empleando la nomenclatura clásica de metaloproteasas estos bolsillos se denominan S1', S2' y S3' y la posición correspondiente de unión al sustrato o inhibidores están señalados como P1', P2' y P3' (Smith et al. 2003)(figura A.10.).

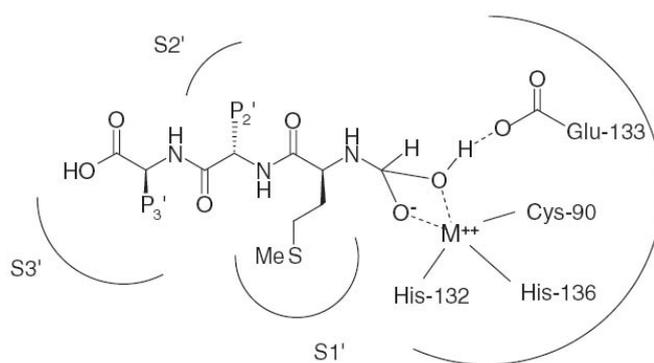


Figura A.11. Representación esquemática del sitio activo de PDF y el estado de transición del sustrato.

Bolsillo S1': es el sitio de unión para la cadena lateral de la metionina del sustrato y está compuesta de varios residuos hidrofóbicos. Este bolsillo presenta un tamaño y una forma similar en las PDFs de diversas bacterias Gram-positivas y Gram-negativas, con la única diferencia de que las PDFs de *S. aureus* y *S. pneumoniae* poseen un bolsillo levemente más amplio que la PDF de *H. influenzae* y *E. coli* (Smith et al. 2003). La única sustitución de un aminoácido no conservado en esta región se dispone en el borde entre los bolsillo S1' y S3'. Este residuo es una leucina en *E. coli* (Leu-125), *H. influenzae* (Leu-125), *P. aeruginosa* (Leu-127) y *B. Stearothermophilus* (Leu-146) y una tirosina en *S. neumoniae* (Tyr-166), *S.aureus* (Tyr-147), *T. maritima* (Tyr-122) (Guilloteau et al. 2002; Smith et al. 2003; Kreuzsch et al. 2003; Smith et al. 2003)

Bolsillo S2' y S3': aunque parecen superficies de depresión muy superficiales y menos definidas en comparación con el S1' presentan muchas diferencias en cuanto a secuencia y tamaño entre todas las PDFs bacterianas (Aubart and Zalacain 2006). S2' no es un bolsillo verdadero, forma un espacio en forma de túnel abierto apuntando hacia el disolvente. Esta región definida es capaz de acomodar una amplia variedad de cadenas laterales presentes en varios sustratos formilados (D'Souza V and Holz 1999).

S3' es la región menos conservada del sitio activo debido a la inserción de dos residuos entre la región S1' y S2' en especies Gram-positivas en *S. neumoniae*. (Smith et al. 2003). Las diferencias estructurales que presentan los bolsillos del sitio activo entre las diversas PDF bacterianas, han planteado que pueden ser consideradas para el diseño de inhibidores más selectivos y específicos frente a un patógeno en particular (Smith et al. 2003)

A.VII.3. Localización intracelular de la PDF en células eucariotas

Estudios iniciales sugerían que las proteínas sintetizadas en la mitocondria de mamíferos retenían su grupo amino formilo (Giglione et al. 2000; Steffens and Buse 1976; Walker et al. 1991) lo que establecía que en humanos no existía la actividad PDF. La ausencia de homólogos de la PDF bacteriana en el genoma de organismos modelo como *Saccharomyces cerevisiae* y *Caenorhabditis elegans* era consistente con la concepción ampliamente aceptada de que la PDF no estaba presente en los orgánulos de células animales y ni en hongos.

Sin embargo, los datos obtenidos a partir del reciente análisis de otros genomas eucariotas ha suministrado una visión diferente de la expresión de PDFs en el reino animal y vegetal. Secuencias genómicas que codifican homólogos bacterianos de PDFs han sido identificados en humanos y plantas superiores (Giglione et al. 2000) y se ha demostrado que son funcionales en mitocondrias, plastidios y cloroplastos de diferentes especies de plantas. Estas PDF son transportadas a la mitocondria o plastidios gracias a la existencia de secuencias señal específicas. Del mismo modo se han detectado homólogos de PDFs bacterianas en el genoma de protozoarios de importancia biológica como *Plasmodium spp* y especies pertenecientes a la familia *Trypanosomatidae* tales como *Leishmania spp*, *Trypanosoma cruzi* y *Trypanosoma brucei* causantes de enfermedades parasitarias de alta prevalencia a nivel mundial.

A.VII.4. Clasificación de las PDFs

La disponibilidad de secuencias completas de genomas eucariotas ha permitido la detección de homólogos de las PDFs bacterianas. Análisis filogenéticos y de cristalografía de rayos x de diversas PDFs incluyendo *E. coli*, *H. influenzae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Thermotoga maritima*, *Plasmodium falciparum* (Guilloteau et al. 2002; Kreuzsch et al. 2003; Park et al. 2005; Smith et al. 2003), *S. aureus*, *S*

pneumoniae, *B. stearothermophilus* y *B. cereus* han permitido determinar algunas propiedades estructurales distintivas y a pesar de que la identidad de la secuencia global difiere significativamente entre las PDFs eucarióticas y procarióticas, las estructuras tridimensionales presentan una sorprendente similitud y se ha sugerido una clasificación “provisional” que no engloba el espectro entero de enzimas (Zhou et al. 2005) pero permite agrupar los homólogos de PDF en 3 clases principales (Fieulaine et al. 2005):

A) PDFs de tipo 1 :

En este grupo se han introducido todas las PDF eucariotas y que están localizadas en la mitocondria. Presentan una inserción entre las cadenas β_2 y β_3 y variaciones sistemáticas de aminoácidos en la proximidad del sitio activo. Dentro de este grupo se distinguen dos clases:

- 1) PDF1A, dentro de la cual figuran la PDF humana y la PDF de *A. thaliana* la cual ha sido designada como enzima modelo para esta clase. Conforman dímeros en solución y en cristales.
- 2) PDF1B que corresponde a las de plastidios de plantas y Apicomplexa, algunas bacterias Gram-positivas y todas las bacterias Gram-negativas y considera a la PDF de *E. coli* como la enzima de referencia (Fieulaine et al. 2005).

Ambas clases de PDF1 son funcionales en deformilación y potencialmente inhibidas por actinonina (Serero et al. 2001; Serero et al. 2003). A su vez conservan el mismo patrón de plegamiento, con excepción de la región C-terminal la cual adopta un número de estructuras intermedias a diferencia del resto de PDFs (Fieulaine et al. 2005). El sitio activo está bien conservado, especialmente en términos de quelación del metal y el mecanismo catalítico es estrictamente idéntico (Becker et al. 1998a; Meinnel et al. 1999, Hao et al. 1999). Sin embargo, PDF1A es altamente activa con zinc como cofactor metálico mientras que la PDF bacteriana es inactiva cuando se reemplaza hierro por zinc, a pesar de que ambas clases de enzimas presentan un ambiente de coordinación del metal y un sitio activo estrictamente idéntico, por lo que no está claro a que se debe esta diferencia en la actividad de PDF1B en presencia de zinc. PDF1A difiere significativamente de PDF1B en la secuencia aminoacídica ya que posee una larga secuencia de inserción (CD-loop) que genera un bolsillo S3' significativo. Presenta también diferencias importantes con las PDFs bacterianas en cuanto a la disposición del sustrato en el sitio activo y que han sido estudiadas en detalle para el diseño de inhibidores específicos (Serero et al. 2001; Serero et al. 2003).

B) PDFs de tipo 2

Este grupo comprende todas las PDFs de bacterias Gram-positivas e incluye a la PDF de *B. stearothermophilus* como enzima modelo. Comparada con la clase PDF1B, las PDF de tipo 2 tienen dos inserciones en el extremo amino, las cuales están ausentes en las PDF1B. Esa última inserción está localizada en la entrada del sitio activo de las PDFs de muchas bacterias patógenicas. El extremo C-terminal de la PDF de tipo 2 contiene varios residuos hidrofóbicos y presenta una conformación distinta a la α -hélice de la PDF1B, conformando un lazo seguido de una cadena β que se disponen en direcciones opuestas. El resto de la estructura, incluyendo el sitio activo, parece plegarse del mismo modo que en el resto de las PDFs (Giglione et al. 2000; Lazennec and Meinnel 1997).

Generalmente las PDFs tipo 2 son de mayor tamaño debido a diferencias en su extremo amino o carboxilo terminal así como también a la presencia de inserciones internas. A pesar de la baja identidad de secuencia entre las PDFs de tipo 1 y tipo 2 (Guilloteau et al. 2002) ambos tipos exhiben estructuras tridimensionales muy similares y modos de unión a la actinonina y al sustrato f-MAS estrictamente conservados, lo que ha facilitado el diseño de inhibidores y su elección como blancos de acción de antibióticos de amplio espectro (Boularot et al. 2004) .

C) PDFs de tipo 3

La tercera clase de PDFs representa una serie de homólogos recientemente identificados en archaeobacterias y *Trypanosoma spp.* Estas secuencias presentan algunos cambios en los motivos altamente conservados, siendo significativamente diferentes a otras PDFs bien caracterizadas y ante la ausencia de evidencia experimental se sugirió que era poco probable que funcionaran como PDFs (Boularot et al. 2004; Leeds and Dean 2006). Teniendo en cuenta todas estas diferencias se ha sugerido que se pueden diseñar inhibidores de amplio espectro (Smith et al. 2003)

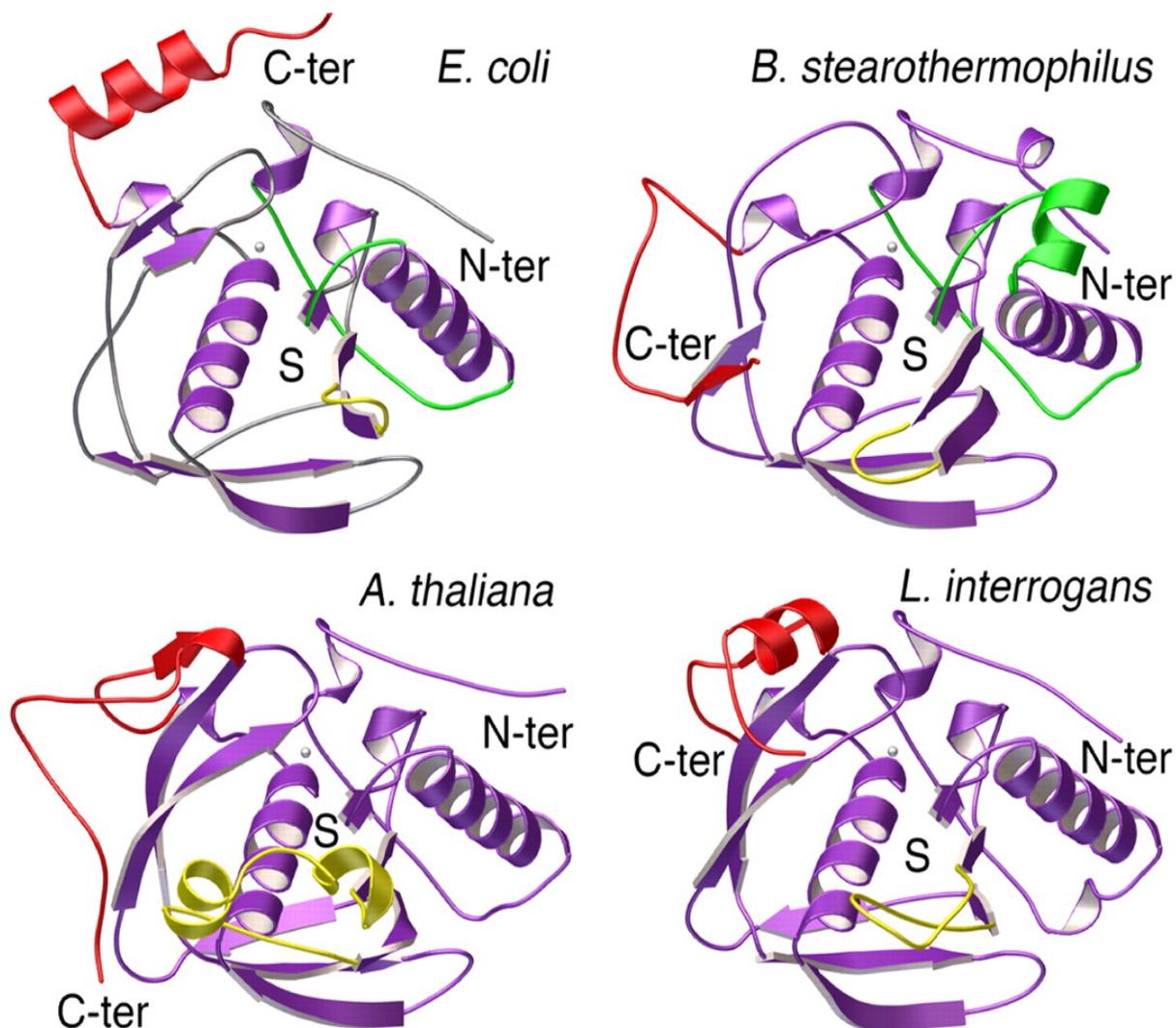


Figura A.12. Comparación del patrón de plegamiento de diferentes PDFs. Las PDFs de *E. coli*, *B. stearothermophilus*, *A. thaliana* y *L. interrogans* se muestran en púrpura. La región CD se indica en amarillo y la región C-terminal en rojo para demostrar las diferentes conformaciones observadas. Las inserciones 1 y 2 se muestran en verde en las PDFs de *E. coli* y *B. stearothermophilus*. Las esferas grises representan el ión metálico y están incluidas en la figura para indicar la conservación estructural del sitio de unión del catión metálico (Fieulaine et al. 2005).

A.VII.5. PDF como blanco para el diseño de antibióticos y antitumorales

Durante mas de 3 décadas fue ampliamente aceptado que las células eucariotas carecen de PDFs. En vista de que esta enzima es esencial en todas las bacterias estudiadas hasta la fecha, la PDF fue reconocida como un atractivo blanco para el diseño de nuevos agentes antibacterianos.

La actinonina es un derivado hidroxamato pseudotripéptido natural que ha demostrado ser un agente antibacteriano moderado desde 1960 (Gordon et al. 1962) pero no fue hasta el año 2000 (Chen et al. 2000) cuando se determinó que inhibía selectivamente la PDF bacteriana. Se han sintetizado muchos derivados de la actinonina que han demostrado una potente actividad como antibióticos. Se ha completado recientemente estudios clínicos en fase I para dos de estos derivados (tabla A.4.).

Inhibidores peptídicos

Clase	Cpd	Ki	MIC	Comentarios adicionales
Tiol	3	19	<i>E. coli</i> (75-100 µM), <i>B. subtilis</i> (6.4 µM)	S.A.D.
P2' i-Pr	Actinonina	< 0.23 ^c	<i>S. a.</i> (32), <i>S. pn.</i> (32), <i>H. i.</i> (2), <i>E. coli</i> (64)	Inestable in vivo
P2' t-Bt	BB-3497	< 0.18 ^c	<i>S. a.</i> (4-16), <i>S. pn.</i> (8), <i>H. i.</i> (0.25)	Eficaz <i>in vivo</i> (oral)
	BB-83698	ND	<i>S. a.</i> (8 ^d), <i>S. pn.</i> (0.5 ^d), <i>H. i.</i> (32-64 ^d)	En fase I como antineumococo
P2' Prolina	VCR3324	12	<i>S. a.</i> (1-2), <i>S. pn.</i> (1), <i>H. i.</i> (1-4)	Citotóxico (3µg/mL)
	VCR3375	3	<i>S. a.</i> (1-a), <i>S. pn.</i> (8-32), <i>H. i.</i> (2-4)	Eficaz <i>in vivo</i> (oral)
	VCR4307	2	<i>S. a.</i> (0.5-1), <i>S. pn.</i> (1), <i>H. i.</i> (2-4)	Eficaz <i>in vivo</i> (oral)
	LBM-415	ND	<i>S. a.</i> (2 ^d), <i>S. pn.</i> (1 ^d), <i>H. i.</i> (8 ^d), <i>E. f.</i> (4 ^d)	En Fase 1

Inhibidores no peptídicos

Clase	Cpd	IC50 (nM) ^b	MIC	Comentarios adicionales
Sulfonilo	24	16	<i>S. a.</i> (128), <i>S. pn.</i> (128), <i>H. i.</i> (2),	S.A.D.
Sulfinilo	25	100	<i>S. a.</i> (16), <i>S. pn.</i> (32-64), <i>H. i.</i> (1)	S.A.D.
Benzamida	27	140	<i>H. i.</i> (2), <i>E. coli</i> (2-4)	Eficaz <i>in vivo</i> (oral)
Biciclico	29	49	<i>H. i.</i> (16), <i>M. Catarrhalis</i> (4)	S.A.D.
	31	8400	<i>S. a.</i> (10)	Eficaz <i>in vivo</i> (oral)
Macrocielo	38	0.33 ^c	<i>S. a.</i> (16), <i>S. pn.</i> (2-4), <i>H. i.</i> (0.5), <i>E. coli</i> (12)	Selectivo frente a MMPs

^aMIC < 16µg/mL frente al menos a un organismo

S.a. = *S. aureus*, *S. pn.* = *S. pneumoniae*, *H.i.* = *H. influenzae*, *E. f.* = *E. faecalis*

^b*E. coli* PDF

^cKi inhibición del tiempo

^dMIC₉₀

S.D.A. = sin datos adicionales

Tabla A.3. Inhibidores de PDF con actividad antibacteriana. (Aubart and Zalacain 2006)

A.VIII. RUTA DE ESCISIÓN DE METIONINA N-TERMINAL (NME)

Las modificaciones post-traduccionales que debe experimentar una proteína para alcanzar un nivel óptimo de funcionalidad biológica dependen de ciertas señales presentes en su secuencia N-terminal. En general, estas señales regulan la estabilidad de la proteína mediante procesos que involucran el reconocimiento de motivos estructurales para regular su degradación constitutiva (Boularot et al. 2004; Breitschopf et al. 1998; Flynn et al. 2003) y mecanismos universalmente conservados que relacionan la vida media *in vivo* de una proteína y la identidad de su residuo N-terminal y que se conocen genéricamente como la “Regla del extremo N-terminal” (Varshavsky 1996).

En eucariotas la región N-terminal contiene señales involucradas en la distribución intracelular de la proteína aportando una función transitoria en el caso de proteínas precursoras que una vez sintetizadas son dirigidas a su destino final donde la secuencia es procesada. Sin embargo, independientemente del sitio de síntesis de proteínas estos mecanismos compiten con otras vías co-traduccionales que también dependen de la secuencia N-terminal del polipéptido. Estos eventos involucran otro grupo de proteínas y en general son activados por la escisión de la primera metionina de la cadena polipeptídica. (figura A.13.).

La metionina es el primer aminoácido de proteínas recién sintetizadas, pero dependiendo del organismo y del compartimento intracelular considerado es retirado en un 55 a 70% de los casos en proteínas maduras para dejar un residuo N-terminal no voluminoso tal como alanina, cisteína, glicina, prolina, serina, treonina o valina (Boularot et al. 2004; Giglione and Meinel 2001; Sherman et al. 1985). Aunque la metionina es un residuo voluminoso y teóricamente desestabilizador, en algunos casos parece aportar estabilidad (Varshavsky 1996; Worley et al. 1998; Lee et al. 2002). Sin embargo en plantas, *E. coli* y levaduras el mantenimiento de la metionina N-terminal desestabiliza la proteína pudiendo actuar como señal que dirige su degradación. A veces este parámetro no es suficiente en sí mismo para conferir una vida media corta a la proteína, ya que existen otras características cercanas a su primera metionina amino terminal tales como la fosforilación de residuos de serina (Sheng et al. 2002) que pueden participar en la degradación. El proceso global por el cual la metionina es retirada de proteínas es conocido como escisión de metionina N-terminal (NME). Es un mecanismo co-traduccional irreversible que parece estar conservado desde eubacterias a

eucariotas y se lleva a cabo antes de que la cadena polipeptídica naciente sea completamente sintetizada (Arfin and Bradshaw 1988), iniciándose tan pronto como emerge el primer residuo del túnel de salida del ribosoma y antes de que se inicie el proceso de plegamiento tridimensional de la proteína (Ball and Kaesberg 1973; Pine 1969).

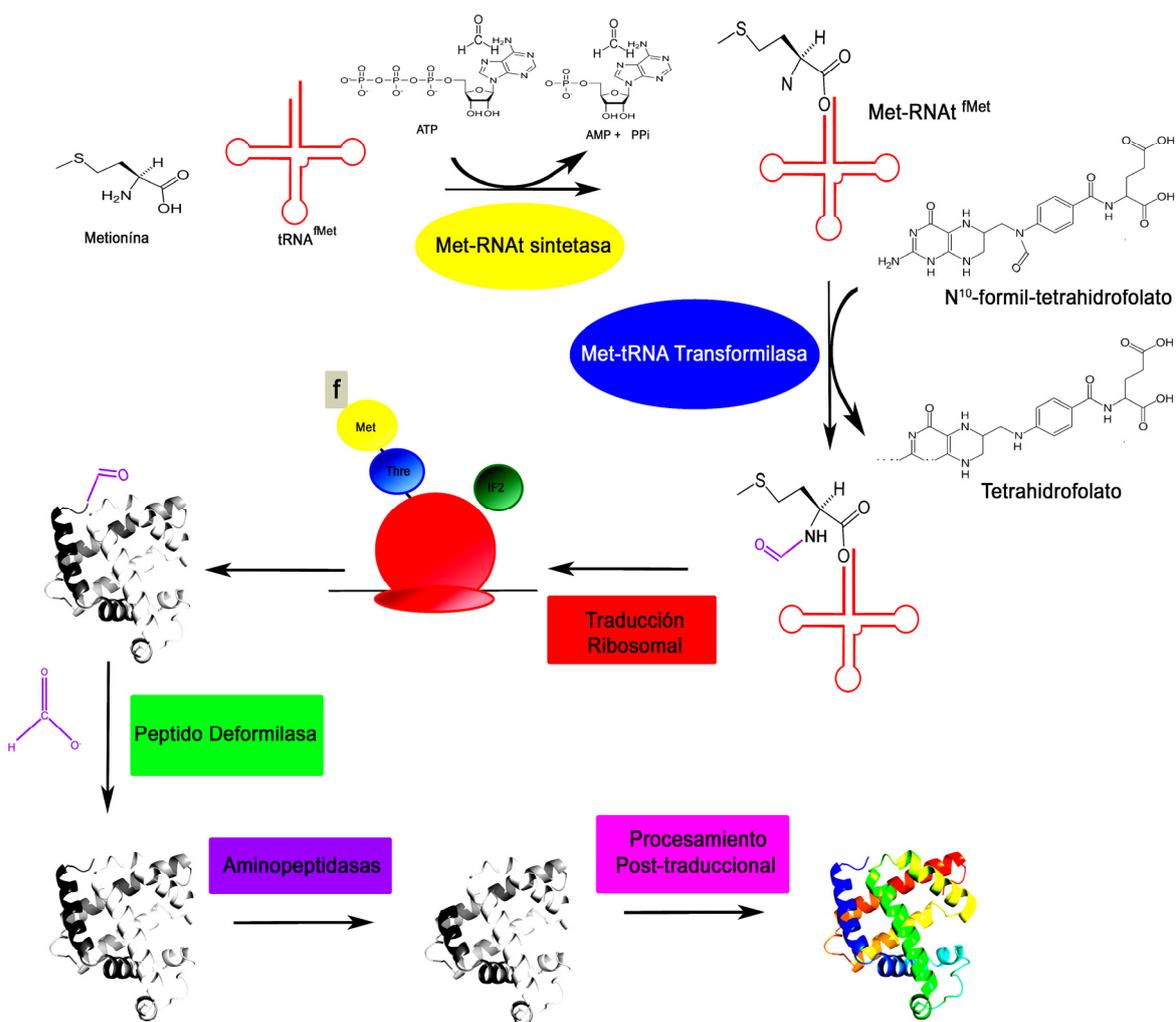


Figura A.13. Representación esquemática general de la ruta de biosíntesis y modificación post-traduccion de proteínas.

La naturaleza y el volumen de la cadena lateral del segundo aminoácido junto con la actividad metionina aminopeptidasa (MAP; EC3.4.11.18) la cual, está presente en todos los organismos conocidos, son los principales determinantes del mantenimiento o de la escisión de metionina en posición N-terminal (Boularot et al. 2004). El gen que codifica la MAP es esencial en eubacterias (Kobayashi et al. 2003 {Chang et al 1989; Miller et al. 1989). En muchas proteínas de gran tamaño es probable que la metionina N-terminal no esté completamente accesible para el procesamiento por la NME debido a la localización de la proteína o el plegamiento y/o enterramiento de residuos N-terminales dentro de su estructura tridimensional (von Heijne 1989). Los primeros trabajos sobre NME aparecieron a principios de los años 60 (Adams 1968; Arfin and Bradshaw 1988; Waller 1963; Meinnel and Blanquet 1993) y los datos acumulados junto con la disponibilidad de datos genómicos han permitido identificar esta ruta como un atractivo blanco terapéutico (Bracchi-Ricard et al. 2001; Bradshaw and Yi 2002; Giglione et al. 2000; Margolis et al. 2001).

Todos los organismos conocidos tienen MAPs. Las MAPs son metaloproteasas que *in vitro* se activan fuertemente por diversos cationes divalentes, aunque se desconocen con precisión la naturaleza del cofactor metálico presente en condiciones fisiológicas (D'Souza V and Holz 1999; Yang et al. 2001 Bradshaw et al. 1998). Hasta la fecha se han descrito dos tipos de MAPs (Bradshaw et al. 1998). Las MAP-2 están presentes en archaebacterias (Tsunasawa et al. 1997) y en el citoplasma de eucariotas (Arfin et al. 1995), mientras que las MAP1 se han encontrado en eubacterias (MAP1B) y en el citoplasma (MAP1A) y orgánulos de eucariotas (MAP1D) a excepción de levaduras y nematodos (Giglione et al. 2000; Serero et al. 2003).

MAP1 y MAP2 tienen una especificidad similar y la escisión de metionina depende de la naturaleza del segundo aminoácido.

Todas las MAPs eucariotas tienen extensiones N-terminales entre 50-100 residuos de largo, mientras que en procariotas no existen tales extensiones. Es probable que la secuencia N-terminal de MAPs del orgánulo esté involucrada en la distribución del dominio catalítico y su exportación al compartimento celular correcto (Serero et al. 2003). Las enzimas procesadas probablemente se asemejen a las MAPs bacterianas. La MAP1A citoplasmática también tiene una extensión incluyendo un motivo de dedo de zinc conservado. Aunque no está involucrado en la actividad catalítica, este dominio adicional no es retirado de la proteína madura y es esencial para la función celular y se ha sugerido que facilita la interacción con el ribosoma (Vetro and Chang 2002) Estas

extensiones no se requieren para la actividad aminopeptidasa de las MAP2 en eucariotas (Yang et al. 2001). El gen MAP es esencial en eubacterias (Kobayashi et al. 2003) y se ha postulado que la NME es esencial ya que forma parte del genoma mínimo requerido para la viabilidad de eubacterias (Hutchison et al. 1999; Gerdes et al. 2003).

Existen pocos estudios acerca de la importancia de la NME citoplásmica en eucariotas superiores o sobre la contribución relativa de varias enzimas, sin embargo parece ser que la MAP2 cumple un papel más relevante en eucariotas superiores que en levaduras (Boularot et al. 2004). Estudios en plantas indican que existen tres MAP1 que se distribuyen entre plastidios y mitocondria y que en orgánulos el 92% de las proteínas secuenciadas experimentan modificaciones N-terminal (Giglione and Meinnel 2001; Giglione et al. 2000). Esta posibilidad se puede extender a orgánulos de otros organismos como mamíferos y tripanosomátidos a pesar de que el proteoma codificado por el DNA organelar contempla un número limitado de proteínas que pueden estar sujetas a NME. Los tripanosomátidos contienen en su genoma dos secuencias que codifican para homólogos de MAPs, una para MAP-1 y la otra para MAP-2 lo que conduce a pensar que en orgánulos de plantas la maquinaria para el proceso de escisión de metionina N-terminal está presente y pudiera ser operativa.

Las aminopeptidasas juegan un papel fundamental en el metabolismo de proteínas participando en el recambio y en la regulación del pool de aminoácidos intracelular. Son esenciales para el metabolismo, crecimiento y desarrollo de todas las células y tejidos y son parte de procesos que regulan el sistema inmune y neurológico. Mantienen un amplio espectro de funciones fuera de la célula, en la superficie o incluso en los alrededores. Su participación en la causa o mantenimiento de ciertas patologías, particularmente el cancer, ha motivado el interés en su estructura y función con la esperanza de nuevos tratamientos. Actualmente se reconocen que son determinantes en la fisiología celular de muchos parásitos, incluyendo el agente causante de la malaria, lo que ha abierto nuevas vías para el desarrollo de nuevas fármacos (Mucha et al.).

A.IX. LAS PÉPTIDO DEFORMILASAS DE TRIPANOSOMÁTIDOS COMO DIANAS TERAPÉUTICAS FRENTE A ENFERMEDADES PROTOZOARIAS

Las modificaciones post-traduccionales constituyen un proceso esencial para completar el procesamiento de proteínas el cual es necesario para alcanzar su madurez biológica siendo determinantes para su funcionalidad final. Estos procesos en bacterias requieren estrictamente la escisión del grupo N-formilo de la metionina para que las enzimas procesadoras puedan reconocer y actuar procesando la proteína.

La PDF es una metaloproteasa esencial, está presente en todos los genomas de eubacterias estudiadas hasta la fecha y cataliza la escisión hidrolítica del grupo N-formilo en todos los polipéptidos recién sintetizados. Es uno de los blancos bioquímicos mejor caracterizados y validados en la búsqueda de nuevos agentes para tratar las infecciones de tipo bacteriano de amplio espectro. El incremento continuo de resistencia a antibióticos incluyendo la aparición de resistencia a múltiples fármacos en patógenos comunes, ha creado la necesidad de búsqueda de nuevos antibióticos con nuevos mecanismos de acción. La traducción de proteínas bacteriana y la eucariótica mitocondrial comparten componentes y mecanismos comunes con lo que este proceso también constituye en patógenos eucarióticos una atractiva diana terapéutica. Es de esperar que las diferencias en cuanto a estructura y secuencia sean explotables desde un punto de vista quimioterapéutico.

Estudios recientes en *P. falciparum* han confirmado la esencialidad de la PDF en estos organismos y se ha demostrado que inhibidores experimentales de la PDF inhiben el crecimiento intraeritrocítico, apuntando a la PDF como un novedoso blanco terapéutico para el diseño de fármacos antimaláricos.

En el caso de los tripanosomátidos, existen dos homólogos de PDFs bacterianas, lo que sugiere que la maquinaria para la deformilación o escisión de metionina está presente en estos organismos. En definitiva, es posible que los procesos de deformilación y modificación post-traduccionales tengan una relevancia fundamental en el metabolismo de orgánulos de tripanosomátidos y que las PDFs constituyan una interesante diana para el diseño de inhibidores selectivos.

MATERIALES Y MÉTODOS

MATERIALES Y MÉTODOS

B.I. MATERIALES

B.I.1. LÍNEAS CELULARES

B.I.1.1. Parásitos

Los parásitos protozoos utilizados pertenecen a la subespecie de *T. brucei brucei* que causa la tripanosomiasis africana en animales. En este trabajo se han utilizado dos líneas celulares:

***T. brucei brucei* 449:** línea celular de la forma procíclica 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 RNAi 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* S16:** línea celular de la forma sanguínea 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^qZΔM15 Tn10 (Tet^r)]

BL21(DE3) (Phillips et al. 1984) F⁻ dcm, ompT, hsdS (r_B⁻ m_B⁻)gal λ, **BL21(DE3)** pLysS F⁻ dcm, ompT, hsdS (r_B⁻ m_B⁻)gal λ (DE3) [pLysS Cam^r](Studier 1991)

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 procíclicas de *T. brucei brucei*. El SDM-79 fue preparado a partir de 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).

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

Tabla B.I.1. Componentes del medio SDM-79. Todos los productos fueron adquiridos de la casa comercial Sigma

Una vez disueltos 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 se enriquece 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 sanguíneas de *T. brucei brucei*. Es preparado a partir de Iscoves Modified Dulbeccos Media (IMDM) (Gibco), suplementado con los productos indicados en la tabla B.2.

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

Tabla B.I.2. Componentes del medio HMI-9. Todos los productos fueron adquiridos de la casa comercial Sigma

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.

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 verticillus*, 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 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$).

Higromicina B (Sigma)

La higromicina es un antibiótico glucopeptídico aislado de *Streptomyces hygroscopicus*, que inhibe la síntesis de proteínas. 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 del 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 procariotas como eucariotas, mediante la inhibición de la unión del péptido a la maquinaria ribosomal. Es utilizado como marcador de selección de parásitos transfectados con el vector pGR12 (Clayton et al. 2005) o con el vector pHD887KO1B en *T. brucei brucei* 449 (10 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) y en *T. brucei brucei* S16 (5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$).

Puromicina (Sigma)

La puromicina es un antibiótico nucleósido-peptídico aislado de *Streptomyces alboniger*. Inhibe la síntesis de proteínas, tanto en organismos procariotas como

eucariotas mediante su asociación al ribosoma y provocando una terminación prematura de la síntesis del polipéptido. Es utilizado como marcador de selección de parásitos transfectados con el vector pGR11 el cual, en este trabajo, contiene una copia de PDF-1 de *T. brucei* cuya expresión es inducible en presencia de doxiciclina

Doxiciclina (Sigma)

La doxiciclina es un derivado de la tetraciclina que inhibe la síntesis de proteínas por su unión irreversible al ribosoma, bloqueando la unión del tRNA aminoacilado al RNAm. Es utilizado para inducir la transcripción de todos los plásmidos que contengan el represor de tetraciclina. En este trabajo se ha utilizado para inducir el RNAi de PDF-1, PDF-2 Y MTF y la expresión de la copia ectópica de la PDF-1 de *T. brucei* para los estudios de doble reemplazo alélico condicionado. En todos los casos, la doxiciclina ha sido utilizada a $1 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$.

•Otros compuestos

Oligomicina (Sigma)

Es un inhibidor de la síntesis de ATP a través de su asociación al complejo de la ATP sintetasa mitocondrial reconociendo de manera específica el componente Fo. Este compuesto se utilizó para estudiar la posible hipersensibilidad de células de *Trypanosoma brucei* donde se han reducido los niveles de PDF-1.

Actinonina (Sigma)

Es un inhibidor de leucina aminopetidases y de la péptido deformilasa de bacterias, plantas, *Plasmodium spp* y humanos. Se utilizó en ensayos enzimáticos de la PDF de *E. coli* y de la PDF-1 recombinante de *Trypanosoma cruzi* así como en estudios de inhibición de la proliferación de la forma sanguínea y procíclica de *Trypanosoma brucei*.

Ketoconazol (Sigma)

Es un inhibidor conocido de la biosíntesis de esteroides a nivel de la 14α -desmetilasa. Se utilizó para estudiar la posible hipersensibilidad a este tipo de compuesto de parásitos de la forma procíclica de *Trypanosoma brucei* donde se han disminuido los niveles de PDF-1.

Terbinafina (Sigma)

Es un inhibidor de la biosíntesis de esteroides que actúa a nivel de la escualeno epoxidasa. Se utilizó para estudiar la posible hipersensibilidad a este tipo de compuestos de parásitos de la forma procíclica de *Trypanosoma brucei* donde se han disminuido los niveles de PDF-1.

B.I.2.1.2. Bacterias**Medio líquido LB (Luria-Bertani) (Sambrook et al. 1989)**

Este medio contiene 10 g/l de triptona, 5 g/l de extracto de levadura y 5 g/l de NaCl. El medio sólido además contiene 15 g/l de bacto-agar. Para asegurar la existencia de una población homogénea, los cultivos líquidos de *E. coli* proceden de una colonia aislada en medio de cultivo sólido. El cultivo líquido de *E. coli* se incubó a 37°C con agitación. Las bacterias también crecieron en medio sólido de LB al 1,5% de agar. Además, el medio se suplementó con el antibiótico adecuado según la resistencia que confiera el plásmido que transporta la bacteria.

•Antibióticos**Ampicilina (100 µg/mL) (Roche Molecular Biochemicals)**

Se utilizó para seleccionar las bacterias portadoras de plásmidos que contienen el gen de la β-lactamasa. El producto de este gen confiere resistencia al antibiótico.

Cloranfenicol (34µg/mL) Merck)

Las bacterias *E. coli* BL21 (DE3) pLysS contiene un plásmido que confiere resistencia al cloranfenicol. Este antibiótico se utilizó para rescatar este fenotipo.

•Otros compuestos**Isopropil-β-D-tio-galactopiranosido (IPTG)(Roche)**

Se adicionó al medio de cultivo de bacterias transformadas con plásmidos que poseen el sistema de selección del operón *lac*. El IPTG inactiva el producto del gen *lacI* (repressor del operón *lac*) e induce la expresión del gen *lacZ* que codifica a la β-galactosidasa. En el *polylinker* de estos plásmidos se localiza el gen *lacZ*, de manera que cuando se clonan fragmentos de DNA se interrumpe su expresión.

5-bromo-4-cloro-3-indol- β -D-galactopiranosido (Xgal)(Roche)

Este compuesto es reconocido por la β -galactosidasa, dando lugar a un producto azulado. El color de las colonias bacterianas en el medio de cultivo con IPTG y Xgal permite seleccionar bacterias recombinantes positivas y negativas.

CoCl₂ (Cloruro de cobalto) (Sigma).

Esta solución se añade a los cultivos bacterianos inducidos con IPTG que sobreexpresan la PDF recombinante y suministra el catión metálico necesario para la expresión y estabilidad óptima de la proteína.

NiCl₂ (Cloruro de níquel) (Sigma), CuCl₂ (Cloruro de cobre) (Sigma), MnCl₂ (Cloruro de manganeso)(Sigma), MgCl₂ (Cloruro de magnesio) (Sigma),

Estas soluciones junto con la de cloruro de cobalto se utilizaron para los estudios enzimáticos de la influencia de la identidad del catión metálico en la actividad deformilasa de la PDF-1 de *Trypanosoma cruzi*.

•Inhibidores de metaloproteasas comerciales y agentes quelantes de iones.**Acido-2,2',2'',2'''-(ethane-1,2-diyl)dinitrilo) tetraacético (EDTA) (Bio Rad)**

Es un ácido carboxílico poliamínico capaz de asociarse con diferentes tipos de cationes metálicos, formando complejos a través de sus grupos amino y carboxilato. Esta característica le permite funcionar como un agente quelante y como un inhibidor de metaloproteasas en general. Esta propiedad se utilizó para determinar el efecto de la eliminación de cationes metálicos sobre la actividad deformilasas de la PDF de *E. coli* y de la PDF-1 de *T. cruzi*.

1,10-fenantrolina (Fenantrolina) (Sigma)

Es un compuesto heterocíclico que también tiene la capacidad de formar complejos con iones metálicos actuando como inhibidor de metaloproteasas general. En este estudio también se utilizó para determinar el efecto del secuestro o sustracción de cationes metálicos sobre la actividad deformilasa de la PDF recombinante de *E.coli* y de *T. cruzi*.

N-[(2S,3R)-3-Amino-2-hidroxi-4-fenilbutiril]-L-leucina-HCl (Bestatina) (Sigma)

Es un inhibidor de metaloproteasas selectivo para aminopeptidasas, específicamente es un inhibidor competitivo de aminopetidases. Se empleó para determinar su potencial efecto inhibitorio sobre la PDF recombinante de *E. coli* y de *T. cruzi*.

N-[4-(4-Morfolinil)butil]-2-benzofurancarboxiamida (CL-82198) (Sigma)

Es un inhibidor selectivo de metaloproteasas de la matriz extracelular MMP-13. Se empleó para determinar sus efectos sobre la actividad de la PDF bacteriana y la PDF-1 de *T. cruzi*.

N-(1a,5a,6a)-3-Azabicyclo[3.1.0]hex-6-il-ácido carbámico 1,1-dimetil ester (CP-101537) (Sigma)

Es un inhibidor de metaloproteasas de la matriz extracelular actualmente en ensayos clínicos como antibacteriano. También fue empleado para determinar sus efectos sobre la actividad de formilasa de la PDF bacteriana y la PDF-1 de *T. cruzi*.

B.I.3 TAMPONES Y SOLUCIONES

Tabla B.I.3.

TAMPÓN/SOLUCIÓN	COMPOSICIÓN
TBE 1X (Sambrook et al. 1989)	Tris-borato 0.089 M, ácido bórico 0.089 M, EDTA 0.002 M (pH 8.0)
TAE 1X (Sambrook et al. 1989)	Tris-Acetato 0.04 M, EDTA 1 mM (pH 8.0)
PBS 1X (tampón fosfato salino) (Sambrook et al. 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 et al. 1989)	MOPS 0.2 M, pH 7.0, acetato sódico anhidro 0.08 M, EDTA 0.01 M. Esterilizado por filtración.
SSC 20X (Sambrook et al. 1989)	NaCl 3 M, citrato sódico 0.3 M (pH 7.0).
Tampón A para purificación de la enzima PDF-1 y PDF-2	Tampón fosfato sódico 20 mM pH 7.4, NaCl 0.5 M Imidazol 20mM, β-mercaptoetanol 10mM, Tween 20 0.1%, cóctel de inhibidores de proteasas.
Tampón B para purificación de la enzima PDF-1 y PDF-2	Tampón fosfato sódico 20 mM pH 7.4, NaCl 0.5, M Imidazol 1 M,

TAMPÓN/SOLUCIÓN	COMPOSICIÓN
Tampón A para purificación de la enzima PDF-1 y PDF-2 en condiciones denaturalizantes	Tampón fosfato sódico 20 mM pH 7.4, NaCl 0.5 M Imidazol 20mM, Urea 8M
Tampón A para purificación de la enzima PDF-1 y PDF-2 en condiciones denaturalizantes	Tampón fosfato sódico 20 mM pH 7.4, NaCl 0.5 M Imidazol 1 M, Urea 8M
Tampón de medida de actividad de formilasa	Tampón fosfato de potasio 50mM, pH 7.5
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 et al. 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 and 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.3. MATERIAL PARA BIOLOGÍA MOLECULAR

B.I.3.1. Vectores

pET-22b+ (Novagen). Vector de expresión de 5493 pb utilizado para clonar los genes correspondientes a la PDF-1 y PDF-2 de *T. cruzi*, *T. brucei*, *L. major*, así como la PDF de *E. coli*, permitiendo la sobreexpresión en un sistema bacteriano de la proteína correspondiente. Este vector incorpora una porción de 6 histidinas en la región carboxilo terminal que facilita la purificación de la proteína por cromatografía de afinidad a níquel a través de un gradiente de elución de imidazol.

pGEM-T (Promega). Vector de 3000 pb que se utiliza como vector de amplificación para clonar fragmentos de DNA obtenidos por PCR.

pGR19 (Clayton et al. 2005) Vector de 6788 pb utilizado para el silenciamiento génico 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).

pGR12 (Clayton et al. 2005) Vector de 5756 pb también utilizado para el silenciamiento génico mediante la técnica de RNA de interferencia. El marcador de selección que presenta es el del gen de resistencia a blasticidina (BSD).

pGR11 (Haile et al. 2003) Plásmido de 6850 pb el cual contiene un fragmento de integración al locus de RNA ribosomal así como el gen de resistencia a puromicina. Este plásmido se utilizó para expresar una copia ectópica de la PDF-1 de *Trypanosoma brucei* inducible por tetraciclina bajo el control del promotor PARP.

pHD887 (Helfert et al. 2001) Plásmido de 4658 pb diseñado para las estrategias de doble “knock out”. Permite el reemplazo del gen de interés (en este caso la PDF-1 de *T.*

brucei) a través de la incorporación de las regiones UTR flanqueantes de la PDF-1 espaciadas por el gen de resistencia a blasticidina.

B.I.3.2. Oligonucleótidos

Todos los oligonucleótidos utilizados han sido sintetizados en los Servicios Técnicos del Instituto de Parasitología y Biomedicina “López-Neyra (tablas B.II.3. y B.II.4).

B.I.3.3. Sondas fluorescentes

MitoTracker Red CMXRos (Molecular Probes).

La incorporación y emisión de fluorescencia de esta sonda depende de la generación de un potencial mitocondrial estable. La intensidad de la fluorescencia es proporcional a la magnitud del potencial de membrana mitocondrial.

Rojo Nilo (Molecular Probes)

Es un colorante lipofílico capaz de asociarse de manera selectiva a lípidos neutros, como ésteres de colesterol, lipoproteínas y fosfolípidos. Esta asociación emite fluorescencia que puede ser visualizados por microscopio (Greenspan et al. 1985). Se utilizó para identificar la naturaleza de las inclusiones citoplasmáticas en *Trypanosoma brucei*.

Filipina (Sigma)

Es un antibiótico macrólido poliénico sintetizado por bacterias de la especie *Streptomyces filipinensis*. Forma complejos de manera específica y estequiométrica con el colesterol y esta asociación es detectable por microscopia de fluorescencia. (Robinson and Karnovsky 1980). Se utilizó para estudiar los posibles cambios en la distribución de ergosterol y colesterol a nivel de membrana así como para identificar la composición de las inclusiones citoplasmáticas observadas en las distintas líneas de *Trypanosoma brucei* generadas durante estos estudios.

B.I.4. 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 versión 4.0.2.

Cary WinUV Software.

1-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 versión 5.0, Molecular Dynamics.

Internet Explorer y Mozilla Firefox.

Isis Draw® versión 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 XP y Vista Microsoft.

Huygens Essential Deconvolution.

Praline alignment IBIVU, Universidad de Amsterdam

Sigma Plot® 8.0

Bases de datos consultadas:

GenBank: Secuencias de DNA y RNA (*Laboratory* Los Alamos, NM).

GeneDB: Búsqueda de secuencias en tripanosomátidos.

EMBL-EBI: Utilizada para la búsqueda y 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).

TriTryp: Búsqueda de secuencias en tripanosomátidos

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 tanto con la forma sanguínea como con la forma procíclica. Las líneas celulares de la forma sanguíneas de *T. brucei* fueron cultivadas a 37°C en un incubador con CO₂ en medio de cultivo HMI-9, complementado con un 10 % de suero bovino fetal (SBF) inactivado y certificado libre de tetraciclina. El mantenimiento en cultivo de los parásitos se lleva a cabo mediante una dilución cuando los parásitos se encuentran en la fase logarítmica de la curva de crecimiento, aproximadamente entre una densidad celular de 2.0-2.5 x 10⁶ parásitos·mL⁻¹. El tiempo de generación es de 8 horas por lo que la densidad inicial y el volumen, en el caso de la forma sanguínea, 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 procíclica de *T. brucei* fueron cultivadas a 28°C en medio de cultivo SDM-79, suplementado con un 10 % de suero bovino fetal (SBF)

inactivado y certificado libre de tetraciclina y 0.01 mM de hemina. El tiempo de generación generalmente es de 8 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 $1.0-2.0 \times 10^7$ parásitos·mL⁻¹. En este caso, la densidad inicial es importante porque no puede ser inferior a 4.0×10^5 parásitos·mL⁻¹. 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 del 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 and Beverley 1989). Se determinó la IC₅₀ de la oligomicina en la líneas celulares *T. brucei* S16 y *T. brucei* 449, correspondientes a la forma 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 oligomicina se iniciaron a una densidad celular de 5×10^3 parásitos·mL⁻¹. El recuento de parásitos se realizó cada 48 h en un contador de células *Coulter*[®] Z1 hasta que los cultivos alcanzaron la fase estacionaria de crecimiento. En el caso de *T. brucei* 449, la

determinación se llevó a cabo de la misma manera que en *T. brucei* S16 variando la densidad inicial del cultivo que fue de 0.2×10^6 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 de los valores de porcentaje de crecimiento frente a la concentración de fármaco.

B.II.1.1.4. 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 ($1.5-2.0 \times 10^7$ células·mL⁻¹). En primer lugar, se determina la densidad celular a la que se encuentra el cultivo y el volumen de cultivo necesario se centrifuga a $1000 \times g$ durante 10 min a 4 °C, se retira el sobrenadante y las células se lavan con PBS 1X (Tabla B.I.3.) 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. 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.3.) y las proteínas se desnaturalizan mediante calentamiento a 99°C durante 5 min y se enfrían 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)

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)

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 RNAm.

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.

Southern 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 clonación de los genes *PDF-1* y *PDF-2* de *Trypanosoma brucei*, *Leishmania major*, *Trypanosoma cruzi*. Diseño de truncamientos para expresión de la proteína en forma soluble

Las regiones codificantes correspondientes a las versiones nativas de los genes *PDF-1* y *PDF-2* de *Leishmania major*, *Trypanosoma cruzi* y *Trypanosoma brucei* fueron amplificadas por PCR a partir del DNA genómico correspondiente a cada una de estas líneas celulares empleando los pares de oligonucleótidos que están indicados en la tabla B.II.3. y B.II.4.

Para el diseño de truncamientos sistemáticos en la región amino o carboxilo terminal se procedió a realizar alineamientos con cada una de las secuencias

correspondientes a la PDF-1 y PDF-2 de *T. cruzi*, *L. major* y *T. brucei* frente a la secuencia de aminoácidos de *E. coli* (figura B.II.1.). En base a los alineamientos se diseñaron oligonucleótidos para obtener versiones a las que se les elimina un número determinado de aminoácidos del extremo amino sin comprometer los tres primeros aminoácidos que son esenciales para la actividad de la PDF bacteriana, ni los motivos conocidos de las PDFs los cuales son críticos para la catálisis (Figura B.II.1.)

Los truncamientos realizados fueron los siguientes.

Trypanosoma brucei: 10, 33 y 35 aminoácidos en el extremo amino y un doble truncamiento de 35 aminoácidos en el extremo amino más 42 aminoácidos del extremo carboxilo para la PDF-1. Truncamientos de 33 y 61 aminoácidos en el extremo amino terminal para la PDF-2

Leishmania major: 43, 44, 47, 51 aminoácidos en el extremo amino, 42 aminoácidos en el extremo carboxilo y un doble truncamiento de 44 aminoácidos en el extremo amino terminal mas 42 aminoácidos en el extremo carboxilo terminal para la PDF-1 y uno de 206 aminoácidos en el extremo amino terminal para la PDF-2.

Trypanosoma cruzi: 33 y 37 aminoácidos en el extremo amino terminal para la PDF-1 y 61 aminoácidos en el extremo amino terminal para la PDF-2.

El DNA amplificado de cada una de las versiones tanto nativas como truncadas se purificó mediante electroforesis en gel de agarosa y utilizando el kit *Illustra GFX™ PCR DNA and Band Purification* (GE Healthcare). Cada uno de los fragmentos correspondientes al gen PDF-1 y al gen PDF-2 se ligó directamente en el vector pGEM-T obteniéndose las distintas construcciones. Los fragmentos escindidos del plásmido anterior se ligaron en el vector pET22b+, previamente digeridos con las enzimas de restricción *NdeI* y *BamHI* y desfosforilado, obteniéndose las construcciones pET22b+PDF-1 y pET22b+PDF-2.

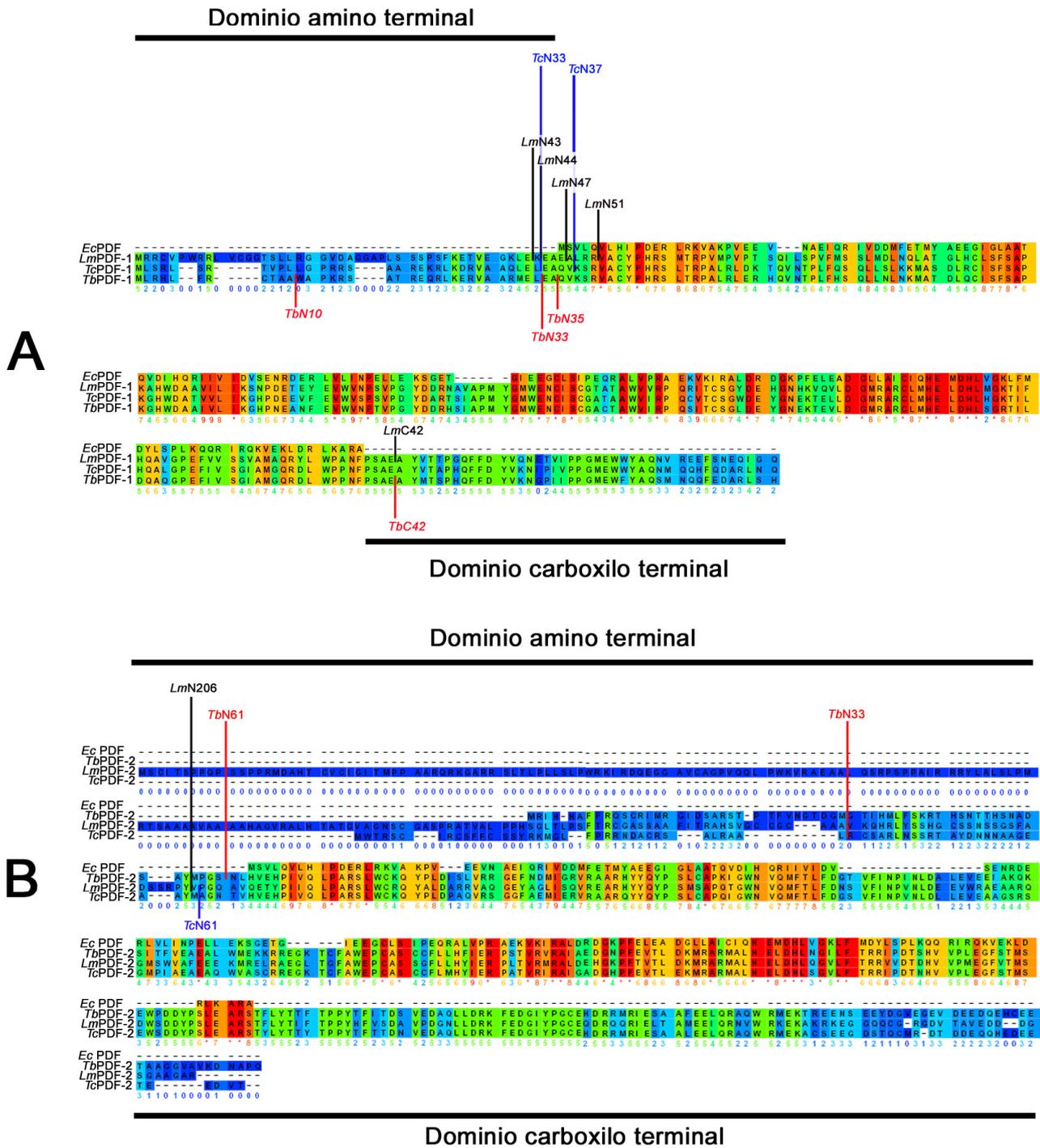


Figura B.II.1. Estrategia para la eliminación sistemática de aminoácidos en el extremo amino y/o carboxilo terminal de A) PDF-1 y B) PDF-2 de *L. major*, *T. cruzi*, *T. brucei*. Los alineamientos se hicieron frente a la PDF de *E. coli*.

Nombre	Secuencia	Sitios de restricción	Utilidad
<i>Tc</i> PDF-1 5'	GCC ATA TGC TGA GCC GTC TGT CAC GGA	<i>Nde</i> I	Clonación del gen <i>Tc</i> PDF-1 en pET22b+
<i>Tc</i> PDF-1 3'	GGA TCC CAT TGG TTC AGA CGA GCA TCC	<i>Bam</i> H I	Clonación del gen <i>Tc</i> PDF-1 en pET22b+
N33 <i>Tc</i> PDF-1	GCCATA TGGCGG AGG CGC AGG TGA AGT	<i>Nde</i> I	Clonación del gen Δ 33 <i>Tc</i> PDF-1 en pET22b+
N37 <i>Tc</i> PDF-1	GCC ATA TGG TGA AGT CCC GAG TGG CCT	<i>Nde</i> I	Clonación del gen Δ 37 <i>Tc</i> PDF-1 en pET22b+
<i>Tc</i> PDF-2 5'	GCC ATA TGT GGA CTC GAT CTT GTA TCC	<i>Nde</i> I	Clonación del gen <i>Tc</i> PDF-2 en pET22b+
<i>Tc</i> PDF-2 3'	GGA TCC CTC AAC GTG CCC TTC TGT GCA	<i>Bam</i> H I	Clonación del gen <i>Tc</i> PDF-2 en pET22b+
N61 <i>Tc</i> PDF-2	GCC ATA TGG CGG GAA ACA CGG TGC ACG	<i>Nde</i> I	Clonación del gen Δ 61 <i>Tc</i> PDF-2 en pET22b+
<i>Lm</i> PDF-1 5'	GCG ATA TGC GTC GCT GTG TGC CGT GGC	<i>Nde</i> I	Clonación del gen <i>Lm</i> PDF-1 en pET22b+
<i>Lm</i> PDF-1 3'	GGA TCC CAC TGT CCG ATT TGC TCG TTG	<i>Bam</i> H I	Clonación del gen <i>Lm</i> PDF-1 en pET22b+
N43 <i>Lm</i> PDF-1	CGCATATGGAGGCGGAG GCGCTCCGGC	<i>Nde</i> I	Clonación del gen Δ 43 <i>Lm</i> PDF-1 en pET22b+
N44 <i>Lm</i> PDF-1	CGC ATA TGA AGG AGG CGG AGG CGC TCC	<i>Nde</i> I	Clonación del gen Δ 44 <i>Lm</i> PDF-1 en pET22b+
N47 <i>Lm</i> PDF-1	CGC ATA TGG CGC TCC GGG TCG CTT GCT	<i>Nde</i> I	Clonación del gen Δ 47 <i>Lm</i> PDF-1 en pET22b+
N51 <i>Lm</i> PDF-1	CGC ATA TGG TCG CTT GCT ATC CTC ATC	<i>Nde</i> I	Clonación del gen Δ 51 <i>Lm</i> PDF-1 en pET22b+
C42 <i>Lm</i> PDF-1	GGA TCC TCG GCA GAC GGG AAG TTG GCG	<i>Bam</i> H I	Clonación del gen Δ C42 <i>Lm</i> PDF-1 en pET22b+

Tabla B.II.3

Nombre	Secuencia	Sitios de restricción	Utilidad
<i>LmPDF-2 5'</i>	CGC ATA TGT CTT GCA TCA CGT CTC CCC	<i>Nde</i> I	Clonación del gen <i>LmPDF-2</i> en pET22b+
<i>LmPDF-2 3'</i>	GGA TCC CAT CTG GCG CCA GCG GCG CCA CTG	<i>Bam</i> H I	Clonación del gen <i>LmPDF-2</i> en pET22b+
N206 <i>LmPDF-2 5'</i>	CGC ATA TGG CGG TGC AGG AGA CGT ACC	<i>Nde</i> I	Clonación del gen Δ 206 <i>LmPDF-1</i> en pET22b+
<i>TbPDF1 5'</i>	CAT ATG TTA CGG CAT TTG TTC CGA	<i>Nde</i> I	Clonación del gen <i>TbPDF-1</i> en pET22b+
<i>TbPDF1 3'</i>	GGATCCTTAGTGGCTCAG GCGAGCGTC	<i>Bam</i> H I	Clonación del gen <i>TbPDF-1</i> en pET22b+
N33 <i>TcPDF-1 5'</i>	CGCATATGGCTTGGGCC CAAAGCGG	<i>Nde</i> I	Clonación del gen Δ N33 <i>TbPDF-1</i> en pET22b+
N33 <i>TbPDF-1 5'</i>	CGCATATGCTTGAGGCAC AGGTAAATCA	<i>Nde</i> I	Clonación del gen Δ N33 <i>TbPDF-1</i> en pET22b+
N35 <i>TbPDF-1 5'</i>	CGCATATGGCACAGGTTA AATCACGAG	<i>Nde</i> I	Clonación del gen Δ N35 <i>TbPDF-1</i> en pET22b+
C43 <i>TbPDF-1 3'</i>	GCGGATCCACTGCAGAAG GGAAATTTGG	<i>Nde</i> I	Clonación del gen Δ C43 <i>TbPDF-1</i> en pET22b+
<i>TbPDF2 5'</i>	GCCATATGCGTATACATC ATGCATTC	<i>Nde</i> I	Clonación del gen <i>TbPDF-2</i> en pET22b+
<i>TbPDF2 3'</i>	GCGGATCCTGCTGAGGGG CGTTATCCTT	<i>Bam</i> H I	Clonación del gen <i>TbPDF-2</i> en pET22b+
N33 <i>TbPDF-2 5'</i>	CGC ATA TGT TAT TTT CGA AAC GAA CTC AC	<i>Nde</i> I	Clonación del gen Δ N33 <i>TbPDF-2</i> en pET22b+
N61 <i>TbPDF-2 5'</i>	CGC ATA TGA GCA ACG TCC ATG TTG AGC AC	<i>Nde</i> I	Clonación del gen Δ N61 <i>TbPDF-2</i> en pET22b+
<i>EcPDF 5'</i>	CGC ATA TGT CAG TTT TGC AAG TGT TAC	<i>Nde</i> I	Clonación del gen <i>EcPDF</i> en pET22b+

Tabla B.II.4

B.II.3.2. Aislamiento del gen *def* de *E.coli* y obtención de extractos bacterianos que sobreexpresan la proteína.

La región codificante correspondiente al gen *def* de *E. coli* fue amplificada por PCR a partir del DNA bacteriano con los pares de oligonucleótidos correspondientes y que están indicados en la tabla B.II.3. Esta versión se caracteriza por la eliminación de 18 aminoácidos del extremo carboxilo terminal. La proteína expresada con esta delección parece ser tan activa como la proteína nativa, pero es mucho mas estable (Meinzel et al. 1996).

B.II.3.2.1. Inducción de las proteínas recombinantes PDF-1 y PDF-2 de *Trypanosoma cruzi* y la proteína PDF de *Escherichia coli* 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. Una vez comprobada la ausencia de expresión con la proteína nativa, se procedió del mismo modo con las versiones truncadas de la PDF-1 y de la PDF-2 de *T. cruzi*, *L. major* y *T. brucei*. Finalmente, de todos los casos estudiados y descritos en el apartado anterior, la opción que presentó niveles óptimos de expresión correspondió a la versión a la cual se eliminaron 37 aminoácidos en el extremo N-terminal de la PDF-1 de *Trypanosoma cruzi* ($\Delta 37NTcPDF-1$) y la versión a la cual se eliminaron 61 aminoácidos en el extremo amino terminal de la PDF-2 también de *Trypanosoma cruzi* ($N\Delta 61TcPDF-2$). La expresión de $\Delta 37NTcPDF-1$ se llevó a cabo en células de *E. coli* BL21 (DE3) pLysS con la construcción pET22b⁺ $\Delta N37TcPDF-1$, mientras que la expresión de $N\Delta 61TcPDF-2$ se llevo a cabo en células BL21(D3) con la construcción pET22b⁺ $\Delta N61TcPDF-2$. Mientras que para expresar la $\Delta C18EcPDF$ se emplearon celulas BL21(D3). En todos los casos la inducción se encuentra bajo el control del promotor *T7lac*. Inicialmente, para cada caso, 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 en agitación. Posteriormente, una vez alcanzado la densidad óptima de crecimiento, se utilizó para inocular 10 mL de medio con ampicilina y se incubó toda la noche a 37°C. A la mañana siguiente el cultivo de 10 mL se utilizó para inocular 1 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. Para la expresión de $\Delta 37NTcPDF-1$ el cultivo se incubó 18 h para conseguir la mayor expresión de la proteína, mientras que para la

$\Delta N61TcPDF-2$ y $\Delta C18EcPDF$ fueron suficientes 5 horas de incubación a 37°C para un máximo nivel de expresión. En el caso de la PDF de *E. coli* el cultivo se incubó 5 horas a 37°C tiempo en el cual se alcanzó un máximo en los niveles de expresión. Para recoger las células el cultivo se centrifugó a 7000 x 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 pET22b⁺ $\Delta N37TcPDF-1$, pET22b⁺ $\Delta N61TcPDF-2$ y pET22b⁺ $\Delta C18EcPDF$ inducidas o no con IPTG se resuspendieron en tampón A (Tabla B.I.3.), al cual se le añadió una mezcla de inhibidores de proteasas. La suspensión de células se sonicó en frío 4 veces durante 30 seg 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.

Los niveles de expresión de $\Delta N37TcPDF-1$, $\Delta N61TcPDF-2$ y $\Delta C18EcPDF$ en ausencia o presencia de IPTG en ambas fracciones fueron verificadas en geles de poliacrilamida al 12% .

B.II.3.3. Purificación de la TcPDF-1 recombinante

B.II.3.3.1. Cromatografía de afinidad a níquel

La incorporación de seis residuos de histidina a través del clonaje del gen de la $\Delta N37TcPDF-1$ en el vector pET22b⁺, permite utilizar la afinidad de este aminoácido por el níquel para facilitar la purificación de la proteína sobreexpresada a partir de extractos proteicos totales. Para ello se utilizaron columnas HiTrap[®] cargadas con níquel controlada por un sistema de cromatografía líquida en un equipo FPLC Pharmacia Biotech. El proceso de absorción de las proteínas a la columna se basa en la interacción de la región de seis de histidinas con la resina. Para la preparación de la columna se utilizó una solución de NiCl₂ 100 mM. La columna se equilibró con 4 volúmenes de tampón A (tabla B.I.3.), a continuación 4 volúmenes de tampón B para eluir cualquier exceso de níquel y nuevamente 4 volúmenes de tampón A (tabla B.I.3.) antes de proceder a aplicar el extracto total de proteínas. El extracto soluble de proteínas obtenido de las células inducidas se diluyó a una concentración de 4.0 mg·mL⁻¹ en tampón A (Tabla B.I.3.) en un volumen de 40mL y se cargó en la columna. A

continuación se procedió a realizar un gradiente escalonado de imidazol con el tampón B (Tabla B.I.3.) sin variar el flujo. Durante la elución se fueron tomando alícuotas de 2 mL y se midió la concentración para determinar en que fracciones se había eluido la proteína. La fracción donde se obtuvo la PDF-1 de mayor grado de pureza corresponde a 150-170 mM de imidazol. Estas fracciones fueron concentradas con Microsep 10K Omega (Pall) y cambiadas de tampón con una columna PD10 al búfer final HEPES 50mM, pH 7.4 con un 10% sorbitol y almacenada a -80°C hasta su posterior utilización.

B.II.3.3.2. Purificación de las proteínas recombinantes PDF-1 y PDF-2 de *Trypanosoma cruzi* a partir de cuerpos de inclusión

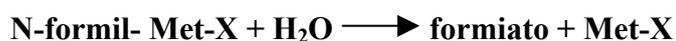
Para la obtención de las proteínas $\Delta\text{N}37\text{TcPDF-1}$ y $\Delta\text{N}61\text{TcPDF-2}$ en las cantidades necesarias para llevar a cabo las inmunizaciones para la obtención de anticuerpos policlonales, se procedió a la purificación a partir de extractos totales bacterianos, ya que la proteína sobreexpresada se concentraba mayoritariamente en cuerpos de inclusión. Para ello se procedió del mismo modo descrito en el apartado anterior, pero los extractos totales se prepararon con tampón A + Urea 8M (Tabla B.I.3., tampón UA) y la elución se realizó del mismo modo pero empleando tampón B + Urea 8M (Tabla B.I.3., tampon UB).

La muestra resultante purificada se utilizó para inmunizar un conejo, eliminando previamente la urea 8M, que resulta muy tóxica. Para ello se cambió el tampón empleando una columna PD10 y se resuspendió en PBS 1x estéril.

B.II.3.4. Caracterización cinética de la proteína recombinante PDF-1 de *Trypanosoma cruzi*

B.II.3.4.1. Determinación de la actividad deformilasa

El método empleado para la determinación de la actividad deformilasa se describe detalladamente por Lazennec y colaboradores (Lazennec and Meinnel 1997). Este método considera el formiato, el cual constituye el principal producto de la hidrólisis de péptidos formilados por parte de la PDF:



La liberación de formiato ligada a esta reacción se puede aprovechar en la práctica para medir la actividad deformilasa acoplándolo a la reacción de la formiato deshidrogenasa en presencia de NAD^+ lo que conduce a un incremento de absorbancia debido a la producción de NADH que es detectado a una longitud de onda de 340 nm. Usando este procedimiento la actividad puede ser medida directamente en función del tiempo a través del incremento en la absorbancia a 340nm



Una vez acoplado a la reacción de la formiato deshidrogenasa, la velocidad de deformilación de un sustrato por la PDF es directamente proporcional a la producción de NADH. A partir de los valores de incremento de absorbancia (ΔAbs) obtenidos se puede determinar la concentración $[\text{C}]$ de producto en cada tiempo utilizando la ecuación:

$$[\text{C}] = (\Delta\text{abs}/\text{min}) / \epsilon_M \cdot d$$

donde $\epsilon_M = 6220 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ es el coeficiente de extinción molar para el NADH a 340 nm, $d=1\text{cm}$ y con este valor se puede determinar la velocidad de formación de NADH por unidad de tiempo:

$$v = [\text{C}]/\text{mg prot}$$

la cual viene expresada en unidades de moles/min/mg de proteína.

Los ensayos de actividad deformilasa se realizaron en un volumen final de 200 μl , en tampón fosfato potásico 50 mM pH 7.5, NAD^+ 12 mM, 0.2 U/ μL de formiato deshidrogenasa.

B.II.3.4.2. Efecto de la concentración de enzima sobre la actividad deformilasa de la PDF-1 de *Trypanosoma cruzi*

Para establecer el rango de linealidad de la actividad deformilasa con respecto a la concentración de enzima, se ensayó la reacción con 1, 2, 5, 10, 20 y 40 μg de proteína recombinante purificada a una concentración de sustrato de 20 mM.

B.II.3.4.3. Determinación de la K_m y la v_{max} para el sustrato formil-metionil-alanil-serina (f-MAS)

Los ensayos de determinación de K_m y v_{max} para el sustrato se realizaron a concentraciones de enzima constantes, utilizando en todos los casos 20 μg de proteína recombinante purificada. Para el sustrato formil-metionil-alanil-serina, se ensayaron concentraciones comprendidas entre 1 y 40 mM.

Para el caso de la N Δ 37TcPDF-1 de *Trypanosoma cruzi* los valores obtenidos se ajustan a un comportamiento sigmoidal lo que permite expresar el comportamiento cinético en términos de cooperatividad mediante la siguiente ecuación:

$$v = \frac{V a^{nh}}{K_{0.5}^{nh} + a^{nh}}$$

que corresponde a la ecuación de Hill, donde el parámetro V es el equivalente de la velocidad limitante en la ecuación de Michaelis-Menten. $K_{0.5}$ es el equivalente de la K_m de la ecuación Michaelis Menten y define el valor de la concentración de sustrato a la cual se alcanza la mitad de la velocidad máxima (0.5) y nh es el coeficiente de Hill y representa una medida del grado de cooperatividad del sistema. Si $nh > 1$ estamos ante un sistema con cooperatividad positiva, si $nh < 1$ el sistema presenta una cooperatividad negativa y si nh es la unidad no hay cooperatividad.

La ecuación de Hill puede ser escrita de la siguiente forma:

$$v = \frac{Va^{nh}}{K + a^{nh}}$$

y se reordena como sigue

$$v/V-v = \frac{anh}{K^{nh}_{0.5}}$$

y aplicando logaritmos la ecuación se convierte en:

$$\text{Ln}[v/V-v] = nh \text{Ln} a - nh \text{Ln} K_{0.5}$$

que también se conoce como la forma lineal de la ecuación de Hill. Se pueden representar los valores de $\text{Ln}[v/V-v]$ frente a $\text{Ln} a$ lo cual da una recta con una pendiente que es nh . Los datos generados a partir de los distintos registros obtenidos en el espectrofotómetro se ajustaron a la ecuación integrada de Hill empleando el programa Sigma Plot[®] 8.0.

B.II.4. TÉCNICAS INMUNOLÓGICAS

B.II.4.1. Obtención de anticuerpos policlonales frente a la $\Delta N37TcPDF-1$ y $\Delta N61TcPDF-2$ de *Trypanosoma. cruzi*

B.II.4.1.1. Inmunizaciones

Para la obtención de anticuerpos policlonales frente a la $\Delta N37TcPDF-1$ y la $\Delta N61TcPDF-2$ de *T. cruzi* se utilizó proteína purificada. Las inmunizaciones se realizaron en conejos 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 los conejos fueron inmunizados mediante inoculaciones por vía subcutánea con las proteínas recombinantes purificadas $\Delta 37TcTcPDF-1$ y $\Delta 61TcTcPDF-2$. 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 las proteínas PBS 1X y adyuvante incompleto de

Freund. Transcurrida una semana de cada inmunización, se extrajeron \approx 20 mL de sangre del conejo excepto en la última extracción donde se desangró al animal (\approx 75 mL).

B.II.4.1.2. Obtención de sueros

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 x 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.4.2. 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 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 preparada para llevar a cabo la inmunodetección con un anticuerpo.

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 1:2000 para los anticuerpos frente a las proteínas en solución de bloqueo (leche en polvo 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.5. ESTUDIO DE LA LOCALIZACIÓN INTRACELULAR DE LA PDF-1 y PDF-2 DE *Trypanosoma brucei*.

B.II.5.1. Inmunofluorescencia

Las inmunofluorescencias se llevaron a cabo utilizando cultivos de parásitos de la forma procíclica 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 2×10^8 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 quedan 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 Igepal al 0.1 % en solución de lavado durante 20 min, se lavaron dos veces y se incubaron durante 30 min con solución de bloqueo (PBS 1X pH 7.2-Tween[®] 20 0.2 %-BSA 1.5 %). Las preparaciones se incubaron tanto para el anti-ΔN37TcPDF-1 así como para el antiΔN61TcPDF-2 durante 1 h con diluciones 1:250 y 1:500 preparadas en solución de bloqueo, utilizándose como control la misma dilución de suero pre-inmune. 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 seis 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.).

Para los estudios de inmunofluorescencia empleando el anticuerpo frente a la subunidad F1 de la ATP sintetasa, HMGC_oAS, el procedimiento fue básicamente el mismo. Para estos anticuerpo se emplearon diluciones 1:1000 y 1:2000, respectivamente.

B.II.6. SILENCIAMIENTO MEDIANTE RNAi DE LA EXPRESIÓN DE LA PDF-1 y PDF-2 EN LA FORMA PROCICLIA Y SANGUÍNEA DE *Trypanosoma brucei*

El RNA de doble cadena que desencadena el fenómeno del silenciamiento génico se generó utilizando una estructura tallo-lazo también conocida como estrategia “stuffer” (Shi et al. 2000) y 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 PARP de *T. brucei*. Las secuencias complementarias al formar la doble cadena de RNA adoptan una estructura tallo-lazo.

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

Para el silenciamiento de la PDF- 1 de *T. brucei* se utilizó un fragmento de 415 pares de bases correspondiente a la posición 68 a 483 de la secuencia codificante del gen. En el caso de la PDF-2 de *T. brucei* se seleccionó un fragmento de 805 pares de base correspondiente a la posición 226-1017 del gen codificante. La amplificación se llevó a cabo a partir del plásmido pGEMT-*Tb*PDF-1 y del plásmido pGEMT-*Tb*PDF-2 con la Pwo DNA polimerasa, utilizando los oligonucleótidos RNAi *Tb*PDF-1(5') y RNAi*Tb*PDF-1(3') en el caso de PDF-1 y RNAi*Tb*PDF-2(5') y RNAi*Tb*PDF-2(3') en el caso de PDF-2 y que se muestran en la tabla B.II.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 *Ap*aI, 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 obtuvieron los plásmidos pGR19-*Tb*PDF-1 y pGR19-*Tb*PDF-2.

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

Para determinar el efecto del silenciamiento del gen de la PDF-1 y PDF-2 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 la forma sanguínea, tanto para la línea celular *T. brucei* S16pGR19-PDF-1 así como para *T. brucei* S16pGR19-PDF-2, se inoculó un cultivo de 10 mL a una densidad celular de 3.0×10^4 parásitos·mL⁻¹. A continuación se hicieron dos alícuotas, y a una de ellas se añadió doxiciclina como agente inductor del RNAi a una concentración de $1.0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. La densidad celular se midió cada 24 h utilizando un contador de células *ZI Coulter® Particle Counter*. Para evitar que el cultivo supere la fase logarítmica, cada 2 días se diluyen a la densidad inicial. De esta manera se obtiene una curva de crecimiento frente al tiempo, pudiendo determinar el efecto del RNAi sobre el crecimiento celular.

De manera semejante se estudió el efecto del RNAi en la forma procíclica donde se partió de una densidad de 0.2×10^6 parásitos·mL⁻¹.

B.II.6.3. Estudio del efecto de un doble silenciamiento de los genes de la PDF-1 y de la MTF en *Trypanosoma brucei*

B.II.6.3.1. Construcción de plásmidos para el silenciamiento génico mediante RNAi de la MTF

En primer lugar se llevó a cabo la construcción del plásmido para el RNA de interferencia para la MTF de *T. brucei*, mediante la estrategia de la estructura tallo-lazo. Para ello un fragmento de 559 pares de bases correspondiente a la posición 41-600 de la secuencia codificante de la MTF de *T. brucei* se amplificó por PCR usando los oligonucleótidos 5'MTF5' y 3'MTF (Tabla B.II.4.), a partir de DNA genómico de *T. brucei* 449 utilizando Pwo DNA polimerasa. Una alícuota del producto de PCR se digirió con las endonucleasas *HindIII* y *ApaI* 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 *BamHI* y se clonó en la construcción resultante anterior previamente digerida con *BamHI* y *HpaI*, quedando insertada en la

orientación opuesta a la del primer paso. Tras los dos pasos de clonación se obtuvo un plásmido denominado pGR19-MTF.

Un segundo plásmido se construyó para poder realizar el doble silenciamiento del gen de la PDF-1 y de la MTF de *T. brucei*. Para ello era necesario modificar el marcador de selección. Los plásmidos generados a partir del vector pGR19 presentan como marcador de selección la resistencia al antibiótico higromicina. En el nuevo plásmido se introdujo el marcador de resistencia a la blasticidina el cual esta presente en el vector pGR12. En primer lugar, el plásmido pGR19-MTF se digirió con *Hind* III liberándose un fragmento de DNA que contiene el fragmento del gen de la *MTF* utilizado para el RNAi clonado en ambos sentidos separados por la secuencia “stuffer”. Este fragmento se clonó en el vector pGR12 previamente digerido con *Hind*III para obtener el plásmido pGR12-MTF.

B.II.6.3.2. Estudio del efecto del RNAi de la MTF sobre la proliferación celular en la forma procíclica de *Trypanosoma brucei*

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

B.II.6.3.3. Estudio del efecto del doble RNAi de la TbpPDF-1 y la MTF sobre la supervivencia 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 PDF-1 y PDF-2, el cual se describe en detalle en el apartado B.II.6.2.

Tabla B.II.4

Nombre	Secuencia	Sitios de restricción	Utilidad
5'RNAi PDF1	GAGGATCCAAGCTTAAGG AGCGTGTGGCA	<i>Bam</i> H I <i>Hind</i> III	Clonación de fragmento del RNAi del gen TbPDF-1 en pGR19
3'RNAi PDF1	AACGGGCCCCGTACTCGTC CAAGCCACTAC	<i>Apa</i> I	Clonación de fragmento del RNAi del gen TbPDF-1 en pGR19
5'RNAi PDF2	GAGGATCCAAGCTTATAT GCCTGGCAGCA	<i>Bam</i> H I <i>Hind</i> III	Clonación de fragmento del RNAi del gen TbPDF-2 en pGR19
3'RNAi PDF2	AACGGGCCCCGTTGTAGTT CTTCAAACGCA	<i>Apa</i> I	Clonación de fragmento del RNAi del gen TbPDF-2 en pGR19
5'RNAi MTF	GCG GAT CCA AGC TTG TTT CTG AGC CAC AC	<i>Bam</i> H I <i>Hind</i> III	Clonación de fragmento del RNAi del gen TbMTF en pGR12
3'RNAi MTF	AAC GGG CCC GCG ATG TGA TCG ACT TGC GC	<i>Apa</i> I	Clonación de fragmento del RNAi del gen TbMTF en pGR12
5'UTR1	CGC GGC CGC GCA ACA CAA CAT TTT GTT TT	<i>Not</i> I	Clonación de la región UTR 5' de PDF-1
3'UTR1	GCC TCG AGG GAG GGA AGG GAC ACG TAT GG	<i>Xho</i> I	Clonación de la región UTR 3' de PDF-1
5'UTR2	TGA GGC CTG CTT GCT GTG CGT TTC TGT GT	<i>Stu</i> I	Clonación de la región UTR 5' de PDF-2
3'UTR2	GGC TAG CGC GGC CGC AAA ACC AAT AAA TA	<i>Not</i> I/ <i>Nhe</i> I	Clonación de la región UTR 3' de PDF-2
<i>Tb</i> CEPDF-1 5'	AAG CTT ATG TTA CGG CAT TTG TTC CGA TG	<i>Hind</i> III	Clonación del gen PDF-1 en pGR11
<i>Tb</i> CEPDF-1 3'	GGA TCC TTA GTG GCT CAG GCG AGC GTC	<i>Bam</i> H I	Clonación del gen PDF-1 en pGR11

Nombre	Secuencia	Utilidad
VCA8	GCA CTA GCC GTG TCA ACT CAC	Secuenciación de plásmidos pGR19 y PGR12
PDF-1Snd 5'	CGA GAA GAC TGA AGT ACT TGA TGG	Preparación de sonda de DNA de PDF-1
PDF-1Snd 3'	GTG GCT CAG GCG AGC GTC CTC	Preparación de sonda de DNA de PDF-1
PDF-2Snd 5'	CGC ATT GAA AGT GCT GCG TTT G	Preparación de sonda de DNA de PDF-2
PDF-2Snd 3'	CTA CTG AGG GGC GTT ATC CTT C	Preparación de sonda de DNA de PDF-2
MTFSnd 5'	GCG AGT GCC TAT TTG GTA AGG TCC CTG TT	Preparación de sonda de DNA de MTF
MTFSnd3'	GGC GTT GAT GGT TGG ACT GAA GTA CTC AC	Preparación de sonda de DNA de MTF
UPS UTR5'	CTA ACA TCG TAT GAG GCA TTT TTC ATT AG	Comprobación de reemplazo alelico con blasticidina o higromicina
DWN UTR3'	GGA TAG GCC GAC CGA TGA TCA ACA GTT TC	Comprobación de reemplazo alelico con blasticidina o higromicina
BLA5'	GCT ACA ATC AAC AGC ATC CCC ATC TCT GA	Comprobación de reemplazo alelico con blasticidina
BLA3'	TCA GAG ATG GGG ATG CTG TTG ATT GTA GC	Comprobación de reemplazo alelico con blasticidina
HYG5'	GCG CGA TTG CTG ATC CCC ATG TGT ATC AC	Comprobación de reemplazo alelico con higromicina
HYG3'	GTG ATA CAC ATG GGG ATC AGC AAT CGC GC	Comprobación de reemplazo alelico con higromicina

B.II.7. Doble reemplazo alélico condicionado del gen PDF-1 en la forma sanguínea de *Trypanosoma brucei*

Para estudiar la esencialidad de la PDF-1 en la forma sanguínea de *Trypanosoma brucei*, se llevo a cabo el reemplazo de los dos alelos del gen *TbPDF-1* por los genes de resistencia a blasticidina S transferasa (*BSD*) e higromicina fosfotransferasa (*HYG*). Previo a los reemplazos alélicos secuenciales, se incorporó una copia ectópica del gen PDF-1 bajo el control de un promotor inducible.

B.II.7.1. Construcción de plásmidos para el doble reemplazo alélico condicionado de PDF-1

Para la expresión de la copia ectópica de *TbPDF-1*, en primer lugar se diseñaron los oligonucleótidos para amplificar el marco de lectura abierto correspondiente al gen *TbPDF-1* (Tabla B.II.4.) el cual fue clonado en un plásmido de expresión dentro de los sitios *NdeI* y lo que permite la expresión regulada del gen correspondiente a partir del promotor prociclina sensible a tetraciclina y con el gen de resistencia a puromicina N-acetil transferasa (*PAC*) como fármaco de selección. El plásmido resultante fue llamado pGR11/CE-*TbPDF1* (Figura B.II.2.C).

Para reemplazar uno de los dos alelos del gen *TbPDF-1*, las regiones 5'-UTR y 3'-UTR fueron clonadas consecutivamente en los sitios de restricción del plásmido pHD887 flanqueando en posición 5' y 3' respectivamente el gen *BSD* de resistencia dando lugar a la construcción pHD887-*TbPDF1*-KO1B (Figura B.II.2.B). Finalmente, para reemplazar la segunda copia del alelo *TbPDF-1*, el marcador de selección (*HYG*) obtenido a partir del plásmido pGR19 por digestión con *SnaBI* fue subclonado en el pHD887-*TbPDF-1*-KO1B digerido con *SnaBI* reemplazando el gen de resistencia *BSD* y dando lugar a la construcción pHD887-*TbPDF-1*-KO2H (Figura B.II.2.A).

En primer lugar un fragmento de 702 bp correspondiente a la posición 69 y 771 de la región 5'-UTR (oligonucleótidos 5'UTR1 y 3'UTR1) y un fragmento de 333 bp correspondiente a la posición 22 a 355 pb de la region 3'-UTR (oligonucleótidos 5'UTR2 y 3'UTR2) que flanquean el marco abierto de lectura del gen *TbPDF-1* fueron amplificados por PCR a partir de DNA genómico de la cepa S16 de *Trypanosoma brucei*. Los oligonucleótidos fueron diseñados usando la secuencia depositada en la base de datos GeneDB y son indicados en la tabla B.II.4.

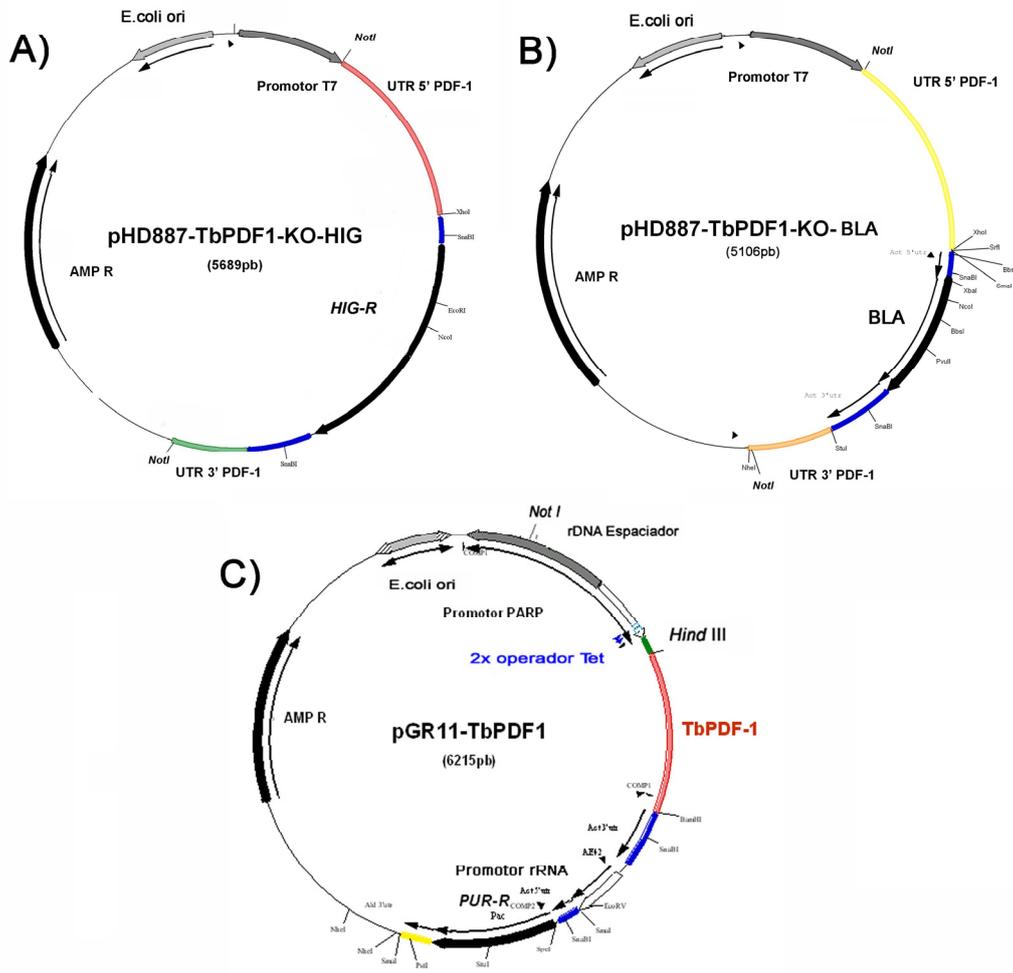


Figura B.II.2. Plásmidos empleados para el doble reemplazo alélico condicionado de PDF-1.

B.II.8. Transfección estable por electroporación

En el caso de las formas sanguínea de *T. brucei*, cultivos *in vitro* de la línea celular *T. brucei* S16 se crecieron hasta una densidad celular de $1.5-2.0 \times 10^6$ parásitos·mL⁻¹. El volumen necesario para recoger un número total de 2.4×10^7 parásitos por transfección se centrifugó a $1000 \times g$ durante 10 minutos a temperatura ambiente. A continuación, se retira el sobrenadante y las células se lavan con 40 mL de tampón de transfección Cytomix (Tabla B.I.1). 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. En el caso de los plásmidos diseñados para generar el RNAi, el DNA plasmídico aislado mediante el kit *Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System* (Promega) se digirió con la enzima de restricción *Not I*, se precipitó con etanol y finalmente se resuspendió en agua estéril a una concentración de $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$.

En el caso de los plásmidos utilizados para el doble reemplazo alélico, el plásmido fue digerido con la enzima *NotI*, generando un fragmento que contiene el marcador de selección flanqueado por las regiones UTR 5' y 3' del gen que se desea reemplazar. Este fragmento se purificó a partir de un gel de agarosa utilizando el kit *Illustra GFX™ PCR DNA and Band Purification* (GE Healthcare) y se precipitó con etanol y finalmente se resuspendió en agua estéril a una concentración de $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$. Posteriormente, 2.4×10^7 parásitos se mezclaron con $10 \mu\text{g}$ del plásmido digerido y se transfirieron a una cubeta de electroporación *Gene Pulser® Cuvette, 4mm gap* (Bio-Rad). Inmediatamente, se electroporaron en un sistema ECM 630 de BTX con las siguientes condiciones: 1.7 KV, 25Ω y $25 \mu\text{F}$. 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 dejan recuperar 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 forma procíclica de *T. brucei*, cultivos *in vitro* de la línea celular *T. brucei* 449 se mantuvieron varios días en fase logarítmica, recogiendo las células para transfectar a una densidad celular de $4.0-8.0 \times 10^6$ 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, se retira el sobrenadante y las células se lavan con 40 mL de tampón de transfección ZPFM frío (Tabla B.I.3.). Las células se recogen mediante centrifugación 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 µF. Después del pulso, las células se transfirieron a un frasco de cultivo con 12 mL de medio de cultivo SDM-79 con fleomicina y se incuban 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 9.0×10^6 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 harán diluciones 1:2 por columna hasta llegar a la última fila.

B.II.8.1. Estudio del efecto del RNAi de la PDF-1 y PDF-2 sobre la proliferación celular

Para determinar el efecto del silenciamiento del gen de la PDF-1 y de la PDF-2 sobre la proliferación 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 la forma sanguínea, tanto para la línea celular *T. brucei* S16 pGR19-PDF-1 así como como *T. brucei* S16pGR19PDF-2, 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 $1.0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. 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. De esta manera se obtiene una curva de crecimiento frente al tiempo, pudiendo determinar el efecto del RNAi sobre la proliferación celular.

De la misma forma se estudió el efecto del RNAi en la forma procíclica pero en este caso se partió de una densidad de 0.2×10^6 parásitos·mL⁻¹.

B.II.8.2. Análisis por *Northern blot*

Las muestras correspondientes a 50×10^6 parásitos fueron recolectadas por centrifugación y el RNA total fue aislado usando TRIzol[®]. Para el estudio de *Northern blot*, 10 µg del RNA total fueron corridos en un gel de 1% de agarosa/formaldehído/MOPS y transferido por capilaridad a una membrana de nylon Nytran (Schleicher&Schuel). El RNA es fijado a la membrana usando un transiluminador. Las sondas para el *Northern blot* fueron amplificadas por PCR y marcadas con el sistema de detección y marcaje directo Gene Images AlkPhos (GE Healthcare) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Como control de carga se utilizó la sonda SRP (Banda et al. 2001) y los análisis por densitometría de las señales generadas por las sondas fueron realizados usando el programa 1D-manager (TDI).

B.II.8.3. Análisis por *Southern blot*

Para los estudios de *Southern blot* el DNA genómico de *T. brucei* (1 µg) fue digerido con *SphI* y los productos de digestión fueron separados en un gel de agarosa y transferidos a una membrana Hybon-N (Amersham). La membrana fue hibridada toda la noche a 42°C con la sonda marcada correspondiente a la región UTR 5' de la PDF-1. La sonda unida fue detectada usando el sistema de detección y marcaje directo Genes Images AlkPhos (GE Healthcare).

B.II.9. Estudios de microscopía electrónica de transmisión

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.3) 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 µl 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 μm 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 Å de espesor en un ultramicrotomo Ultracut R de Leica. Los cortes se montaron sobre rejillas de níquel de malla 300.

B.III. Determinación del efecto combinado del RNAi y de los fármacos oligomicina, terbinafina y ketoconazol sobre la proliferación celular

El perfil de crecimiento de las diferentes las líneas celulares en presencia de estos fármacos se determinó para establecer el valor de IC_{50} . Las concentraciones utilizadas en los ensayos posteriores fueron seleccionadas en base a la determinación de la IC_{50} para cada uno de ellos, como se detalla en el apartado B.II.1.1.3.

B.III.1.1. Análisis mediante FACS y microscopía de fluorescencia de la función mitocondrial en la forma procíclica y sanguínea de *Trypanosoma brucei*

El efecto de la depleción de los niveles de PDF-1 y PDF-2 sobre el potencial de membrana mitocondrial en *Trypanosoma brucei* se estudió mediante citometría de flujo, empleando la sonda fluorescente Mitotracker Red CMXRos (Molecular Probes). Para los estudios en la forma procíclica, las muestras correspondientes a 2.0×10^6 parásitos se obtuvieron por centrifugación a $7000 \times g$ durante 1 min a temperatura ambiente y fueron resuspendidas en medio SDM-79 con Mitotracker a una concentración final de $1 \mu\text{M}$ durante 30 min a 28°C . Posteriormente las células fueron centrifugadas y resuspendidas en medio SDM-79 sin Mitotracker durante 30 min. Finalmente las células son centrifugadas de nuevo y lavadas dos veces con PBS 1X. Para el estudio del efecto de la depleción de los niveles de PDF-1 en la forma sanguínea se procedió del mismo modo que para la forma procíclica, pero las incubaciones se realizaron en medio HMI-9 a 37°C , al 5% CO_2 y a una concentración de Mitotracker de 100 nM. 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. Para su visualización al microscopio, una vez lavadas las células fueron fijadas en solución PBS1X al 4% de paraformaldehído y colocadas en un portaobjetos durante 20 min a temperatura ambiente, lavadas 6 veces con PBS1X y finalmente se realizó el montaje de las muestras tratadas con $3 \mu\text{l}$ de Vectashield con DAPI cubriéndolas con cubreobjetos y sellando las preparaciones con esmalte. Una vez seco el esmalte las muestras se conservaron protegidas de la luz y a 4°C hasta su observación. Las imágenes fueron obtenidas con un microscopio Zeiss Axiophot (Carl Zeiss, Inc.), utilizando el mismo tiempo de exposición para todas las muestras.

B.IV. Estudios sobre el metabolismo de lípidos de la forma procíclica de *Trypanosoma brucei*

B.IV.1.1. Extracción y cuantificación de ácidos grasos totales

Para la extracción de ácidos grasos totales se recogen 50×10^6 parásitos. Se lavan dos veces con PBS 1X (7000 rpm 1 min). El “pellet” de células se resuspende en 1% Triton X-100 en cloroformo puro y se solubiliza en un microhomogenizador. La suspensión resultante se centrifuga a 10 minutos a máxima velocidad. Se retira la fase

orgánica y se deja secar a 50 °C para evaporar el cloroformo. Al final los lípidos quedan suspendidos en un pequeño volumen que Triton X-100. La cuantificación del contenido de ácidos grasos totales se llevo a cabo utilizando el Kit *Biovision Free Fatty Acid Quantification*, empleando un espectrofluorómetro SpectraMax® Gemini EM con los valores de fluorescencia de Ex/Em= 535/590 nm en placas multipocillos.

B.IV.1.2. Marcaje metabólico con [³H]mevalonato

Las muestras correspondientes a 5×10^7 parásitos se resuspendieron en medio SDM-79 y fueron incubados con [³H]mevalonato ($50 \mu\text{Ci} \cdot \text{mL}^{-1}$) durante dos horas a 28°C en agitación. Tras la incubación las células fueron centrifugadas y lavadas dos veces con PBS1X y finalmente solubilizadas en 30 volúmenes de una mezcla cloroformo:metanol en una proporción 2:1 durante 120 hrs hasta el día de su análisis.

B.IV.1.3. Separación y caracterización de la fracción de lípidos neutros

Los parásitos recolectados por centrifugación a 2000 xg, se lavan 3 veces con PBS 1X. Los lípidos totales de las células se extrajeron con 30 volúmenes de una solución cloroformo:metanol 2:1 (v/v) durante un período mayor de 48 horas a 4°C. Seguidamente las muestras fueron filtrados en papel Whatman #1 Millipore Corp., Bedford, Mass y recogidas en un matraz de fondo redondo para luego ser secadas parcialmente en un roto evaporador (Butch modelo RE111). Las muestras resultantes se resuspenden en cloroformo para luego ser secadas en una atmósfera de nitrógeno y almacenados a -20°C hasta su posterior separación en fracción neutra y polar (Lorente et al. 2004; Urbina et al. 1995).

Para la separación de lípidos totales en una fracción neutra compuesta principalmente por esteroides, y en otra fracción polar compuesta mayoritariamente por fosfolípidos, se utilizó cromatografía en ácido silícico. El ácido silícico se activa durante 12 horas en una estufa a 100°C y se resuspende inmediatamente en cloroformo en una proporción 1:3 para un volumen de empaquetamiento de 3 mL aproximadamente. Las columnas se lavan con 4 volúmenes de cloroformo y posteriormente se añaden cada una de las muestras de lípidos totales. Para eluir los lípidos neutros se hacen pasar 4-5 volúmenes de cloroformo y nuevamente son concentradas y secadas repitiendo los pasos iniciales de deshidratación en atmósfera de nitrógeno para ser almacenadas a -20 °C hasta su posterior análisis por cromatografía en capa fina y cromatografía gas-

líquido. Para eluir los lípidos polares se hacen pasar por la columna 8 volúmenes de cloroformo-metanol (v/v). Estas fracciones se concentran y se almacenan a -20°C .

Para el análisis cualitativo inicial los lípidos neutros fueron separados por cromatografía en capa fina (TLC). El desarrollo se realizó en una cámara con atmósfera saturada dejando ascender la mezcla de solvente que conforma el eluyente (hexano 80: éter etílico 20: ácido acético:4. 2) La placa se reveló en una cámara saturada con yodo sublimado.

En el caso de lípidos procedentes de parásitos incubados con [^3H]mevalonato, las placas fueron divididas en diferentes regiones e identificadas en base a la posición de migración del marcador correspondiente. Estas zonas fueron raspadas y suspendidas en líquido de centelleo para cuantificar la radioactividad incorporada mediante un contador de centelleo Beckman Coulter TM.

B.IV.1.4. Separación, identificación y cuantificación de la fracción de lípidos neutros

La fracción de lípidos neutros, fue primero analizada por cromatografía gas líquido convencional (separación isotérmica en una columna de vidrio de 4 m con 3% OV-1 sobre chromosorb 100/200 mesh con nitrógeno como gas transportador a 24mL/min y un detector de ionización de llama).

Para análisis cuantitativos y asignaciones estructurales, los lípidos neutros fueron separados en una columna de alta resolución (columna Ultra-2 de 25 m por 0.20 mm de diámetro interno, 5% fenil-metil-siloxano, 0.33- μm película de espesor) en un cromatógrafo de gas Hewlett-Packard 6890 con un detector de masa HP5973A. Los lípidos fueron inyectados en cloroformo y la columna se mantuvo a 50°C durante 1 minuto. Posteriormente la temperatura se aumentó hasta 270°C a una velocidad de $25^{\circ}\text{C min}^{-1}$ y finalmente a $300^{\circ}\text{C min}^{-1}$. La temperatura del inyector fue de 250°C y el detector se mantuvo a 280°C .

La identificación del contenido de las muestras se realizó, tanto por la comparación del tiempo de retención de los compuestos con los tiempos de retención de patrones, como por espectros de masa característicos y comparando el patrón de ión molecular del lípido problema con una base de datos de patrones con estructuras conocidas. La cuantificación de estos lípidos se hizo integrando el área bajo la curva de cada pico en el cromatograma.

B.IV.2. Tinción con rojo Nilo y Filipina

Las células fueron recogidas por centrifugación, lavadas tres veces con PBS1X, resuspendidas a una densidad de 20.000 células/ μ L en paraformaldehído 4% en PBS1X y colocadas en una lámina cubierta con poli-L-lisina durante 20 minutos. Estas preparaciones fueron lavadas una vez e incubadas por separado bien sea con rojo Nilo 5 μ g/mL en solución de acetona o Filipina durante 30 minutos. Las láminas fueron lavadas tres veces con PBS1X y montadas con Vectashield-DAPI en el caso de rojo Nilo y Vectashield en el caso de Filipina. La adquisición de imágenes digitales fue llevada a cabo con un microscopio Zeiss Axiophot (Carl Zeiss, INC).

OBJETIVOS

C. OBJETIVOS

Las enfermedades parasitarias constituyen en la actualidad un importante problema de salud pública a nivel mundial. La pronunciada toxicidad, el elevado coste y la aparición de resistencia a los fármacos que actualmente se emplean para el tratamiento ponen de manifiesto la urgente necesidad de desarrollar nuevos compuestos más eficaces. A pesar de su elevada incidencia e impacto económico y social y a la gran cantidad de información generada sobre la bioquímica y la genética de los organismos causantes el desarrollo de nuevos fármacos ha sido poco productivo.

T. brucei presenta un ciclo de vida digenético que está asociado a cambios drásticos a nivel morfológico, especialmente a nivel de orgánulos, específicamente en la mitocondria donde se refleja la modulación del metabolismo energético. La forma sanguínea del hospedador vertebrado, que es la forma clínicamente relevante, depende de la función esencial que se desarrolla en la mitocondria. Dicha función es dependiente de una proteína codificada en el genoma de este orgánulo que requiere un procesamiento post-traducciona l en el cual debe estar implicada la péptido deformilasa (PDF). Aunque la mitocondria ha perdido durante la evolución muchas funciones, aún mantiene características como la formilación de la metionina para la iniciación de la síntesis de proteínas organelares. Estas reacciones son esenciales en muchos microorganismos y plantas y toda la maquinaria metabólica necesaria para este procesamiento está presente en el genoma de eucariotas, incluidos *Trypanosoma spp.* Estos procesos podrían constituir dianas para el diseño de fármacos con mecanismos de acción novedosos.

Aunque el gen de la PDF está presente en el genoma humano y parece ser funcional, diversos estudios apuntan a que existen diferencias importantes entre la PDF humana y la bacteriana. Esta posibilidad se podría extender al caso de las PDFs de tripanosomátidos.

El objetivo por tanto de esta Tesis Doctoral ha sido profundizar en el papel biológico de las PDFs en tripanosomátidos y avanzar en el conocimiento del procesamiento post-traducciona l de proteínas codificadas por el genoma mitocondria l estableciendo el impacto que tiene la operatividad de este proceso en la supervivencia

celular. En este trabajo, los estudios de esencialidad de genes por manipulación genética mediante RNAi se han llevado a cabo en *Trypanosoma brucei*, ya que las técnicas que permiten aplicar esta metodología están desarrollados en este organismo. En base a las semejanzas bioquímicas de los distintos géneros de la familia *Trypanosomatidae*, estos resultados se pueden extrapolar a otros miembros de esta familia.

Para cumplir con este propósito, el desarrollo del trabajo se ha llevado a cabo en base a los siguientes objetivos específicos:

- 1.- Aislamiento y caracterización de los genes PDF-1 y PDF-2 de *Trypanosoma brucei*, *Leishmania major* y *Trypanosoma cruzi*.
- 2.- Establecimiento de un sistema de expresión de proteína recombinante soluble y desarrollo de la metodología para la obtención de proteína purificada a homogeneidad.
- 3.- Caracterización cinética de las PDFs de tripanosomátidos y estudio del efecto de inhibidores potenciales sobre la actividad de formilasa.
- 4.- Estudios sobre los efectos en la modulación de los niveles de expresión de PDF-1 y PDF-2 sobre la supervivencia celular y el metabolismo mitocondrial tanto en la forma procíclica como en la forma sanguínea de *T. brucei*.
- 5.- Establecimiento de la localización subcelular de la PDF-1 y PDF-2 en *Trypanosoma brucei*.
- 8.- Determinar las repercusiones que tiene la depleción de los niveles de PDF-1 y PDF2 sobre otros procesos bioquímicos esenciales para la supervivencia celular.
- 9.- Evaluar los efectos de la modulación de la formilación y la deformilación sobre la viabilidad celular.

RESULTADOS

D. RESULTADOS

D.I. AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DEL GEN DE LA PÉPTIDO DEFORMILASA 1 Y 2 DE *Trypanosoma brucei* y *Trypanosoma cruzi*

D.I.1. Aislamiento de los genes PDF-1 y PDF-2 de *Trypanosoma brucei* y *Trypanosoma cruzi*

Las secuencias codificantes de la PDFs de *Trypanosoma brucei* fueron obtenidas mediante una búsqueda en la base de datos GeneDB (www.genedb.org) utilizando la secuencia de la PDF de *Escherichia coli*. Se identificaron dos genes que codifican péptido deformilasas putativas: Tb11.01.6120 de 783 pb y Tb09.211.0190 de 1101 pb las cuales fueron designadas en este trabajo como PDF-1 y PDF-2 respectivamente. En el caso de *Trypanosoma cruzi* la misma estrategia de búsqueda permitió detectar 4 homólogos de la PDF bacteriana: Tc00.1047053506871.100, Tc00.1047053507509.50 que en este estudio fueron asignadas como PDF-1 que constituyen una secuencia de 783 pb de longitud mientras que Tc00.1047053510579.20 y Tc00.1047053510241.120 fueron asignadas como PDF-2 y tienen una secuencia codificante de 1101 pb de longitud.

La secuencia codificante de PDF-1 y PDF-2 de *Trypanosoma brucei* y *Trypanosoma cruzi* fueron amplificadas mediante PCR a partir de DNA genómico de la línea celular *T. brucei* 449 y de *T. cruzi* cepa Y, respectivamente.

Para la expresión de las proteínas de *Trypanosoma cruzi* se utilizaron oligonucleótidos diseñados a partir de la secuencia del gen correspondiente depositada en la base de datos 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 *NdeI* (*TcPDF1* 5’) y *BamHI* (*TcPDF1* 3’), para *TcPDF-1* y *NdeI* (*TcPDF2* 5’) y *BamHI* (*TcPDF2* 3’), para *TcPDF-2* para su posterior clonación en el sistema de expresión pET. Los productos de amplificación por PCR de 783 y 1101 pares de base se purificaron y fueron analizados en geles de agarosa al 1%. (Figura D.I.1.).

Cada fragmento obtenido del tamaño esperado fue clonado en el vector pGEM-T[®] (Promega) para dar los plásmidos pGEM-*TcPDF-1* y pGEM-*TcPDF-2* respectivamente. Esta construcción se utilizó para comprobar por secuenciación el fragmento de DNA amplificado, utilizando los oligonucleótidos T7 y SP6.

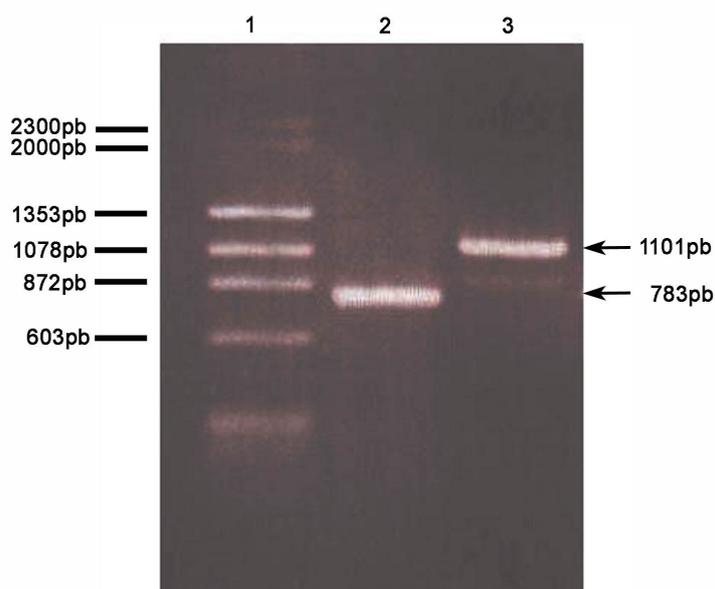


Figura D.I.1. Electroforesis en agarosa 1%. 1) Marcadores de DNA. 2) Sonda homóloga amplificada por PCR a partir de DNA genómico de *T. cruzi*, utilizando el par de oligonucleótidos *TcPDF1-5'*, *TcPDF1-3'* para *TcPDF-1* y *TcPDF2-5'*, *TcPDF2-3'* para *TcPDF-2* (Tabla B.II.3.).

D.II. EXPRESIÓN DE LAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES PDF-1 Y PDF-2 DE *Trypanosoma cruzi* EN EL SISTEMA HETERÓLOGO *E. coli*

D.II.1. Construcción del sistema de expresión para *TcPDF-1* y *TcPDF-2*

Los primeros intentos de expresión *TcPDF-1* y *TcPDF-2* consistían en el diseño de plásmidos que contenían la secuencia completa de cada proteína. Sin embargo, con estas versiones no fue posible obtener proteína soluble. Por consiguiente, se diseñaron truncamientos sistematizados del extremo amino terminal teniendo en cuenta la secuencia de la PDF de *E. coli* (figura D.II.1.) que carece de las extensiones N- y C-terminal que presentan las proteínas de *T. cruzi*. La región N-terminal de PDF de

eucariotas esta asociada con la localización subcelular de la proteína y es normalmente procesada, por lo que los truncamientos sistemáticos en otras PDFs eucariotas han permitido optimizar los niveles de producción de proteínas en sistemas de expresión bacterianos, manteniéndose los residuos críticos para la actividad.

Concretamente se hicieron las construcciones presentadas en la figura D.II.1. que presentan truncamientos de 37 y 61 aminoácidos del extremo amino de la PDF-1 y PDF-2 respectivamente.

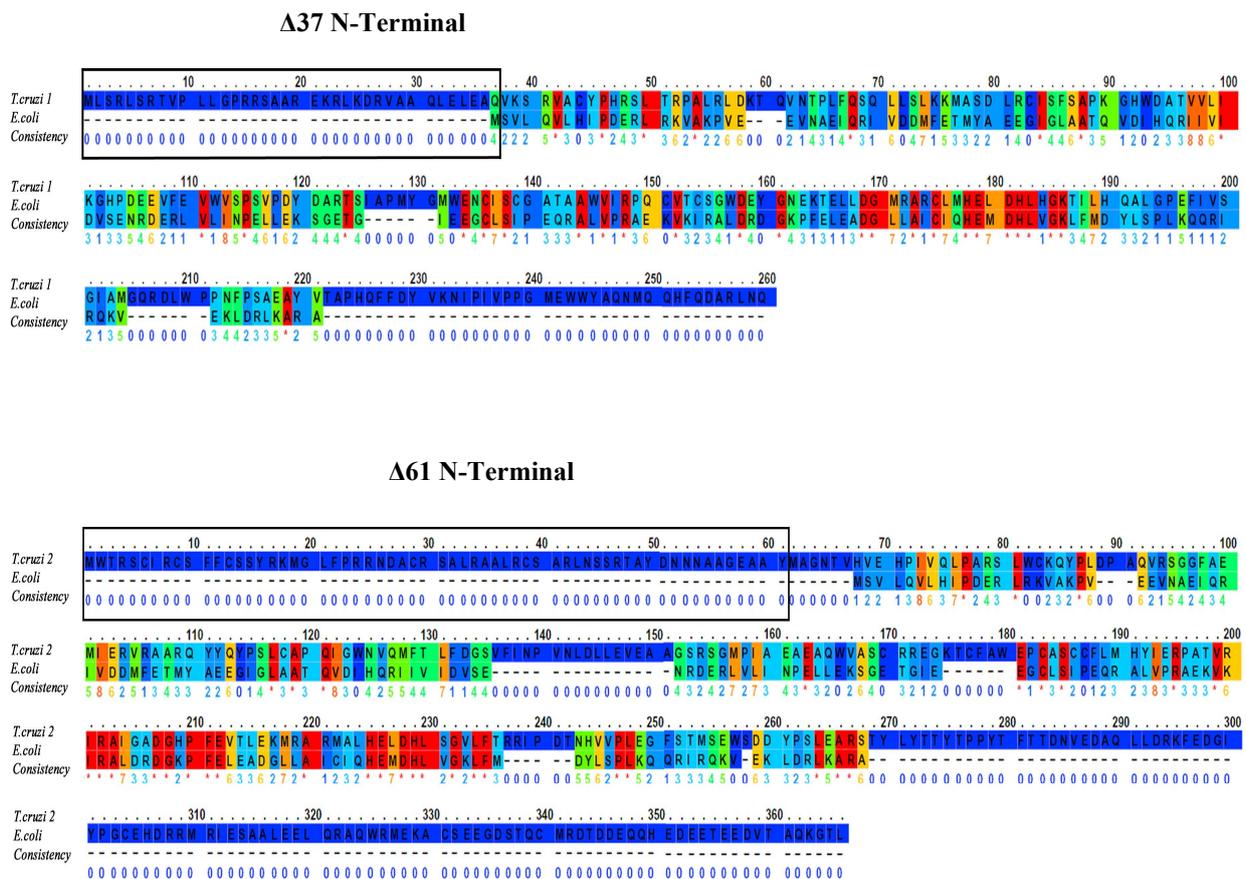


Figura D.II.1. Alineamientos de la PDF-1 y PDF-2 de *Trypanosoma cruzi* junto con la PDF de *E. coli*. Los truncamientos se diseñaron teniendo en cuenta las regiones conservadas entre la PDF bacteriana y la PDF de *Trypanosoma cruzi*. En el recuadro se indica la zona seleccionada para el truncamiento de la región amino terminal con la que se obtuvo proteína soluble.

El sistema elegido para la expresión de las proteínas fue el vector pET el cual está basado en la transcripción de genes por parte de la enzima T7 RNA polimerasa e incorpora una secuencia de 6 histidinas que facilita la purificación de la proteína por cromatografía de afinidad a metal. 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 ésta construcción es utilizada para transformar cepas de *E. coli* que contienen en su genoma una copia del gen que codifica ésta 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 pET22-b(+) de la serie pET de Novagen, en el que se introdujeron las secuencias codificantes correspondientes a las versiones truncadas de *TcPDF-1* y *TcPDF-2* con el fin de obtener proteína recombinante soluble (figura D.II.2.).

En primer lugar, los plásmidos pGEMT- $\Delta 37TcPDF-1$ y pGEMT- $\Delta 61TcPDF-2$ fueron digeridos con las enzimas de restricción *Nde I* y *BamH I*, liberándose el fragmento correspondiente al gen $\Delta 37TcPDF-1$ y $\Delta 61TcPDF-2$, respectivamente. A continuación el inserto liberado se clonó en el vector pET22b(+), previamente digerido con las mismas endonucleasas y desfosforilado con fosfatasa alcalina. Los plásmidos resultantes denominados $\Delta 37TcPDF-1$ -pET22b(+) y $\Delta 61TcPDF-2$ -pET22b(+) respectivamente, fueron propagados en *E. coli* XL1Blue y secuenciados con los oligonucleótidos T7 promotor y T7 terminador para descartar errores.

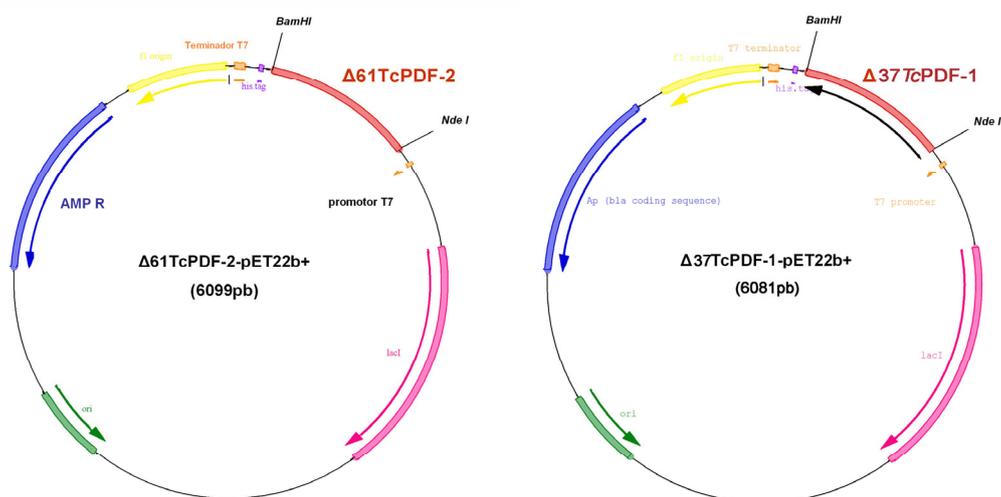


Figura D.II.2. Plásmido de expresión $\Delta 37TcPDF-1$ -pET22b+ y $\Delta 61TcPDF-2$ -pET22b+.

Para sobreexpresar la proteína recombinante se transformaron diferentes cepas de bacterias *E. coli* BL21 (DE3), con la finalidad de determinar la cepa donde los niveles de expresión de proteína soluble fuesen óptimos. Estas cepas contienen 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 pET22b(+). La inducción de la expresión de $\Delta N37TcPDF-1$ y de $\Delta N61TcPDF-2$ se llevó a cabo con IPTG a una concentración final de 1 mM a diferentes temperaturas y se recogieron muestras a distintos tiempos. La cepa elegida para la expresión de $\Delta N37TcPDF-1$ fue la *E. coli* BL21 (DE3) pLysS. Esta cepa presentaba mayores niveles de expresión de proteína soluble que alcanzaron un máximo cuando la inducción se mantenía durante 18 horas a 22°C (Figura D.II.3.). En el caso de $\Delta N61TcPDF-2$ la cepa elegida fue la *E. coli* BL21 (DE3). En las condiciones experimentales ensayadas se observó un máximo de sobreexpresión a las cinco horas de inducción a 37°C (figura D.II.4.).

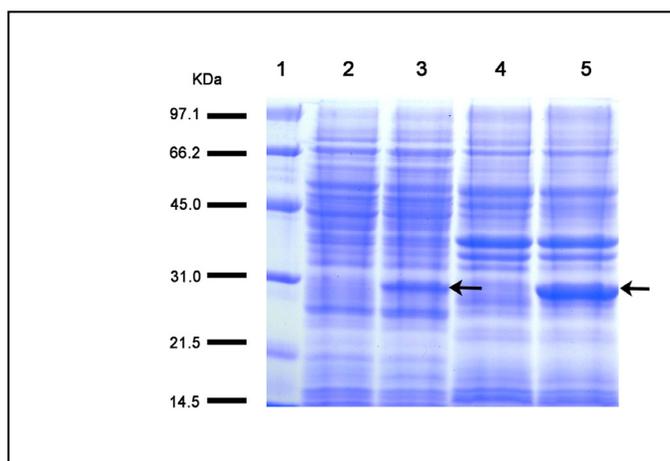


Figura D.II.3. Sobreexpresión de la proteína $\Delta N37TcPDF-1$ en *E. coli* BL21 (DE3) pLysS. La inducción se llevó a cabo a 22°C durante 18 horas con IPTG 1 mM. Gel SDS-PAGE al 12% teñido con azul de Coomassie-R250 correspondiente a extractos de *E. coli* BL21 (DE3) pLysS que contienen el plásmido de expresión $\Delta 37TcPDF-1$ -pET22b(+). (1) Marcadores de peso molecular; (2) extractos solubles de bacterias sin inducir; (3) extractos solubles de bacterias inducidas con IPTG durante 18 horas; (4) cuerpos de inclusión obtenidos a partir de extractos de *E. coli* sin inducir; (5) cuerpos de inclusión obtenidos a partir de extractos de *E. coli* inducidos durante 18 horas. La proteína $\Delta 37TcPDF-1$ sobreexpresada migra con un tamaño aproximado de 30 kDa y aparece señalada con una flecha.

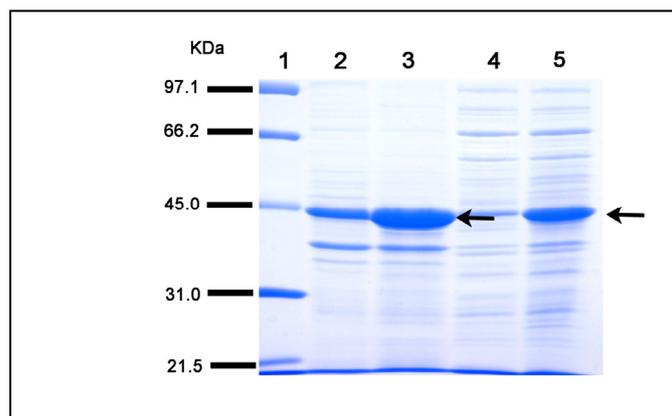


Figura D.II.4. Sobreexpresión de la proteína $\Delta N61TcPDF-2$ en *E. coli* BL21 (DE3). La inducción se llevó a cabo a 37°C durante 5 horas con IPTG 1 mM. Gel SDS-PAGE al 12% teñido con azul de Coomassie-R250 correspondiente a extractos de *E. coli* BL21 (DE3) que contienen el plásmido de expresión $\Delta 61TcPDF-2$ -pET22b+. (1) Marcadores de peso molecular; (2) extractos solubles de bacterias sin inducir; (3) extractos solubles de bacterias inducidas con IPTG durante 5 horas, (4) cuerpos de inclusión obtenidos a partir de extractos de *E. coli* sin inducir (5) cuerpos de inclusión a partir de extractos de *E. coli* inducidos. La proteína $\Delta 61TcPDF-2$ sobreexpresada migra con un tamaño aproximado de 45 kDa y aparece señalada con una flecha.

D.III. PURIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN CINÉTICA DE LA PDF-1 Y PDF-2 DE *Trypanosoma cruzi*

D.III.1. Purificación de la proteína recombinante $\Delta N37TcPDF-1$

La purificación de la enzima se llevó a cabo a partir de extractos de células *E. coli* BL21(DE3) pLysS (Stratagene) transformadas con el plásmido $\Delta 37TcPDF-1$ -pET22b(+) inducidas durante 18 horas con 1 mM de IPTG como se indica en el apartado de materiales y métodos y se realizó en un solo paso buscando minimizar la manipulación de la proteína teniendo en cuenta la conocida inestabilidad de esta clase de metaloproteasas. Se utilizó un gradiente escalonado entre 50 mM y 1 M de imidazol. Entre 50 mM y 120 mM de imidazol eluyen gran parte de las proteínas inespecíficas, mientras que entre 150-170 mM eluye la $\Delta 37TcPDF-1$ prácticamente libre de proteínas contaminantes (figura D.III.1.).

Las fracciones con una alta concentración de $\Delta 37TcPDF-1$ se unieron y la mezcla final se concentró y se cambió al tampón Hepes 50 mM, pH 7.4.

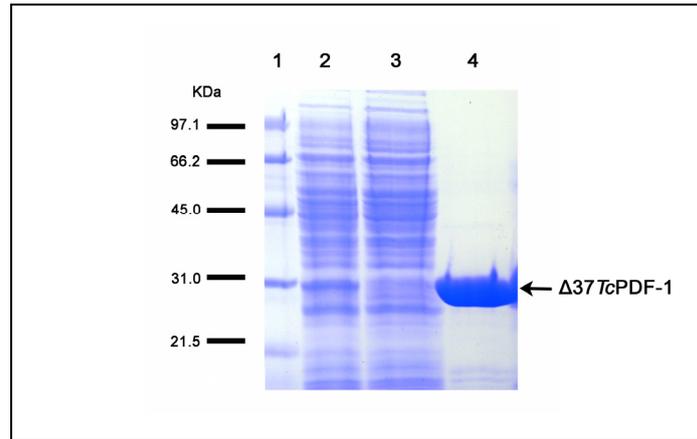


Figura D.III.1. Purificación de la PDF-1 recombinante de *T. cruzi* sobreexpresada en *E. coli* BL21 pLysS (DE3). SDS-PAGE al 12% teñido con azul de Coomassie-R250. 1) Marcadores de peso molecular, 2) extracto soluble de bacterias BL21(DE3) pET22b(+) Δ 37TcPDF-1 inducido con 1 mM de IPTG durante 18 horas; 3) fracción obtenida entre 50-100 mM de imidazol; 4) fracción obtenida entre 150-170 mM de imidazol de la cromatografía de afinidad a níquel en un sistema de cromatografía líquida de alta resolución.

D.III.2. Determinación de la masa molecular de la PDF-1 nativa de *Trypanosoma cruzi*

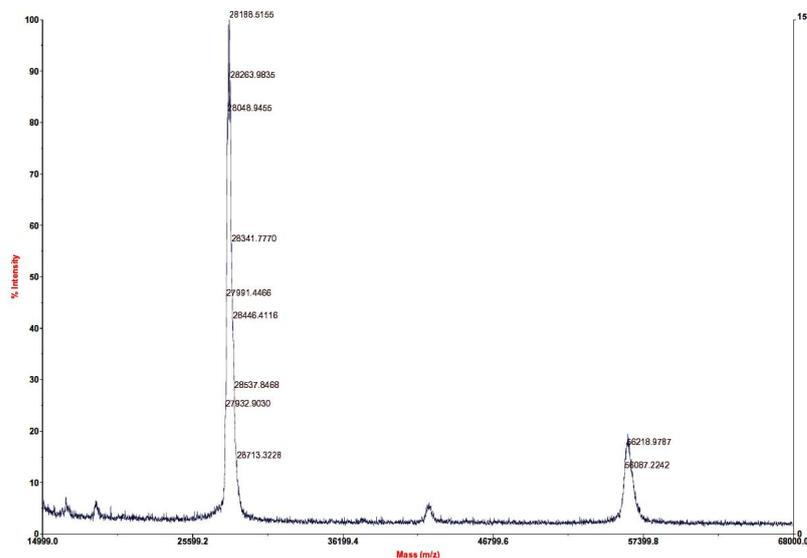


Figura D.III.2. Espectro de masa de la PDF-1 de *Trypanosoma cruzi* recombinante, truncada en 37 aminoácidos en el extremo amino terminal.

La determinación de la masa molecular de la PDF-1 de *Trypanosoma cruzi* se llevó a cabo mediante análisis de espectrometría de masa, usando MALDI-MS

generándose también la huella peptídica. Esta información se utilizó para una búsqueda rigurosa en la base de datos (www.matrixscience.com).

Los resultados de espectrometría de masa identificaron una proteína que corresponde a la péptido deformilasa de *Trypanosoma cruzi* que en este estudio hemos denominado PDF-1. Las determinaciones de masa molecular identifican la proteína con una fiabilidad del 87% ajustándose al tamaño teórico esperado (28.037 kDa) y a la masa molecular deducida en los análisis de expresión y purificación en este estudio (entre 29 y 30 kDa).

Hay que destacar que hay una ligera diferencia entre el valor teórico y el valor de la masa molecular obtenido en el análisis de masa molecular experimental (figura D.III.2.) donde se visualizan diferentes picos con masas entre 28.713 a 28.188 kDa. Esta discrepancia puede deberse a varios factores, que pueden estar asociados a la identidad del cofactor metálico nativo, debido a que en la muestra analizada, la proteína puede estar unida a diferentes cofactores metálicos incorporados durante su sobreexpresión en el sistema bacteriano durante la purificación en la columna de níquel. La presencia de un segundo pico definido, con una masa que representa aproximadamente el doble de la masa de la proteína nativa, puede ser un indicativo de que la PDF-1 de *T. cruzi* adopta una conformación dimérica. Esta observación estaría de acuerdo con lo observado para otras PDFs eucariotas estudiadas hasta la fecha, (a excepción de la PDF de *Plasmodium* que es un monómero) que adoptan este tipo de estructura cuaternaria.

D.III.3. Determinación cuantitativa de la actividad TcPDF-1

La determinación de la actividad deformilasa así como la caracterización cinética de la proteína recombinante TcPDF-1, se llevo a cabo mediante el método espectrofotométrico descrito por Lazennec y colaboradores (Lazennec and Meinel 1997) inicialmente diseñado para el estudio de la PDF de *E. coli*. Consiste en la determinación de la variación de absorbancia a 340 nm debido a la producción de NADH que tiene lugar por la reacción de la formiato deshidrogenasa en presencia de β -NAD que oxida el formiato liberado, producto de la actividad de la PDF-1 sobre el sustrato empleado que en este caso es el formil-metionil-alanil-serina (f-MAS). Este sustrato ha sido diseñado teniendo en cuenta el extremo amino de proteínas codificadas en el genoma de *E. coli*.

D.III.4. Determinación de K_m , V_{max} y k_{cat} para el F-MAS.

Se han establecido en primer lugar las condiciones óptimas para la determinación de la actividad deformilasa de la PDF-1 de *Trypanosoma cruzi*. Así, la reacción se ha llevado a cabo en presencia de KH_2PO_4 50 mM, pH 7.5, NAD^+ 12 mM, a 37°C . Cuando se analizó el efecto de la concentración de sustrato se observó que la actividad deformilasa fue significativa a partir de 20 mM del sustrato f-MAS y aumentó hasta alcanzar un máximo a 35 mM de sustrato. En cuanto a la concentración de enzima, la actividad fue lineal hasta 40 μg (figura D.III.3.). Teniendo en cuenta estas observaciones para los estudios posteriores se utilizaron las siguientes condiciones de ensayo: 37°C , KH_2PO_4 50 mM, pH 7.5, NAD^+ 12 mM, f-MAS 20 mM, 20 μg de TcPDF-1 en un volumen final de 200 μl .

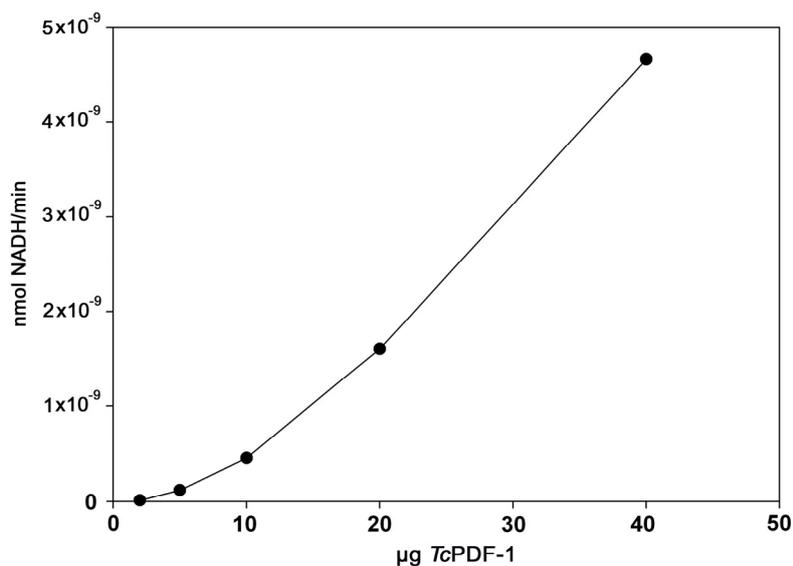


Figura D.III.3. Representación gráfica de la velocidad de deformilación a concentraciones crecientes de la PDF-1 recombinante de *Trypanosoma cruzi*.

El ajuste de los valores de actividad obtenidos a distintas concentraciones de sustrato muestran que la PDF-1 de *T. cruzi* presenta un comportamiento sigmoide, lo

que sugiere un fenómeno de cooperatividad positiva (figura D.III.4.). Este tipo de comportamiento cinético se puede ajustar a la ecuación de Hill,

$$\text{Log}(v/V_{max}) = n\text{log}[S] - n\text{log}K_m$$

en donde n representa el coeficiente de Hill e indica la cooperatividad del sistema, midiendo la estequiometría aparente del proceso de unión en el punto de mayor cooperatividad. Cuanto más alto es el valor de n , mayor es el grado de cooperatividad. Si $n = 1$, no hay cooperatividad; si $n > 1$, hay cooperatividad positiva; si $n < 1$, hay cooperatividad negativa. Para hacer el ajuste de la ecuación de Hill se utilizó el programa Sigma Plot[®] 8, y se obtuvo un coeficiente de Hill de 7,06 lo que indica que existe cooperatividad positiva.

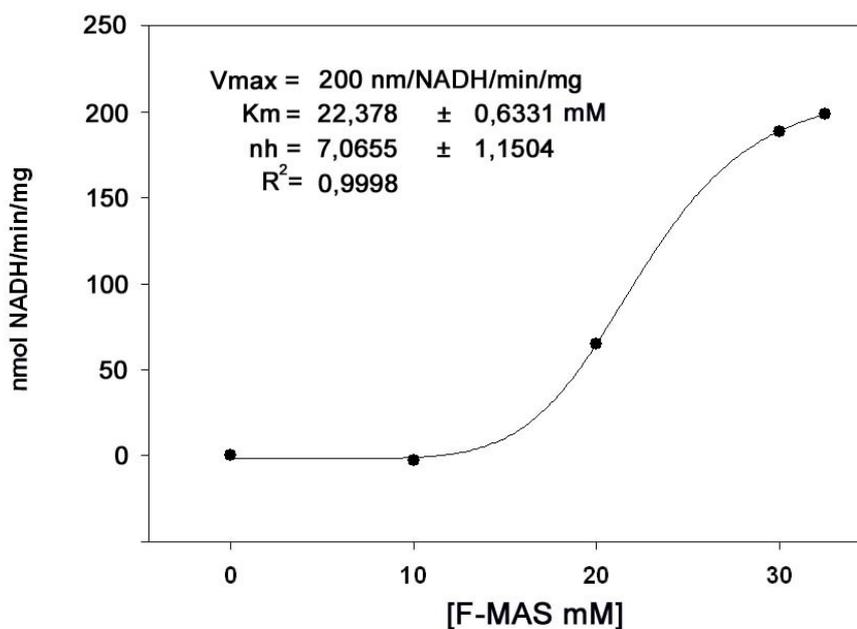


Figura D.III.4. Cálculo del valor de K_m , V_{max} y coeficiente de Hill (nh). La representación de los distintos valores de V_o frente a las concentraciones de F-MAS se ajustan a una curva sigmoide y a partir del ajuste con la ecuación de Hill empleando el programa Sigma Plot[®] 8, se obtiene el valor de K_m , V_{max} y el grado de cooperatividad de Hill.

La PDF-1 de *Trypanosoma cruzi* presenta un valor de K_m para el f-MAS de 22.37 mM y una V_{max} de 200 nmol/NADH/min/mg. A partir de este valor se obtuvo un valor de $k_{cat} = 0.093 \text{ s}^{-1}$ y una constante de especificidad (k_{cat}/K_m) de $4.17 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$.

Una característica general de las PDFs eucariotas es un valor de K_m relativamente alto frente al sustrato bacteriano f-MAS. Es de suponer que los sustratos potenciales de las PDF-1 de *T. cruzi* y de las PDFs eucariotas en general son las proteínas codificadas por el genoma mitocondrial. En el caso de tripanosomátidos estas proteínas se caracterizan por su alta hidrofobicidad, especialmente en su extremo amino (figura D.III.5.). En este estudio se intentó determinar la actividad deformilasa frente a este tipo de sustratos, empleando los tripéptidos formilados diseñados teniendo en cuenta los tres primeros aminoácidos de proteínas codificadas por el kinetoplasto. Uno de ellos fue el formil-metionil-leucil-fenilalanina (f-MLF). Sin embargo, las dificultades en su solubilización, aún empleando concentraciones bajas de detergente, imposibilitaron determinar la actividad deformilasa.

Proteína	Gen	Extremo amino terminal
NADH Deshidrogenasa	ND5	M F L I F F L F F I
ATPasa subunidad 6	A6, MURF 4	M F L F F C D L F W
NADH Deshidrogenasa 7	ND7, MURF3	M L F L V V F L H L
Proteína ribosomal S12	CR6, RPS12	M W F L Y G C C L R
CR4	G4	M Y S L W Y I L L L

Figura D.III.5. Secuencia parcial del extremo amino de algunas proteínas codificadas por el genoma mitocondrial de *Trypanosoma*. En la figura se muestran los diez primeros aminoácidos de la proteínas NADH deshidrogenasa 5 y 7, que forma parte de la cadena respiratoria, la proteína ribosomal S12 que está asociada a la maquinaria traduccional de la mitocondria, la proteína mitocondrial CR4 y la ATP6, que forma parte del Fo del complejo de la ATP sintetasa mitocondrial. Los péptidos para el ensayo de la PDF consisten en di- o tri-péptidos basados en los primeros aminoácidos de la secuencia N-terminal.

El análisis del comportamiento cinético de la PDF-1 frente al f-MAS puso de manifiesto una significativa inhibición por exceso de sustrato a concentraciones por encima de 35 mM (figura D.III.6.).

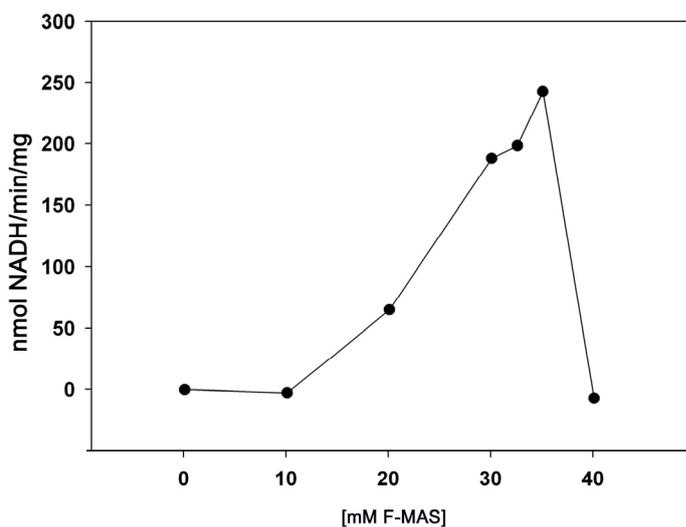


Figura D.III.6. Inhibición por exceso de sustrato de PDF-1. La actividad de PDF-1 es inhibida a concentraciones altas del sustrato f-MAS bajo condiciones de ensayo estándar (37°C, KH_2PO_4 50 mM, pH 7.5, NAD^+ 12 mM, f-MAS 0-40 mM).

D.III.5. Efecto de la fuerza iónica y del ión divalente: activación e inhibición por cofactores metálicos

El efecto de la fuerza iónica fue estudiado mediante la determinación de la actividad de PDF-1 de *T. cruzi* en presencia de concentraciones crecientes de KCl (entre 0.1 y 1 M). En este estudio se observó un aumento de la actividad hasta alcanzar un máximo a 0.5M. Por encima de esta concentración la actividad se mantiene sin incrementos significativos (figura D.III.7.).

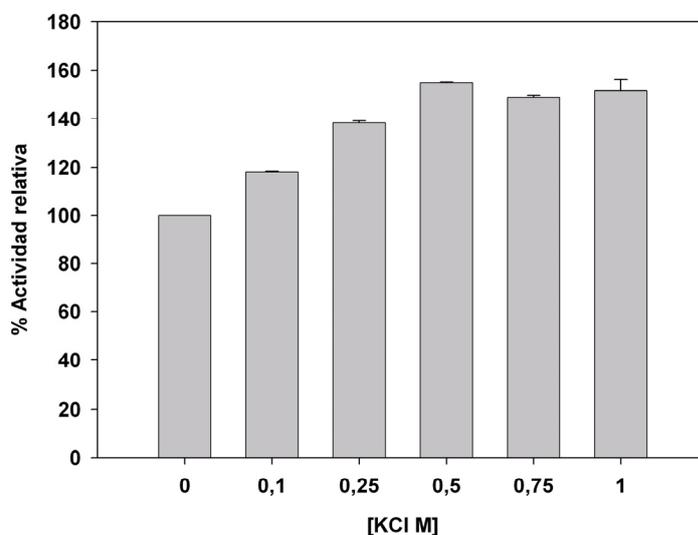


Figura D.III.7. Efecto de la fuerza iónica sobre la actividad deformilasa de la PDF-1 de *T. cruzi*. El valor de 100% actividad relativa fue asignada al valor inicial obtenido en el ensayo estándar (37°C, KH₂PO₄ 50 mM, pH 7.5, NAD⁺ 12 mM, f-MAS 20 mM).

Considerando que las PDFs dependen de la presencia de un catión divalente para su actividad, se evaluaron los efectos de diferentes cationes a concentraciones finales entre 0.1 y 100 μ M sobre la actividad deformilasa de la PDF-1 de *T. cruzi*, tras la incubación de la enzima 5 minutos en presencia del cofactor metálico correspondiente. La actividad no experimentó cambios significativos en presencia de Mg²⁺ o Mn²⁺, mientras que con cobalto a concentraciones de 100 μ M se observa una ligera disminución de la actividad. En el caso del níquel, se observa una reducción importante en la actividad deformilasa a las distintas concentraciones ensayadas, mientras que con el cobre se registró un ligero incremento de la actividad a 50 y 100 μ M (figura D.III.8.).

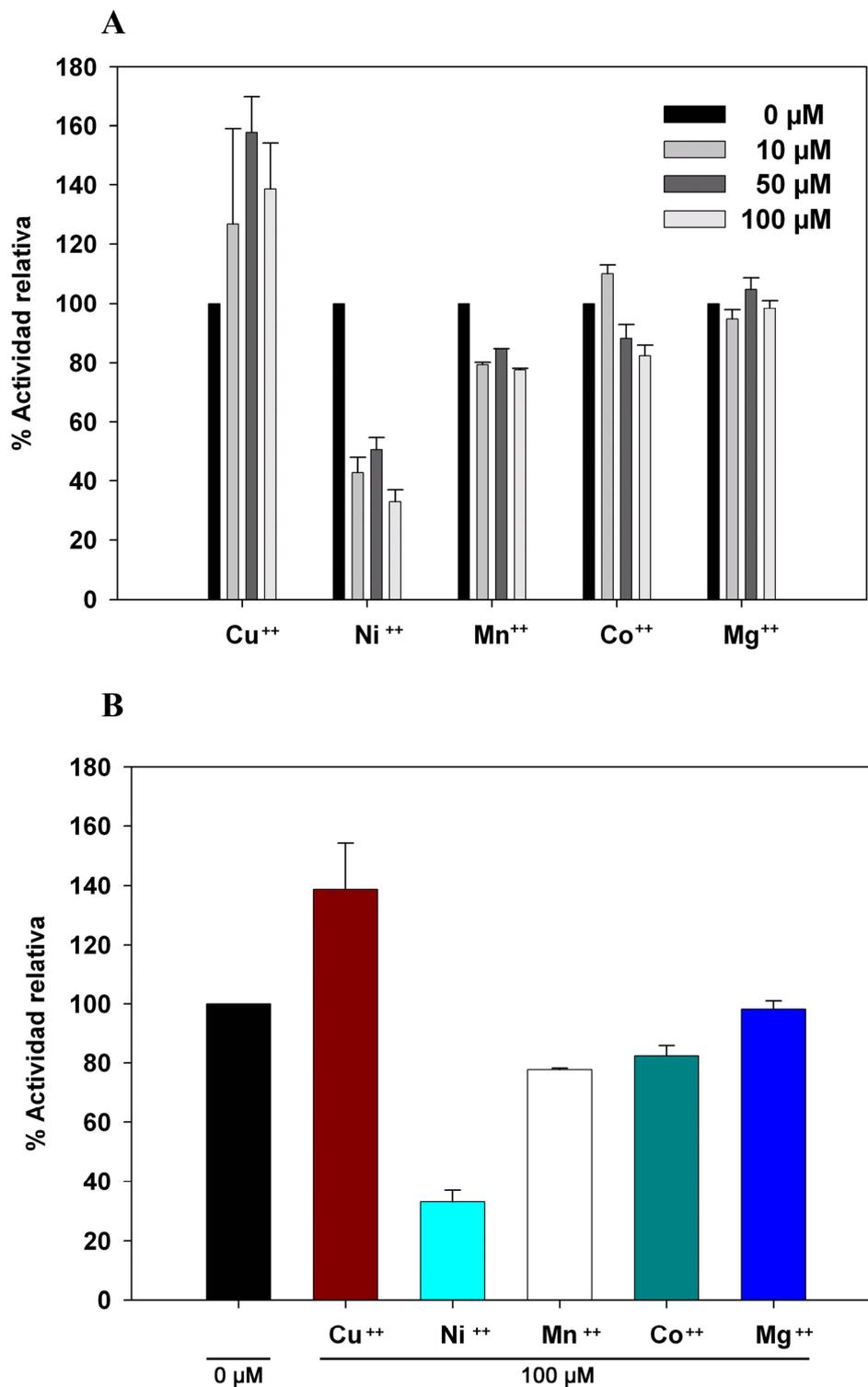


Figura D.III.8. Efecto de diferentes cationes divalentes sobre la actividad deformilasa de la PDF-1 de *T. cruzi*. A) Efecto del Cu²⁺, Ni²⁺, Mn²⁺, Co²⁺ y Mg²⁺ sobre la actividad de TcPDF-1 en un rango de concentración final entre 10 y 100 μM. B) Efecto comparativo de los diferentes cationes divalentes a 100 μM. El valor de 100% de actividad relativa fue asignado al valor inicial obtenido en el ensayo estándar (37°C, KH₂PO₄ 50 mM, pH 7.5, NAD⁺ 12 mM, f-MAS 20 mM). Los cationes utilizados corresponden a las sales correspondientes en forma de cloruros.

D.III.6. Efecto de agentes quelantes de iones sobre la actividad de la PDF-1 de *Trypanosoma cruzi*

Teniendo en cuenta la dependencia de catión metálico, se estudió el efecto de los agentes quelantes EDTA y 1,10 fenantrolina sobre la actividad deformilasa. Antes de la medición de la actividad, la enzima fue preincubada durante 5 minutos en presencia del agente quelante a concentraciones entre 1 y 20 μM . Se consideró inicialmente que estos agentes podrían influir indirectamente en la actividad deformilasa.

Sorprendentemente, a concentraciones crecientes de EDTA se observa un aumento significativo en la actividad de la PDF-1 de *T. cruzi* (figura D.III.9.). Resultados parecidos fueron obtenidos para la 1,10 fenantrolina que fue ensayada a concentraciones entre 1 y 5 mM. Así la actividad deformilasa aumenta hasta 6 veces en relación al valor obtenido sin 1,10 fenantrolina (figura D.III.10.). A efectos comparativos se estudió el impacto de estos agentes quelantes sobre la PDF de *E. coli*. En este caso mientras que el EDTA no afecta a la PDF de *E. coli*, la actividad de la PDF bacteriana es inhibida en su totalidad a 5 mM de 1,10 fenantrolina (figura D.III.10.).

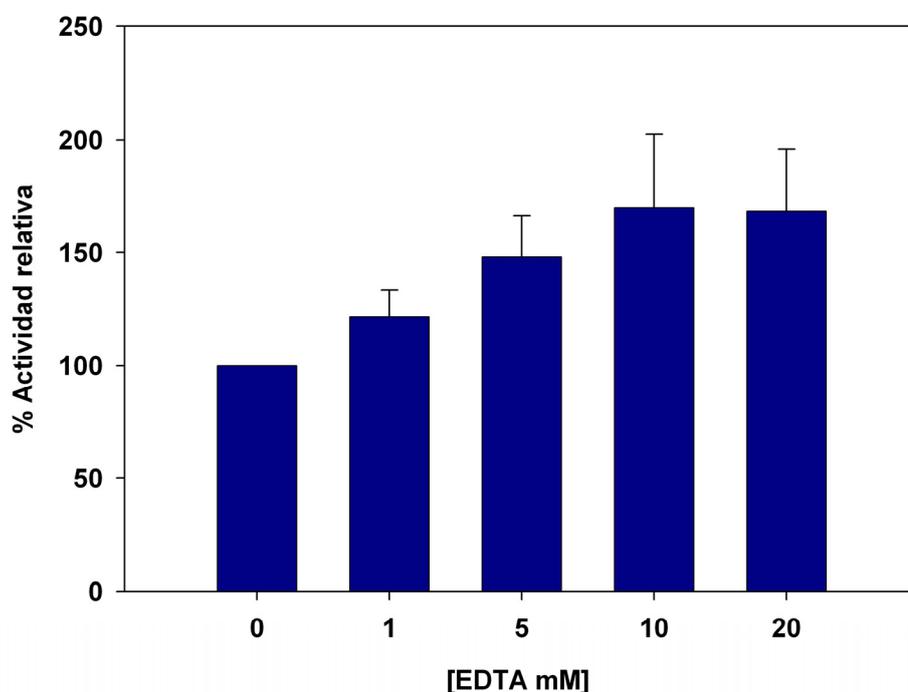


Figura D.III.9. Efecto del EDTA sobre la actividad deformilasa de la PDF-1 de *T. cruzi*. El valor de 100% actividad relativa fue asignada al valor inicial obtenido en el ensayo estándar (37°C, KH_2PO_4 50 mM, pH 7.5, NAD^+ 12 mM, f-MAS 20 mM).

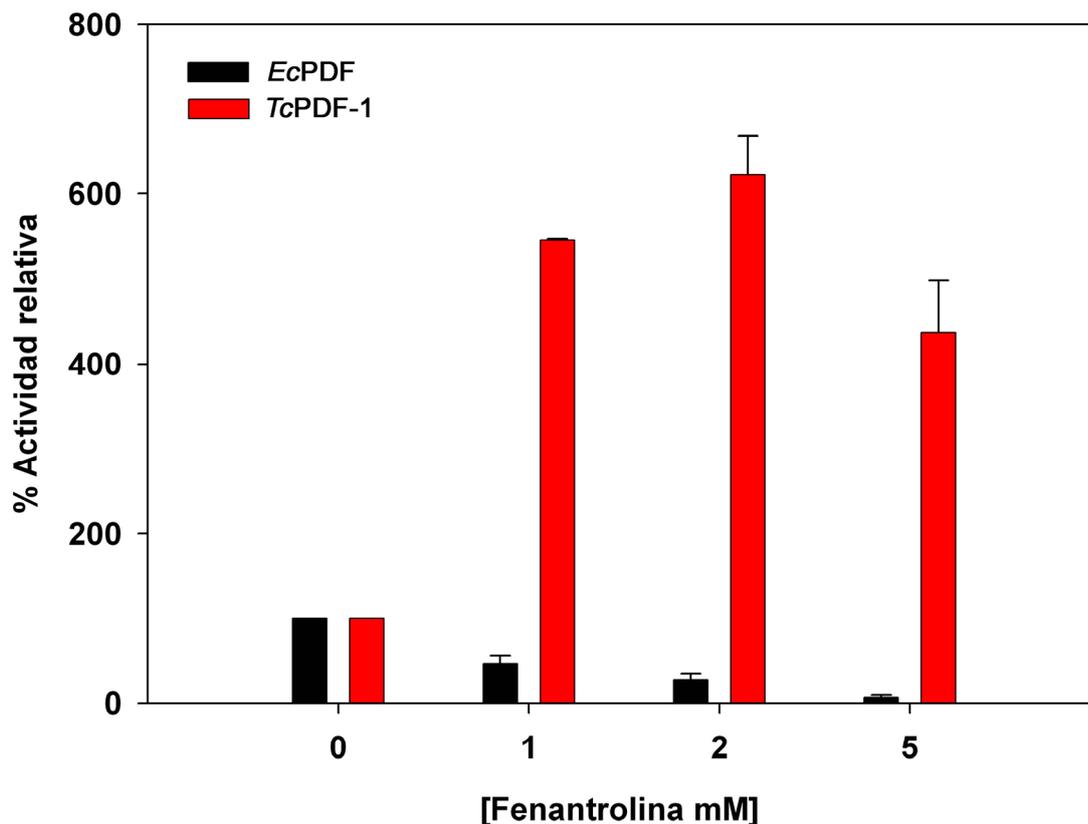


Figura D.III.10. Efecto de la 1,10-fenantrolina sobre la actividad deformilasa de la PDF de *E. coli* y la PDF-1 de *T. cruzi*. El valor de 100% actividad relativa fue asignada al valor inicial obtenido en el ensayo estándar (37°C, KH₂PO₄ 50 mM, pH 7.5, NAD⁺ 12 mM, f-MAS 20 mM).

D.III.7. Efecto de inhibidores de metaloproteasas sobre la actividad de la PDF-1 de *Trypanosoma cruzi*

La presencia de un dominio de unión a metal estrictamente conservado en todas las PDFs estudiadas hasta la fecha, que también está presente en metaloproteasas de zinc, las cuales comparten un mecanismo catalítico similar al de las PDFs, sugiere que inhibidores conocidos de metaloproteasas podrían tener un efecto sobre las PDFs en general. Por ello se estudió la acción de algunos inhibidores conocidos de aminopetidases frente a la PDF de *T. cruzi*. Se emplearon compuestos como el CL-82198 que es más selectivo frente a un tipo particular de metaloproteasas y el CP101537, otro inhibidor de metaloproteasas que actualmente es un candidato para

ensayos clínicos como antimicrobianos y para terapias de infección de miocardio. También se analizó la bestatina, un compuesto de origen microbiano que es un potente inhibidor de algunas aminopeptidasas que ha sido ampliamente usado para estudiar el papel fisiológico de algunas exopeptidasas en la regulación del sistema inmune de mamíferos y, en el desarrollo de tumores (Scornik and Botbol 2001), (figura D.III.11.). Estos compuestos fueron estudiados a distintas concentraciones hasta 100 μM , no observándose inhibición de la actividad deformilasa de *Trypanosoma cruzi* ni de la PDF

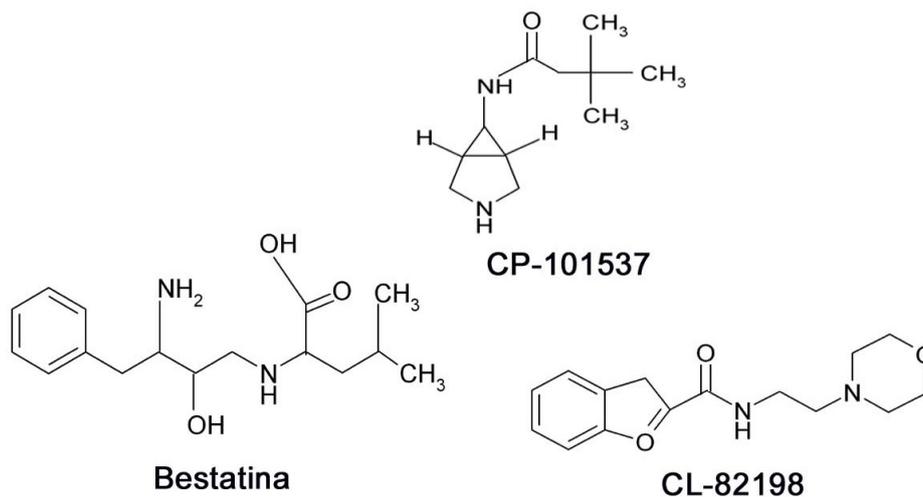


Figura D.III.11. Estructura de 3 inhibidores comerciales de metaloproteasas empleados en este estudio.

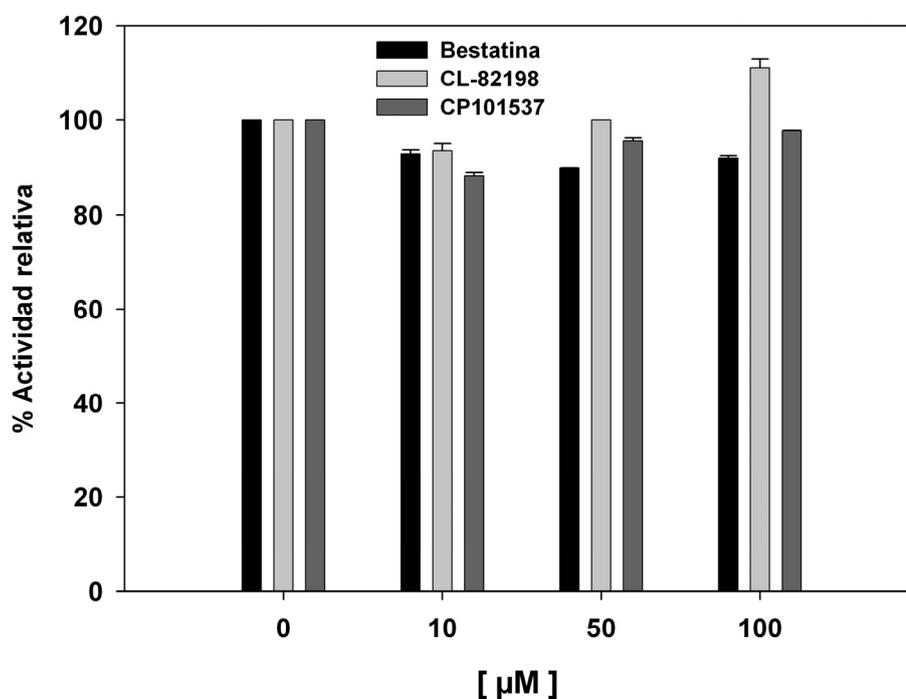


Figura D.III.12. Efecto de la bestatina, CL-82198 y CP-101537 sobre la actividad de la PDF-1 de *T. cruzi*. El estudio se llevó a cabo en un intervalo de concentración entre 10 y 100 μM . El valor de 100% actividad relativa fue asignada al valor inicial obtenido en el ensayo estándar sin fármaco.

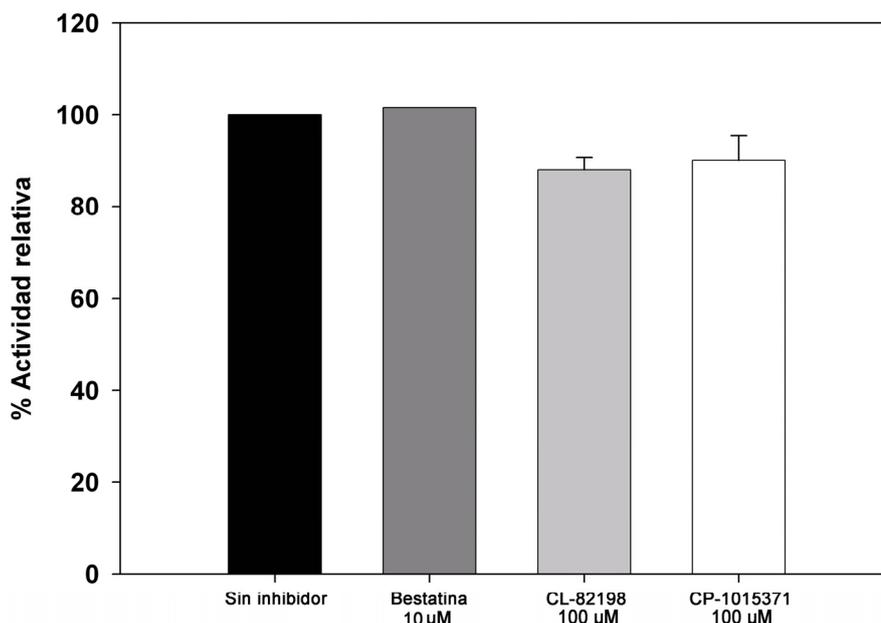


Figura D.III.13. Efecto de la bestatina, CL-82198 y CP-1015371 sobre la actividad de la PDF de *E.coli*. El valor de 100% de actividad relativa fue asignado al valor inicial obtenido en el ensayo estándar sin fármaco.

D.III.8. Efecto de la actinonina sobre la actividad de la PDF-1 de *Trypanosoma cruzi*

La actinonina es un agente antibacteriano que presenta un grupo hidroxamato y que se ha reconocido como un potente inhibidor de la PDF bacteriana. Su descubrimiento ha sido clave para el desarrollo de nuevos inhibidores más potentes y selectivos frente a las PDFs bacterianas (Aubart and Zalacain 2006). También ha demostrado ser muy activo como agente antiproliferativo en plantas, *Plasmodium falciparum* y en líneas tumorales humanas (Coustou et al. 2003), su actividad está asociada a una inhibición de la péptido deformilasa.

En este estudio se analizó el efecto de la actinonina frente a la PDF de *Escherichia coli* y la PDF-1 de *Trypanosoma cruzi* a concentraciones hasta 1 µM. Los resultados muestran que a 100 nM hay una inhibición de aproximadamente el 50% de la PDF de *E. coli*, mientras que concentraciones de hasta 1 µM, que inhiben casi en su

totalidad a la PDF bacteriana, no afectan a la PDF-1 de *Trypanosoma cruzi* (figura D.III.11.).

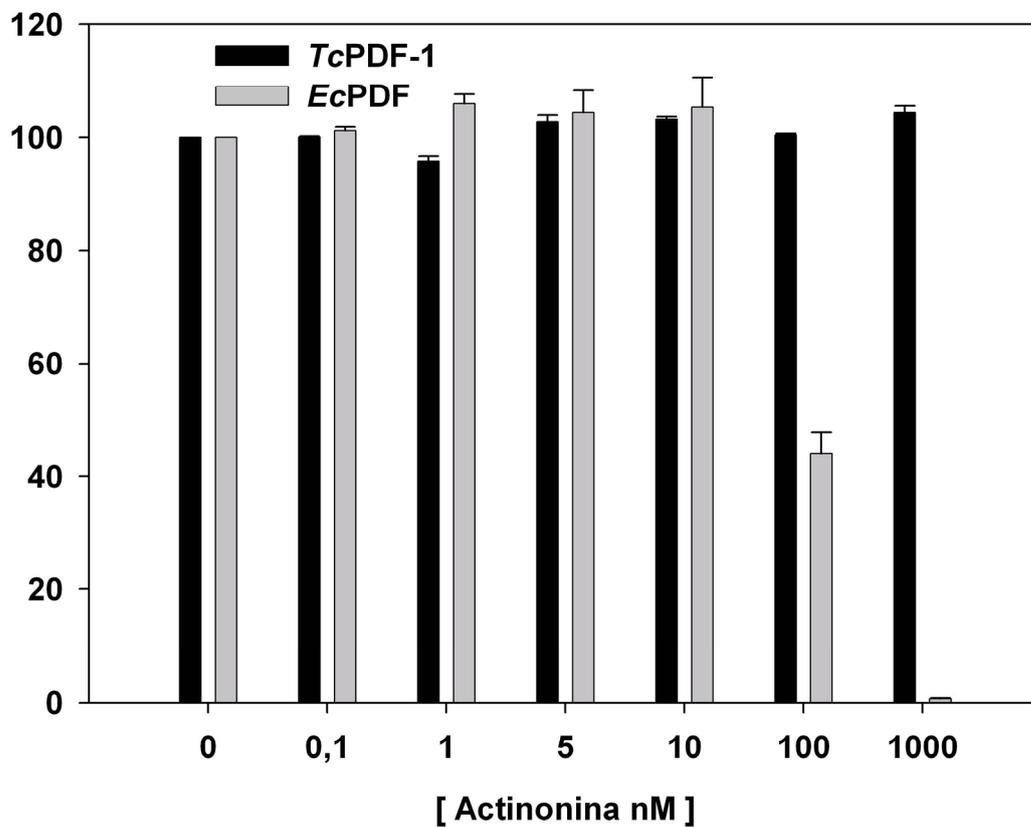


Figura D.III.14. Efecto comparativo de la actinonina sobre la actividad deaminasa de la PDF de *E. coli* y la PDF-1 de *T. cruzi*. El valor de 100% de actividad fue asignada al valor inicial obtenido en el ensayo estándar para cada enzima en ausencia de fármaco.

D.IV. LOCALIZACIÓN INTRACELULAR DE PDF-1 Y PDF-2 DE *Trypanosoma brucei*

D.IV.1. Obtención de anticuerpos policlonales frente a la PDF-1 y PDF-2 de *T. cruzi*.

La disponibilidad de proteína recombinante purificada a homogeneidad permitió la obtención de anticuerpos policlonales específicos frente a la PDF-1 y PDF-2 de *T. cruzi*. La alta homología de secuencia entre las PDFs de tripanosomátidos llevó a plantear la posibilidad de extender la utilidad de estos anticuerpos al estudio de la localización subcelular y de la modulación de la expresión en la forma procíclica de *T. brucei* mediante silenciamiento génico del gen *PDF-1* y el gen *PDF-2*.

D.IV.1.1. Estudio de la especificidad del anticuerpo anti-*Tc*PDF-2 y anti-*Tc*PDF-1 mediante *Western blot*

En primer lugar se determinó el grado de especificidad de los anticuerpos policlonales frente a las proteínas *Tc*PDF-1 y *Tc*PDF-2, para lo cual se realizaron *Western blots* con la proteína recombinante pura de *T. cruzi* y extractos de parásitos de la forma procíclica de *T. brucei* y de la forma epimastigote de *T. cruzi*. Como control se utilizó el suero pre-inmune. A su vez se realizó un ensayo de saturación del anticuerpo con la proteína recombinante pura correspondiente, previo a la inmunodetección.

La obtención de extractos totales de parásitos se detalla en materiales y métodos. Se utilizaron 2.5×10^6 células por cada muestra y 10 ng de proteína recombinante.

El ensayo de saturación para los anticuerpos anti-*Tc*PDF-1 y anti-*Tc*PDF-2 se llevó a cabo mediante la incubación previa de 30 μ g del respectivo suero anti-*Tc*PDF con 10 μ g de la proteína recombinante pura correspondiente durante al menos 12 horas 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 minutos a 4 °C y el sobrenadante se utilizó para llevar a cabo la inmunodetección.

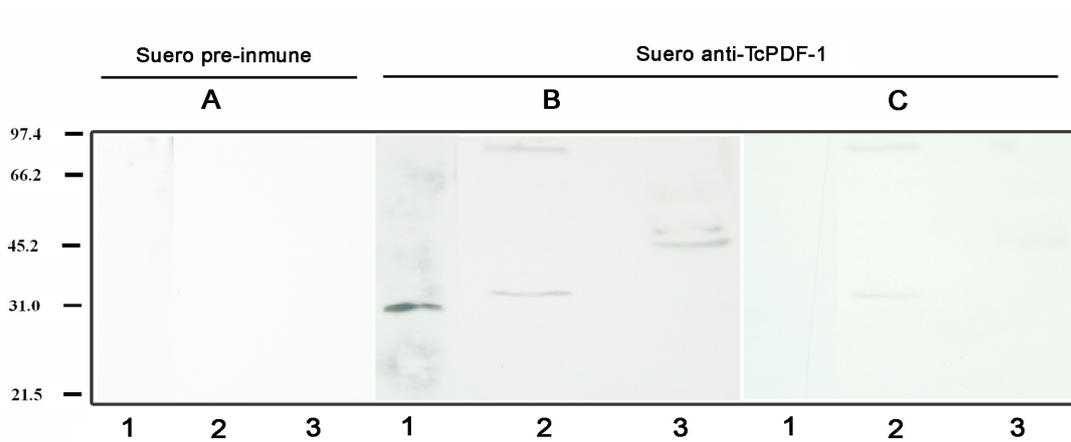


Figura D.IV.1. Especificidad del anticuerpo anti-*TcPDF-1*. Inmunodetección de suero *TcPDF-1*. La dilución de anticuerpo fue de 1:2000. Los extractos de parásitos se prepararon con 2.5×10^6 células. Carril 1: 10 ng de $\Delta 37TcPDF-1$ recombinante purificada, carril 2: extractos totales de parásitos de la forma procíclica de *T. brucei*, carril 3: extractos totales de la forma epimastigote de *T. cruzi*. A) Incubación con suero preinmune, B) incubación con suero anti-*TcPDF-1* y C) incubación con suero anti-*TcPDF-1* incubado previamente con proteína recombinante.

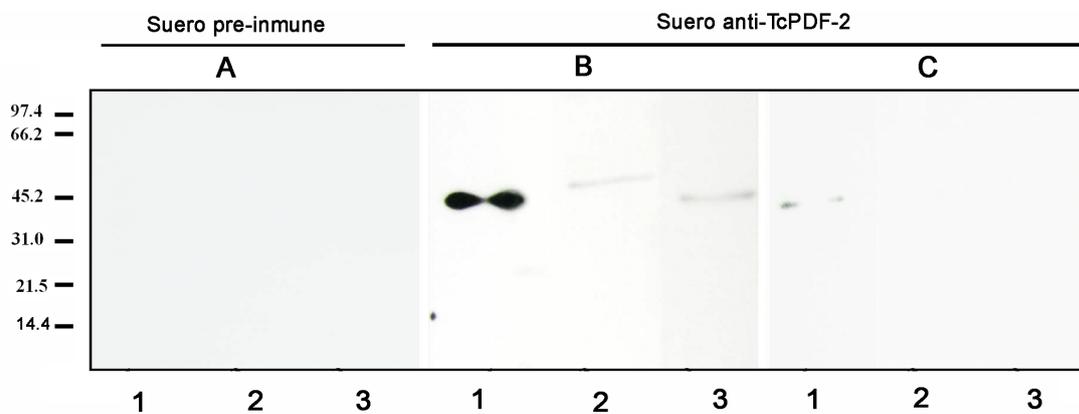


Figura D.IV.2. Especificidad del anticuerpo anti-*TcPDF-2*. Inmunodetección de suero *TcPDF-2*. La dilución de anticuerpo utilizada fue de 1:5000. Los extractos de parásitos se prepararon con 2.5×10^6 células. Carril 1: 10 ng de $\Delta 61TcPDF-2$ recombinante purificada, carril 2: extractos totales de parásitos de la forma procíclica de *T. brucei*, carril 3: extractos totales de la forma epimastigote de *T. cruzi*. A) Incubación con suero preinmune, B) incubación con suero anti-*TcPDF-2* y C) incubación con suero anti-*TcPDF-2* incubado previamente con proteína recombinante.

En las figuras D.IV.1. y D.IV.2. puede observarse que el anticuerpo generado frente a la PDF-1 de *T. cruzi* reconoce en extractos de *Trypanosoma brucei* una banda por encima de 31 kDa, que corresponde al tamaño esperado mientras que en extractos de *Trypanosoma cruzi* esta banda está por encima de 45 kDa y difiere del tamaño esperado según la base de datos (29.4 kDa para la PDF-1 de *T. cruzi*). Sin embargo, al incubar el suero anti-*Tc*PDF-1 con proteína PDF-1 recombinante, este pierde la capacidad de reconocer ambas bandas, lo que sugiere un reconocimiento específico. Puede ser que el carácter altamente hidrofóbico de la PDF-1 de *T. cruzi* puede conducir a una migración aberrante. Esta migración anómala de proteínas mitocondriales se debe a fenómenos de agregación y se ha descrito previamente para proteínas mitocondriales de protozoarios tripanosomátidos (Horvath et al. 2000).

En el caso del anticuerpo generado frente a la PDF-2 de *Trypanosoma cruzi*, reconoce tanto en extractos de *T. brucei* como en extractos de *T. cruzi* una banda del tamaño aproximado al esperado según el peso teórico de la proteína de PDF-2 de *T. brucei* (42.1 kDa) y de *T. cruzi* (41.7 kDa). Cuando se lleva a cabo la inmunodetección tras el ensayo de saturación con la proteína recombinante PDF-2 de *Trypanosoma cruzi*, ambas bandas desaparecen (figura D.IV.2.)

D.IV.1.2. Estudios de inmunofluorescencia

Se llevaron a cabo estudios de inmunofluorescencia indirecta para determinar la localización celular de la PDF-1 y PDF-2 de *T. brucei*. Para ello se siguió el protocolo descrito en materiales y métodos ensayando diluciones de 1:500 y 1:1000 del anticuerpo policlonal anti-*Tc*PDF-1 y del anticuerpo policlonal anti-*Tc*PDF-2 respectivamente. 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.3. se muestran las fotografías obtenidas para cada anticuerpo. Estas imágenes fueron procesadas empleando el programa “Huygens deconvolution”. La proteína colocaliza con la sonda específica Mitotracker frecuentemente usada para estudios de metabolismo mitocondrial y como marcador de localización de este orgánulo en *Trypanosoma brucei* (Brown et al. 2006). 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 en la figura D.IV.3., al igual que en células de mamífero, *Plasmodium*

spp y plantas, tanto la PDF-2 como la PDF-1 de *T. brucei* presentan una clara localización mitocondrial.

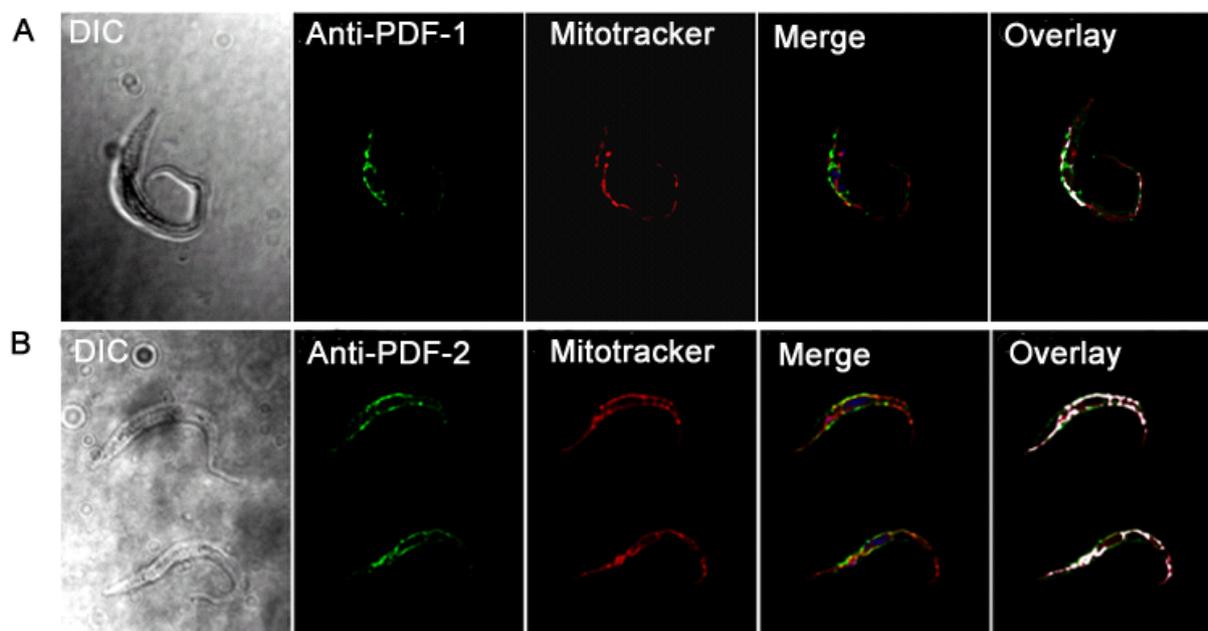


Figura D.IV.3. Inmunofluorescencia de formas procíclicas de *T. brucei* de la cepa salvaje (*T. brucei* 449). Localización intracelular de A) PDF1 y B) PDF2. En la figura se observan células visualizadas por contraste interdifereencial (DIC); anti-*Tc*PDF-1 y anti-*Tc*PDF-2 marcado con fluoresceína (FITC); fluorescencia correspondiente a Mitotracker y superposición de fluorescencia de fluoresceína y Mitotracker.

D.V. PAPEL DE LA PDF-1 Y PDF-2 DE *Trypanosoma brucei* EN LA PROLIFERACIÓN CELULAR

Con el fin de establecer el papel de la PDF-1 y PDF-2 en la proliferación de las formas procíclica y sanguínea de *Trypanosoma brucei* y de este modo determinar su importancia en el metabolismo celular y su potencial terapéutico, se utilizó la estrategia de RNAi para producir el silenciamiento génico tanto de PDF-1 como de PDF-2 y estudiar las consecuencias de la depleción de los niveles de cada enzima sobre la proliferación y algunos aspectos del metabolismo celular. El RNA de doble cadena que desencadena la degradación de RNA mensajero se generó mediante la estrategia de producción de una estructura tallo-lazo o “stuffer”.

D.V.1. Construcción de plásmidos para el silenciamiento génico mediante RNAi de PDF-1 y PDF-2

En el caso de la estrategia de estructura tallo-lazo, un fragmento de 415 pares de bases, correspondiente a la posición 68 y 483, y un fragmento de 791 pares de bases correspondiente a la posición 226-1017 de las secuencias codificantes de la PDF-1 y PDF-2 respectivamente, se clonaron en ambos sentidos separados por una secuencia de DNA denominada “stuffer” en el vector pGR19 para dar los plásmidos pGR19-RNAi-PDF-1 y pGR19-RNAi-PDF-2 (figura D.V.1.). En estos vectores la transcripción tiene lugar a partir del promotor PARP, y al clonar las cadenas en sentido opuesto se genera un RNA de doble cadena unido por la secuencia del “stuffer”, adoptando la estructura final de tallo-lazo. Estos vectores 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. Por otra parte presentan la secuencia del espaciador ribosomal de DNA, la cual permite la integración 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.

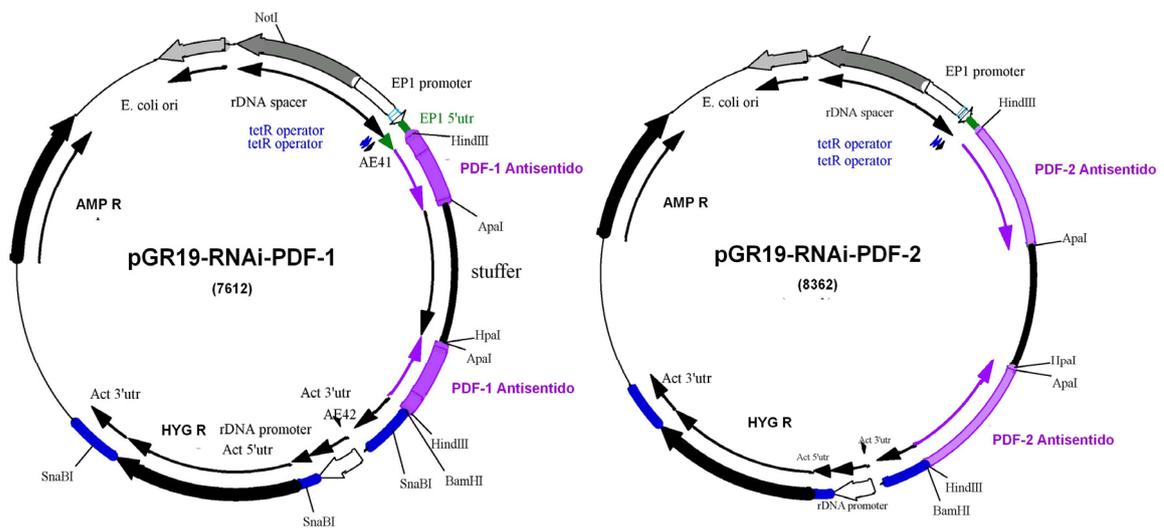


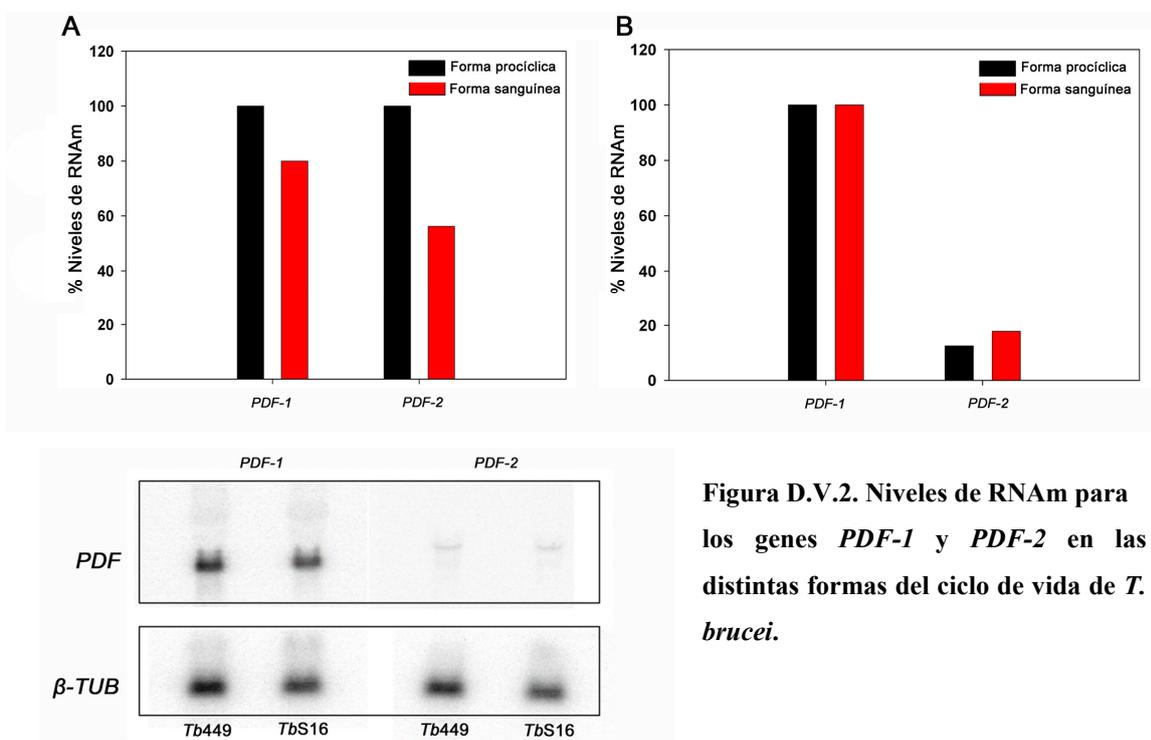
Figura D.V.1. Plásmidos de transfección pGR19-RNAi-PDF-1 y pGR19-RNAi-PDF-2 para el silenciamiento de los genes de la PDF-1 y PDF-2, respectivamente, de *T. brucei*.

D.V.2. Transfección de *T. brucei*

La transfección de células de *T. brucei* se realizó mediante electroporación siguiendo las condiciones descritas en materiales y métodos en *T. brucei* 449 (forma procíclica). La selección de los clones se realizó por dilución límite, dependiendo del fármaco utilizado, del marcador de resistencia a antibiótico presente en cada plásmido.

D.V.3. Estudio del efecto del RNAi de PDF1 y PDF2 sobre la proliferación celular

En primer lugar, para verificar la presencia de PDF-1 y PDF-2 se estudiaron los niveles de RNAm presentes tanto en la forma procíclica como en la forma sanguínea de *T. brucei* por análisis de Northern blot. En la figura D.V.2. se muestra el resultado y pone de manifiesto diferencias en los niveles de RNA mensajero entre las distintas formas del ciclo de vida para cada una de estas proteínas. En el caso de la PDF-1 los niveles de RNAm parecen ser ligeramente inferiores en la forma sanguínea en comparación a la forma procíclica. Sin embargo en el caso de la PDF-2, la forma sanguínea parece tener niveles cercanos al 50% en relación a la forma procíclica. Sin embargo, tanto en la forma procíclica como en la forma sanguínea los niveles de RNAm de PDF-2 son hasta 8 y 6 mas bajos que los de PDF-1 respectivamente.



D.V.3.1. La depleción de PDF-1 y PDF-2 genera alteraciones de la proliferación de las formas procíclicas de *Trypanosoma brucei*

Para estudiar el efecto del silenciamiento del gen de la PDF-1 y PDF-2 sobre la proliferación celular se realizó la inducción del RNAi con doxiciclina utilizando las respectivas construcciones y en las distintas líneas celulares.

Los resultados del perfil de crecimiento de las líneas celulares en medio de cultivo SDM-79 suplementado con 10 % de suero bovino fetal inactivado (SBF) están recogido en las figuras D.V.3. y D.V.4. Tanto en la línea celular donde se ha inducido el fenómeno de RNAi de PDF-1 como en la línea celular donde se ha inducido el RNAi de PDF-2 se observa una disminución significativa en la proliferación celular a partir del cuarto día post-inducción.

Para los cultivos control e inducidos se analizaron los niveles de RNAm a los días 2 y 4 post-inducción mientras que los niveles de proteína se determinaron al octavo día de la inducción utilizando el anticuerpo anti-*Tc*PDF-2 y anti-*Tc*PDF-1 respectivamente (figuras D.V.3. y D.V.4.).

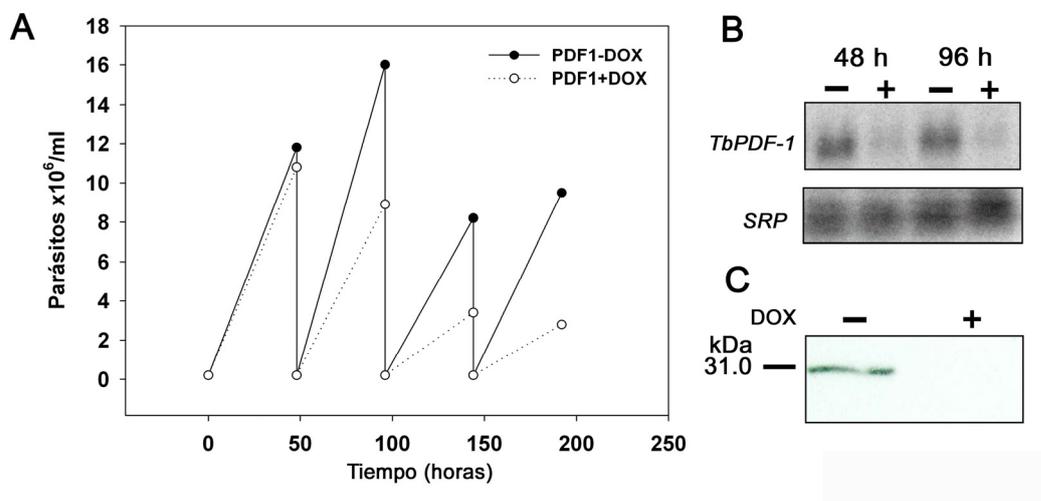


Figura D.V.3. Efecto del RNAi sobre el crecimiento celular y niveles de PDF-1 de *T. brucei* 449/pGR19-RNAi-PDF-1. A) Curvas de crecimiento de *T. brucei* 449/pGR19-RNAi-PDF-1 en SDM-79 con 10 % de SBF, en ausencia (●) o en presencia (○) de doxiciclina. B) Niveles de RNAm de *PDF-1* determinados mediante *Northen blot* en presencia o ausencia de 1 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de doxiciclina a los 8 días de inducción. C) Niveles de PDF-1 intracelular determinados mediante *Western blot* de extractos de 2.5×10^6 parásitos cultivados en presencia o ausencia de 1 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de doxiciclina a los 8 días de inducción.

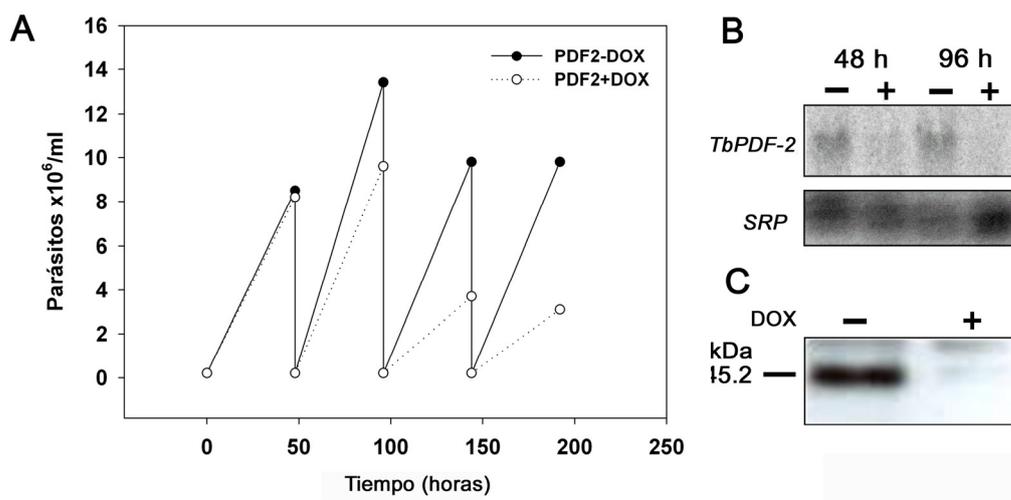


Figura D.V.4. Efecto del RNAi sobre el crecimiento celular y niveles de *PDF-2* de *T. brucei* 449/pGR19-RNAi-PDF-2. A) Curvas de crecimiento de *T. brucei* 449/pGR19-RNAi-PDF-2 en SDM-79 con 10 % de SBF, en ausencia (●) o en presencia (○) de doxiciclina. B) Niveles de RNAm de *PDF-2* determinados mediante *Northen blot* en presencia o ausencia de 1 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de doxiciclina a los 8 días de inducción. C) Niveles de *PDF-2* intracelular determinados mediante *Western blot* de extractos de 2.5×10^6 parásitos cultivados en presencia o ausencia de 1 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de doxiciclina a los 8 días de inducción.

D.V.4. Consecuencias de la depleción de *TbPDF-1* y *TbPDF-2* sobre la función mitocondrial

La actividad péptido deformilasa ha sido asociada al procesamiento post-traducciona de proteínas nacientes una vez que la metionina inicial emerge del ribosoma. En eucariotas la determinación de la localización intracelular de esta enzima ha establecido que es mitocondrial en mamíferos (Coustou et al. 2003; Serero et al. 2003) y plantas (aunque también contienen una PDF en plastidios) (Fieulaine et al. 2005) mientras que se encuentra en el apicoplasto en *Plasmodium spp* (Bracchi-Ricard et al. 2001). Estas observaciones sugieren que la PDF podría estar asociada al procesamiento de proteínas codificada por los genomas en orgánulos.

En el caso de la mitocondria, algunas de estas proteínas son componentes esenciales de la cadena respiratoria y especialmente del complejo de la ATP sintetasa que cataliza la síntesis de ATP y genera la fuerza protón motriz necesaria para que tenga lugar el importe al orgánulo de gran parte de metabolitos y proteínas codificados en el núcleo(Boelens and Gualerzi 2002) (Schnauffer et al. 2005; Schneider et al. 2008). Es posible que la pérdida de viabilidad observada tras la depleción de PDF-1 y PDF-2, en

parte, pueda deberse a una alteración de la función mitocondrial tras la inducción del RNAi. Para determinar posibles alteraciones en el potencial de membrana mitocondrial se realizaron experimentos empleando tinción con Mitotracker, una sonda utilizada para la visualización de la mitocondria.

La eficiencia de la tinción con Mitotracker depende de la presencia de un potencial de membrana estable. Se llevaron a cabo análisis tanto con microscopía de fluorescencia como con citometría de flujo. Los ensayos se realizaron con la línea celular de la forma procíclica *T. brucei* 449/pGR19PDF-1 y *T. brucei* 449/pGR19PDF-2 al octavo día de inducción donde se alcanza el punto de máximo fenotipo de pérdida de viabilidad.

En ambos casos tanto para la inducción de la interferencia de PDF-1 como de PDF-2 se puede observar una reducción de la intensidad de fluorescencia debido a la incorporación de Mitotracker, siendo este más significativo en el caso de PDF-1. Estudios de microscopía de fluorescencia pusieron de manifiesto también un descenso en la intensidad de fluorescencia en parásitos donde se ha inhibido la expresión de PDF-1 y PDF-2. Estas observaciones indican una alteración del potencial de membrana mitocondrial (figura D.V.5.).

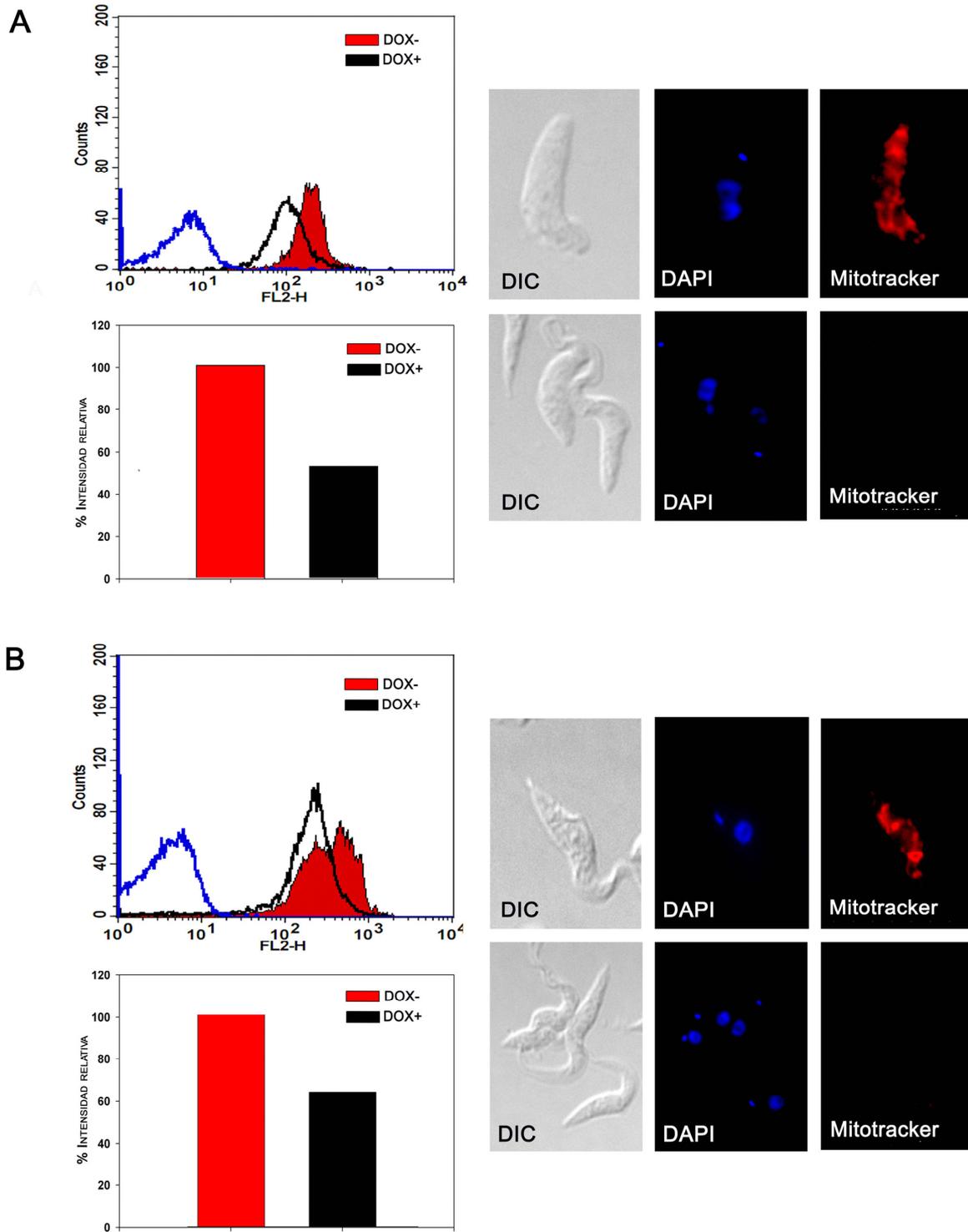


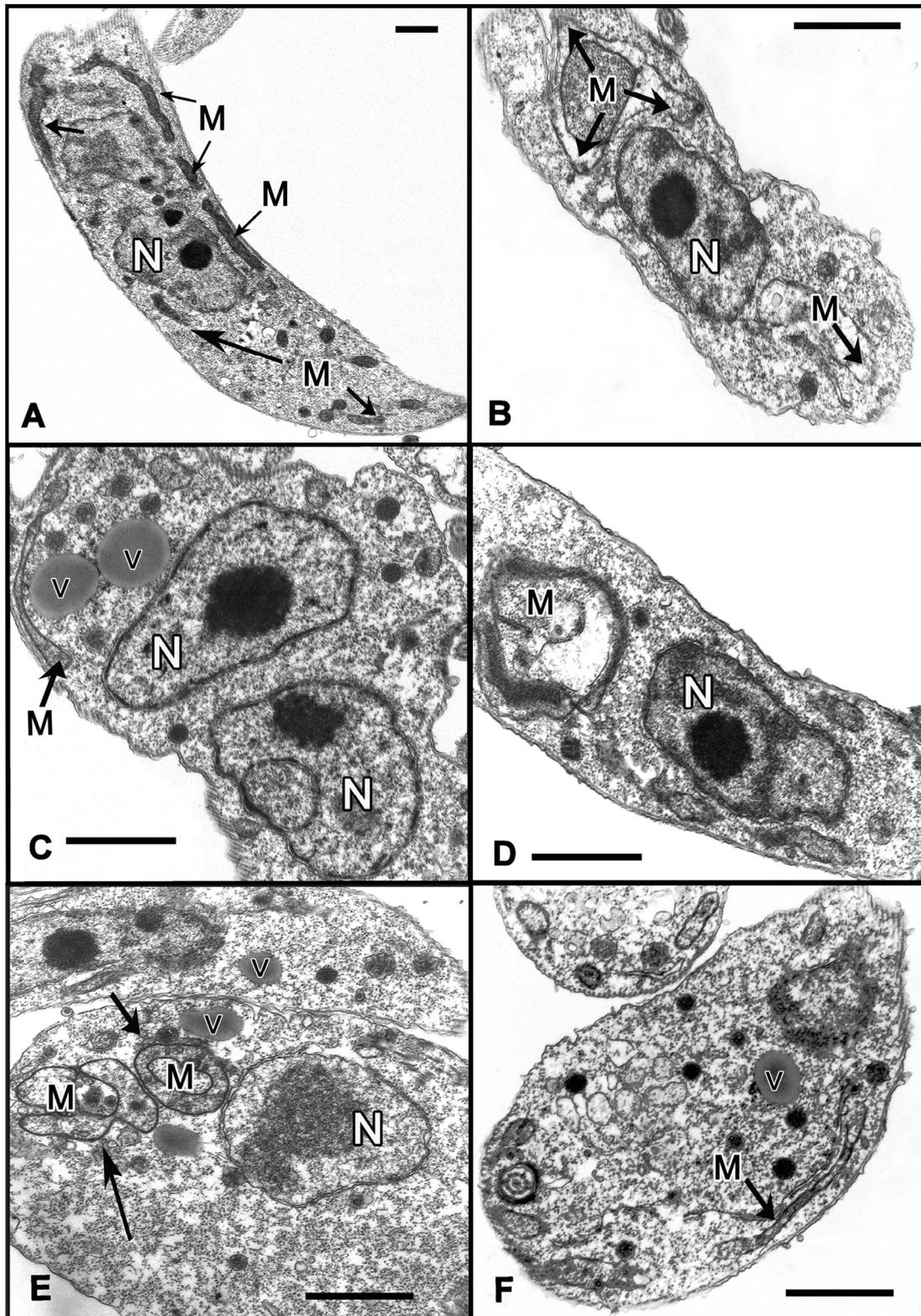
Figura D.V.5. Análisis por citometría de flujo del efecto de la interferencia de PDF-1 y PDF-2 en la forma procíclica de *T. brucei* sobre el potencial de membrana mitocondrial. Los parásitos fueron incubados con MitoTracker Red CMXRos (Molecular Probes). A) Intensidad de fluorescencia relativa de parásitos donde se ha inducido la depleción de PDF-1. B) Intensidad de fluorescencia relativa de parásitos donde se ha inducido la depleción de PDF-2. Los análisis se llevaron a cabo al octavo día de inducción de la interferencia.

D.V.5. Una reducción de los niveles de PDF-1 y PDF-2 producen alteraciones en la ultraestructura celular en la forma procíclica de *Trypanosoma brucei*

En tripanosomátidos, el potencial de membrana mitocondrial juega un papel fundamental en el metabolismo del orgánulo, canalizando la translocación de iones y metabolitos del citoplasma a la mitocondria. (Schneider et al. 2008). Las alteraciones en el potencial de membrana mitocondrial, además de repercutir en el metabolismo celular pueden estar acompañadas de posibles cambios morfológicos. Para evaluar cambios en la morfología se procedió al análisis de las formas procíclicas de *T. brucei* en las cuales se ha inducido el fenómeno de interferencia para PDF-1 y PDF-2, mediante microscopía electrónica de transmisión.

En la figura D.V.6. puede apreciarse el aspecto típico de la mitocondria de las células control, caracterizada por una forma tubular generalmente alargada y ramificada que se extiende a lo largo del eje longitudinal de la célula y donde la matriz exhibe una apariencia electrodensa que contrasta con el resto de componentes celulares. Sin embargo en las células donde se ha inducido el fenómeno de RNAi, tanto de PDF-1 como de PDF-2, la mitocondria pierde su apariencia electrodensa y presenta además importantes modificaciones en la morfología, especialmente a nivel de la membrana interna la cual parece plegarse hacia la matriz formando estructuras complejas (Figura D.V.6.). También se observa una distensión de la membrana mitocondrial que aparece, en algunos casos, rodeando vesículas translúcidas y que, a diferencia de las células control, están presentes en mayor número y tamaño. Finalmente se observa un elevado número de vesículas electrodensas que parecen corresponder a partículas lipídicas.

Figura D.V.6. Microscopia electrónica de transmisión de las formas procíclicas de *T. brucei* tras 8 días de inducción de la interferencia de PDF-1 y PDF-2. A) Células control donde no se ha inducido el fenómeno de RNAi. B),C),D) Células donde se ha inducido la interferencia de la expresión de PDF-1. E), F) Células donde se ha inducido la interferencia de la expresión de PDF-2. M: mitocondria, N: núcleo, V: inclusiones citoplasmáticas.



D.VI. EFECTO DEL SILENCIAMIENTO DE PDF-1 Y PDF-2 SOBRE EL METABOLISMO LIPÍDICO

Las imágenes de microscopía electrónica sugieren una profunda alteración de estructuras de membrana y una modificación de la homeostasis lipídica. En una primera aproximación para el análisis de la naturaleza de las vesículas electrodensas observadas en las células donde se ha inducido el RNAi tanto para PDF-1 como para PDF-2 se realizaron estudios de tinción con rojo Nilo. Este compuesto constituye una excelente sonda para la detección de inclusiones lipídicas por microscopía de fluorescencia y citometría de flujo (Greenspan et al. 1985). En la figura D.VI.1. puede observarse el patrón de distribución de rojo Nilo el cual tiene un elevado número de vesículas en las células inducidas lo que confirma el carácter lipídico de las mismas.

Del mismo modo se hicieron estudios con el antibiótico poliénico Filipina el cual se asocia de manera específica con esteroides y análogos emitiendo una señal visible por microscopio de fluorescencia (Robinson and Karnovsky 1980). En la figura D.VI.2. se puede observar que al inducir la interferencia de PDF-1 y PDF-2 se produce un cambio en la distribución de la sonda Filipina apreciándose en algunos casos pequeñas agrupaciones a lo largo de la membrana flagelar en relación a los parásitos control donde la fluorescencia parece seguir un patrón más uniforme. Estos resultados confirman una profunda perturbación de la homeostasis de lípidos en estas líneas celulares.

Alteraciones morfológicas a nivel de la mitocondria así como estructuras lipídicas similares han sido observadas en *Trypanosoma cruzi* y *Leishmania spp* en estudios con inhibidores de la biosíntesis de esteroides donde vienen acompañadas de perturbaciones del tráfico vesicular así como fenómenos de autofagia. Estas alteraciones se han vinculado a la estrecha relación que existe entre el metabolismo mitocondrial y la homeostasis de lípidos. La membrana mitocondrial de tripanosomátidos contiene cantidades significativas de esteroides endógenos y exógenos que serían esenciales para el mantenimiento de la funcionalidad y estructura de la membrana mitocondrial, especialmente la membrana interna (Rodrigues et al. 2001; Rodrigues et al. 2002). Vesículas similares también han sido observadas en levaduras donde aparentemente cumplen papeles de almacenamiento de triacilglicerol y ésteres de colesterol (Wagner et al. 2009) los cuales son movilizados cuando se requieren por parte del metabolismo celular.

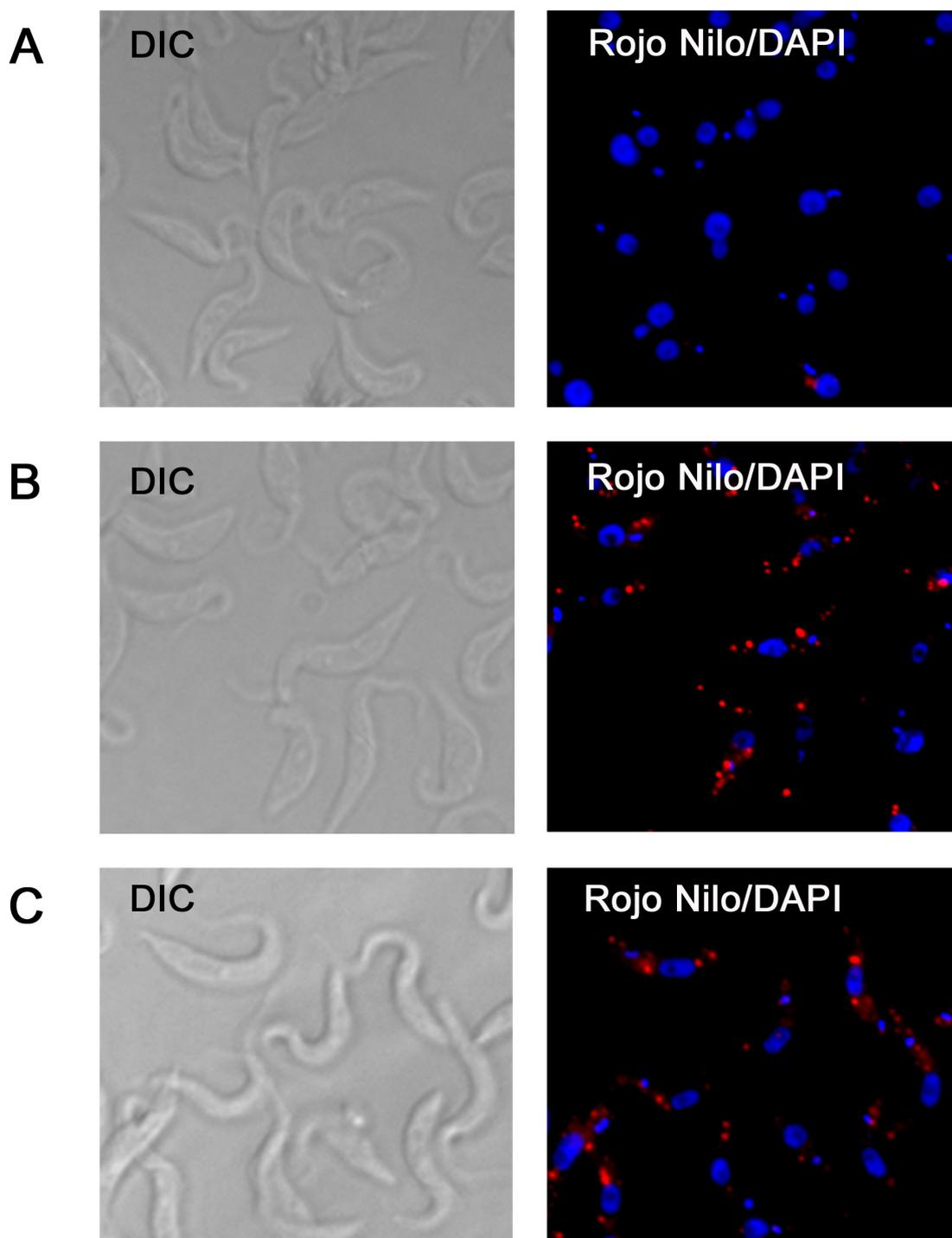


Figura D.VI.1. Tinción con rojo Nilo de células de la forma procíclica de *Trypanosoma brucei*.

A) Parásitos control donde no se ha inducido el fenómeno de RNAi. B) Parásitos donde se ha inducido el silenciamiento de la expresión de PDF-1. C) Parásitos donde se ha inducido el silenciamiento de la expresión de PDF-2.

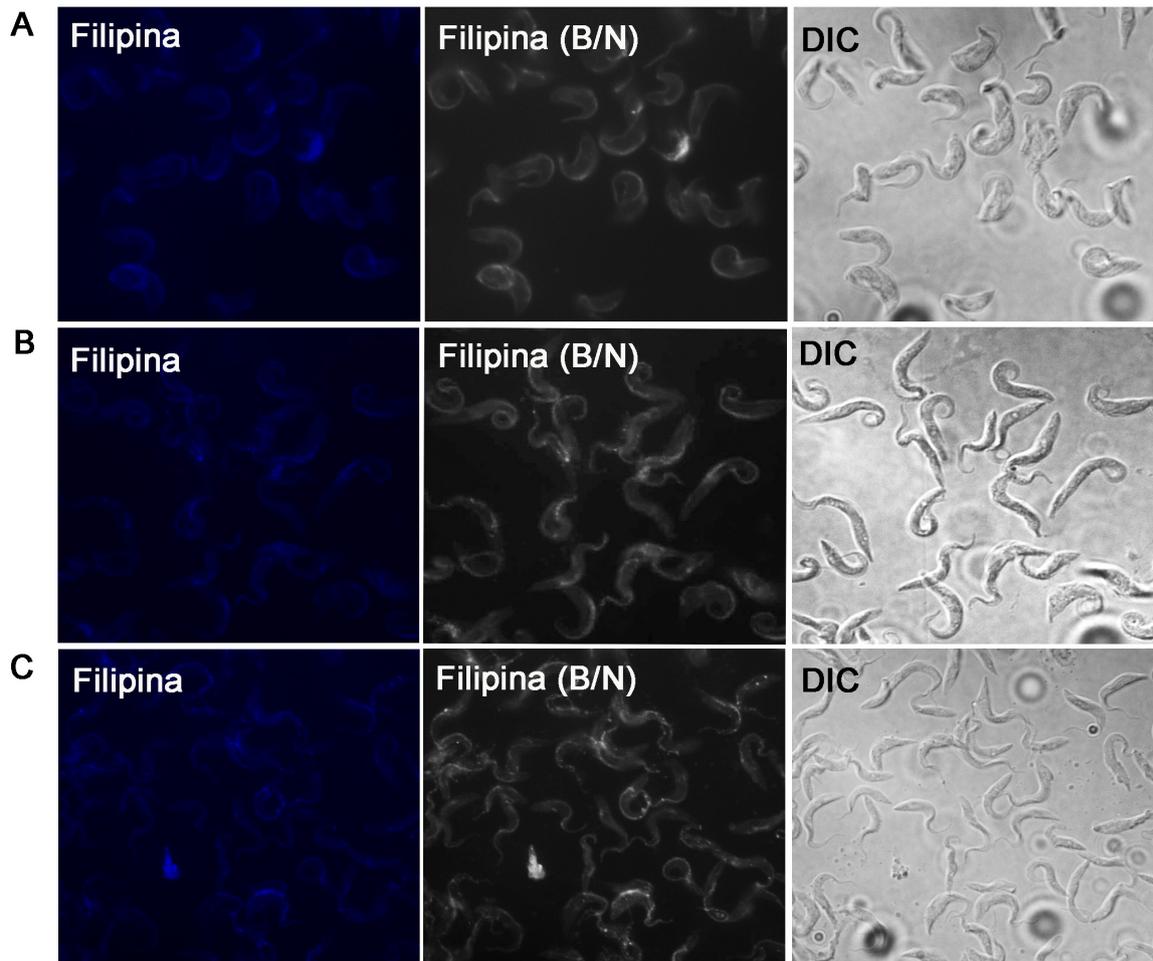


Figura D.VI.2. Patrón de tinción de la forma procíclica de *Trypanosoma brucei* con la sonda específica para esteroides Filipina. A) Formas procíclicas de la línea celular control Tb449 donde no se ha inducido el fenómeno de RNAi. B) Formas procíclicas donde se ha inducido la depleción de PDF-1. C) Formas procíclicas donde se ha inducido la depleción de PDF-2. En la segunda columna se observa la fluorescencia debida a Filipina en blanco y negro.

D.VI.1. Cuantificación del contenido de ácidos grasos totales en parásitos donde se han deplecionado los niveles de PDF-1 y PDF-2

La acumulación de vesículas lipídicas observada en las imágenes de la tinción con rojo Nilo así como también en las de microscopio electrónica, pudieran ser un indicativo de alteraciones en el metabolismo de ácidos grasos producto del daño morfológico a nivel mitocondrial que pudiera estar perturbando la incorporación de ácidos grasos al proceso de β -oxidación el cual es un proceso central en el metabolismo energético de células eucariotas y algunas bacterias con la consecuente acumulación a nivel citoplasmático. Para confirmar la posible acumulación de ácidos grasos en parásitos donde se ha inducido o no la interferencia de PDF-1 y PDF-2, se procedió a extraer y cuantificar el contenido de ácidos grasos totales en estas líneas celulares. Los resultados en la figura VI.3. parecen indicar que contrario a lo esperado se observa una ligera disminución en el contenido de ácidos grasos totales en la línea donde se ha inducido la interferencia de PDF-1 en relación a los parásitos sin inducir. Esta disminución en el contenido de ácidos grasos es menos aparente en la línea donde se ha inducido la interferencia de PDF-2 .

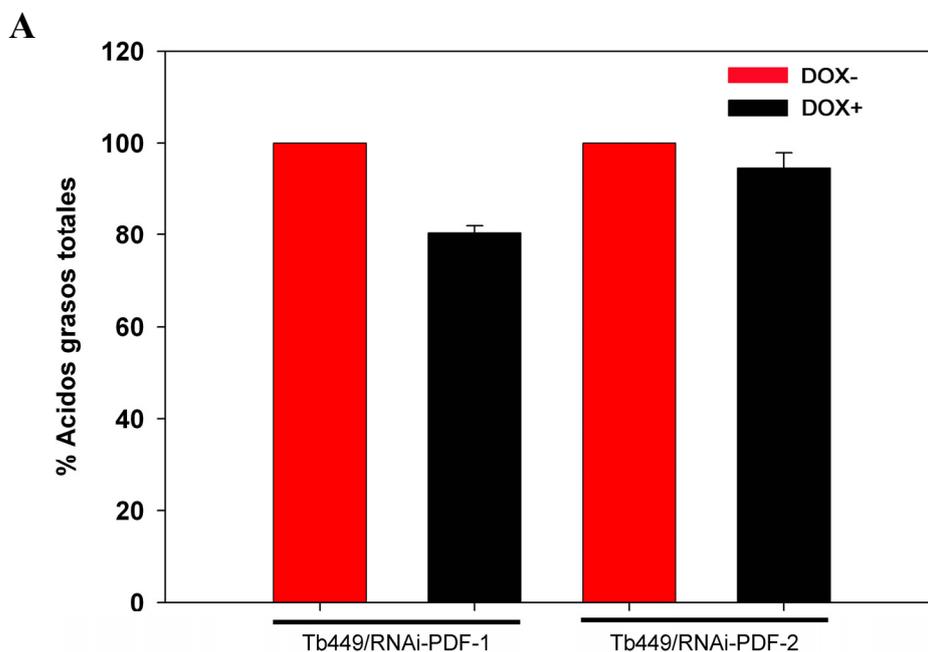


Figura D.VI.3. Contenido de ácidos grasos totales en parásitos de la forma procíclica de *T. brucei* donde se ha inducido la interferencia de la expresión de PDF-1 y PDF-2

D.VI.2. La inhibición de la expresión de *TbPDF1* produce alteraciones en la composición de esteroides

Los lípidos totales de las formas procíclicas fueron extraídos y separados en lípidos polares y la fracción neutra. Esta última, compuesta principalmente por esteroides, fue analizada por cromatografía gas-líquido acoplado a espectrometría de masas. Como se observa en la tabla D.VI.4a., la reducción en los niveles de *TbPDF-1* da lugar a una modificación significativa del perfil de esteroides; principalmente tiene lugar la total desaparición de ergosterol y de precursores como colestano 5,7,24-trienol presentes en cantidades significativas en la línea parental y que han sido reemplazados por el colesterol como esteroide mayoritario.

Estudios de marcaje metabólico usando ^3H -mevalonato confirman que la síntesis de esteroides está bloqueada en algún punto de la ruta metabólica (figura D.VI.5.) ya que se puede apreciar una menor incorporación en la zona correspondiente al producto final, en este caso ergosterol, en las células donde se ha silenciado la expresión de PDF-1 en relación al control sin inducir.

Estudios realizados en nuestro laboratorio han contribuido a determinar la compartimentación celular de la ruta de biosíntesis de isoprenoides y esteroides. Las enzimas 3-hidroxi-3-metil-glutaril Coenzima A sintasa (HMGCoAS) y 3-hidroxi-3-metil-glutaril Coenzima A reductasa (HMGCoAR), que participan en la producción de mevalonato, un precursor esencial de isoprenoides y esteroides, presentan una localización mitocondrial (Carrero-Lerida et al. 2009; Pena-Díaz et al. 2004).

Es posible que las alteraciones en la morfología y función mitocondrial puedan repercutir sobre las etapas tempranas de la biosíntesis lo que tendría un impacto sobre la síntesis endógena. Dado que se requiere la síntesis endógena para la correcta proliferación celular en formas procíclicas, se ha analizado el efecto de la terbinafina, un inhibidor de la escualeno epoxidasa y del ketoconazol, un inhibidor de la esteroide 14- α desmetilasa sobre la línea celular RNAi/PDF-1 de la forma procíclica de *T. brucei* que presenta alteraciones en la composición y biosíntesis de esteroides endógenos (Mercer 1993). Las figuras D.VI.6. y D.VI.7. recogen el efecto de ambos fármacos. Un análisis comparado de las distintas líneas celulares muestra que las células deficientes en PDF-1 presentan una cierta hipersensibilidad a terbinafina y a ketoconazol.

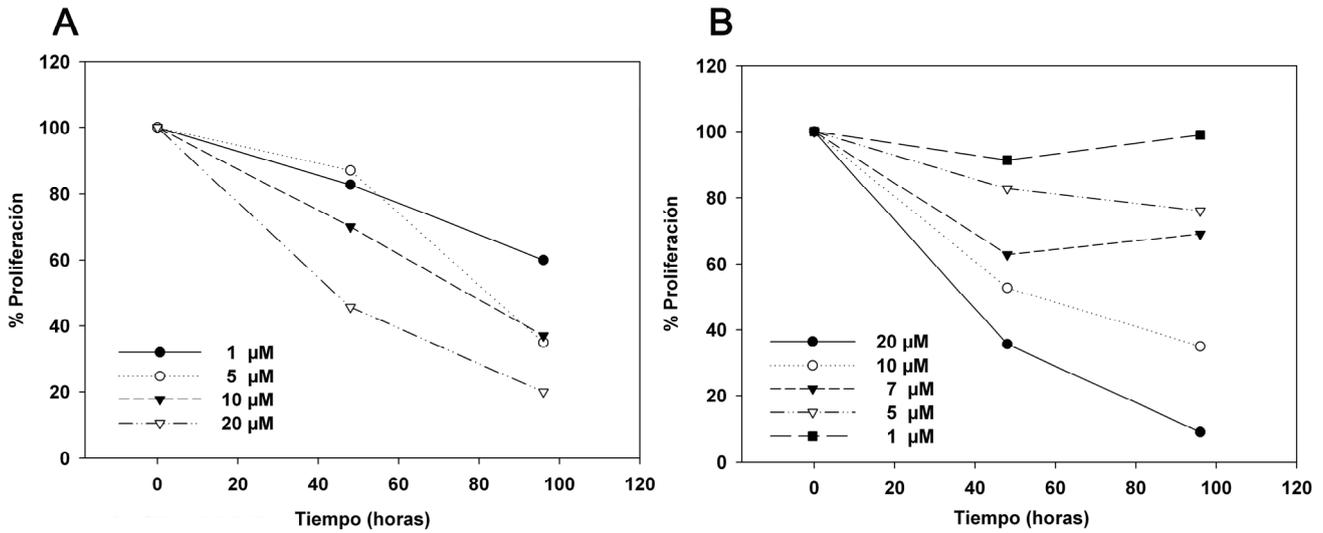


Figura D.VI.6. A) Efecto antiproliferativo de terbinafina y B) ketoconazol en la línea celular Tb449/RNAiPDF-1 de la forma procíclica de *Trypanosoma brucei*.

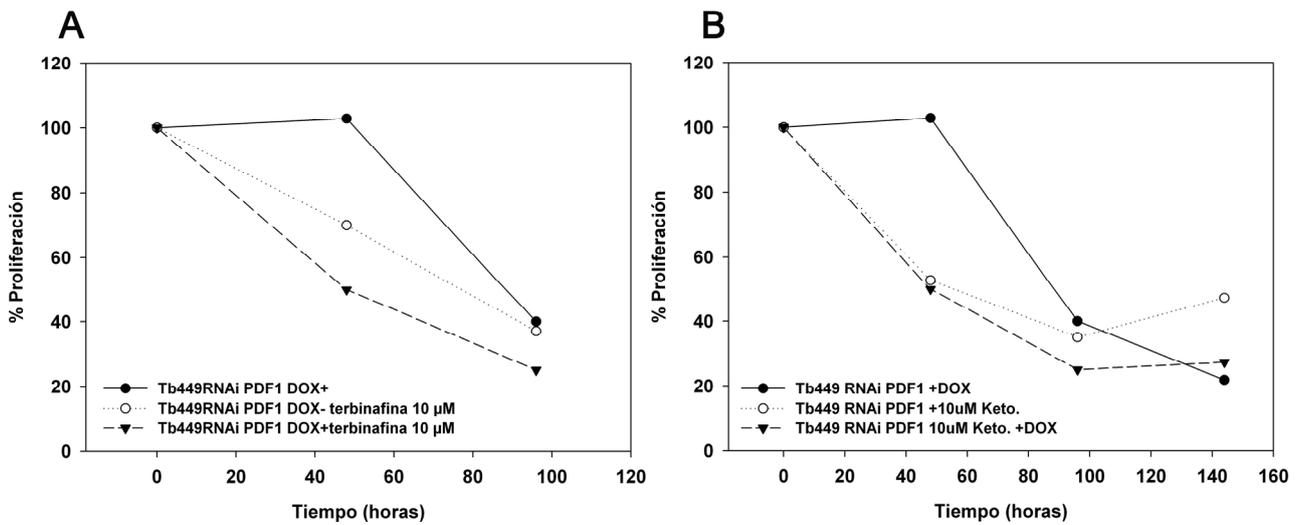


Figura D.VI.7. Efecto antiproliferativo de la terbinafina (A) y del ketoconazol (B) en la líneas celular de la forma procíclica de *T. brucei* donde se han deplecionado los niveles de PDF-1. A) Análisis del porcentaje de proliferación de la línea celular Tb449/RNAiPDF-1 en presencia de 1 µg/mL de doxiciclina (●), 10 µM de terbinafina (○), y después de la adición simultánea de terbinafina y doxiciclina 1 µg/mL (▼). B) Análisis del porcentaje de proliferación de la línea celular Tb449/RNAi PDF-1 presencia de 1 µg/mL de doxiciclina (●), 10 µM de ketoconazol (○), y después de la adición simultanea de ketoconazol y doxiciclina 1 µg/mL (▼).

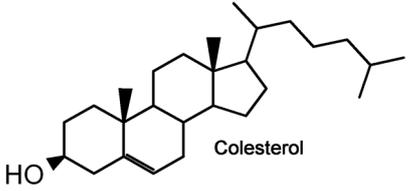
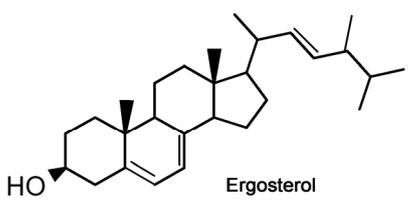
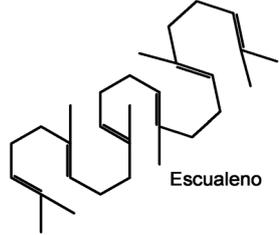
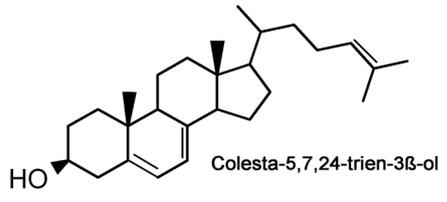
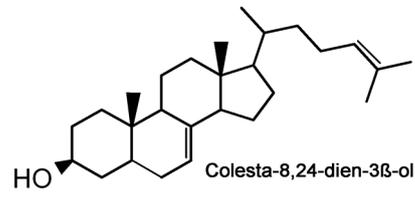
Estructura molecular	Tiempo de retención	Tb449	Tb449 RNAiPDF1 -DOX	Tb449 RNAiPDF1 +DOX
 <p>Cholesterol</p>	21.7	75.18	90.5	95.5
 <p>Ergosterol 24-metil-5,7,22-colesta-trien-3β-ol</p>	24.31	7.95	N.D	N.D.
 <p>Escualeno</p>	16.07	2.38	3.5	4.46
 <p>Colesta-5,7,24-trien-3β-ol</p>	23.14	12.8	6	N.D.
 <p>Colesta-8,24-dien-3β-ol</p>	22.7	1.7	N.D	N.D

Figura D.VI.4a. Efecto de la interferencia de la expresión de PDF-1 sobre la composición de esteroides libres de las formas procíclicas de *T. brucei* (Tb449) cultivados en medio SDM-79 suplementado con suero bovino fetal al 10% en fase exponencial. Los esteroides fueron separados de los lípidos polares por cromatografía en ácido silícico y analizados cuantitativamente por cromatografía gas líquido acoplado a un espectrómetro de masas. Los resultados están expresados como porcentajes de masa relativos.

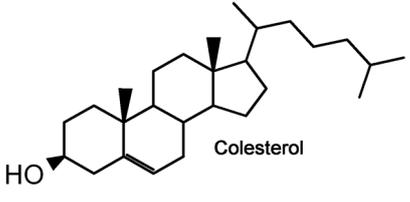
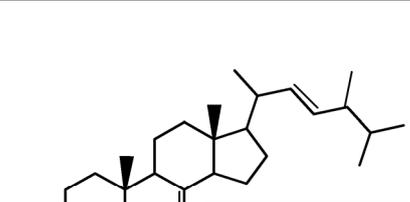
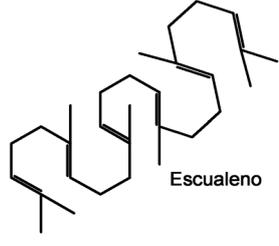
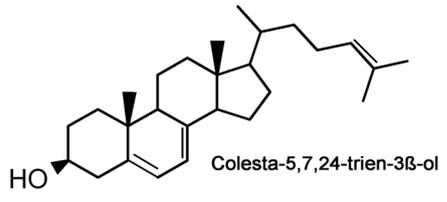
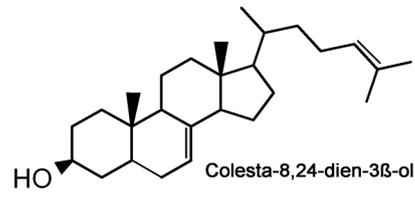
Estructura molecular	Tiempo de retención	Tb449	Tb449 RNAiPDF2 -DOX	Tb449 RNAiPDF2 +DOX
 <p>Cholesterol</p>	21.7	75.18	74.6	72.18
 <p>Ergosterol 24-metil-5,7,22-colesta-trien-3β-ol</p>	24.31	7.95	10.7	10.9
 <p>Squaleno</p>	16.07	2.38	2.79	2.27
 <p>Colesta-5,7,24-trien-3β-ol</p>	23.14	12.8	8.9	8.5
 <p>Colesta-8,24-dien-3β-ol</p>	22.7	1.7	2.9	1.9

Figura D.VI.4b. Efecto de la interferencia de la expresión de PDF-2 sobre la composición de esteroides libres de las formas procíclicas de *T. brucei* (Tb449) cultivados en medio SDM-79 suplementado con suero bovino fetal al 10% en fase exponencial. Los esteroides fueron separados de los lípidos polares por cromatografía en ácido silícico y analizados cuantitativamente por cromatografía gas líquido acoplado a un espectrómetro de masas. Los resultados están expresados como porcentajes de masa relativos.

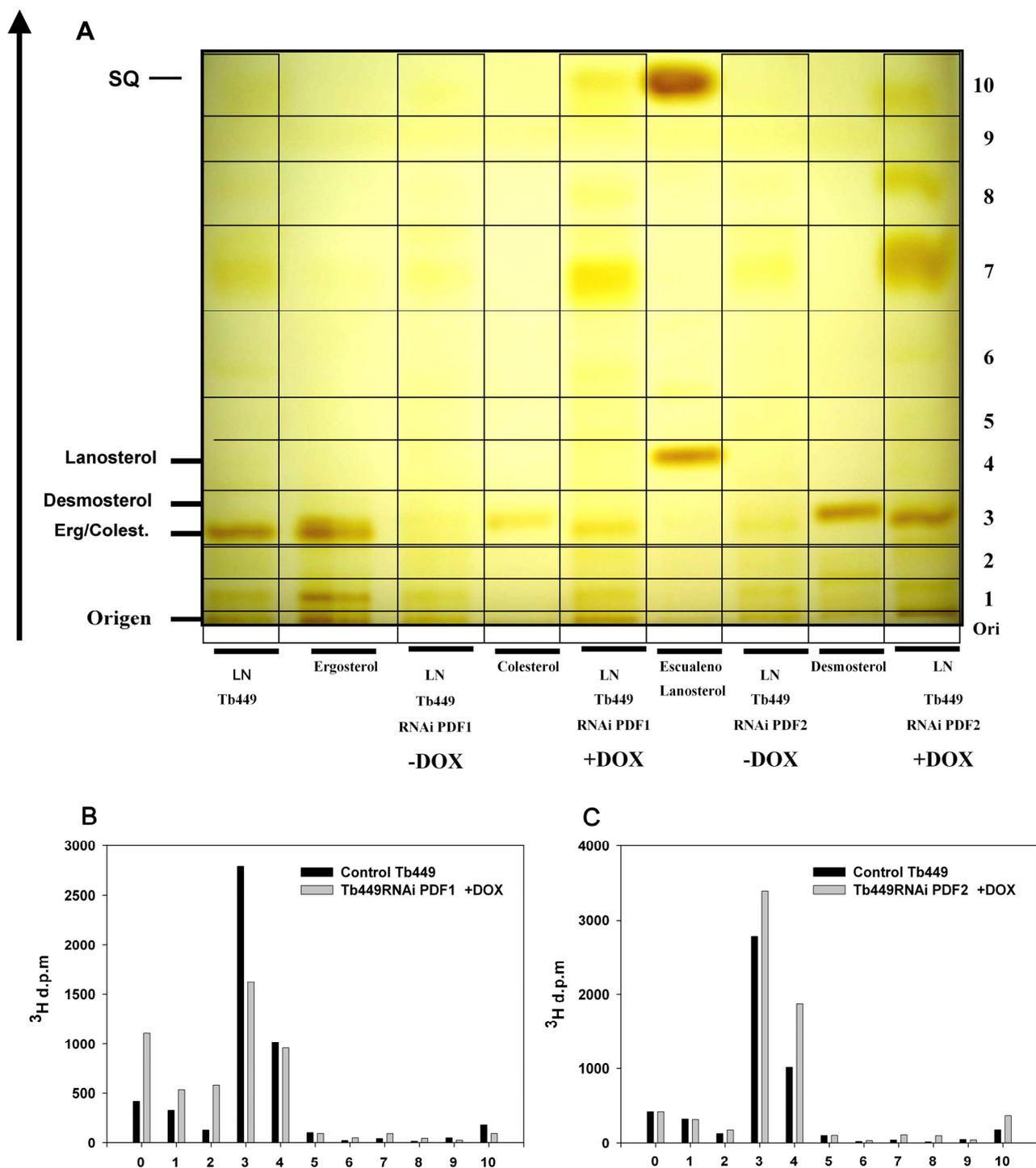


Figura D.VI.5. Efecto de la interferencia de la expresión de PDF1 y PDF2 sobre los niveles de lípidos neutros en la forma procíclica de *Trypanosoma brucei*. Tanto las células control (Tb449) como las líneas celulares RNA PDF-1 y RNAi PDF-2 fueron incubadas en presencia de ^3H -mevalonolactona y se analizó el contenido de lípidos neutros. A) Cromatografía de capa fina (TLC) donde se visualizan los perfiles de lípidos neutros de las líneas celulares con tinción con yodo sublimado. La placa fue dividida en diferentes regiones. La zona 3 corresponde a desmosterol, ergosterol y colesterol y la zona 4) al lanosterol. B) y C) Las diferentes zonas de la placa fueron extraídas y cuantificadas en un contador de centelleo LS 6500 (Beckman Coulter TM)

Del mismo modo se analizaron por *Western blot* los niveles de diferentes enzimas involucradas en la biosíntesis de esteroides en tripanosomátidos con anticuerpos generados en nuestro laboratorio. En primer lugar se analizaron los niveles de la HMG-CoA reductasa (Pena-Díaz et al. 2004) y HMGCoA sintetasa, (Carrero-Lerida et al. 2009) ambas de localización mitocondrial, mevalonato kinasa (MK) de localización glicosomal (Carrero-Lerida et al. 2009), la esterol metil transferasa (SMT) y la escualeno epoxidasa (SQE) las cuales se localizan en el retículo endoplasmático (Perez-Moreno, 2010).

Como se observa en la figura D.VI.8. el análisis por *Western blot* y el correspondiente análisis por densitometría indican diferencias en la expresión de estas enzimas. En el caso de la mevalonato kinasa parece haber un aumento en su expresión en el caso de células donde se ha inducido la interferencia de PDF-1 y PDF-2 en relación al control sin inducir. En el caso de la HMGCoAS por el contrario, hay una disminución en los niveles en células donde se ha silenciado la expresión de PDF-1. Esta observación fue confirmada por estudios de inmunofluorescencia indirecta utilizando el anti-HMGCoAS de localización mitocondrial que revela diferencias entre las células control y las inducidas, siendo evidente una diferencia en la intensidad de la señal así como también en el patrón de distribución del anticuerpo en las células donde se ha inducido el RNAi de PDF-1 y PDF-2 en relación a las células control (figura D.VI.9.).

En células eucariotas se han establecido posibles interacciones estructurales y funcionales a nivel de señalización celular y metabolismo entre la mitocondria y el retículo endoplasmático (Pizzo and Pozzan 2007). Es posible que las drásticas alteraciones observadas a nivel de la morfología mitocondrial en las células donde se ha hecho efectivo el silenciamiento de la expresión de PDF-1 y PDF-2 puedan extenderse a estructuras de membrana como el retículo endoplasmático. Igualmente la aparición de vesículas lipídicas podría ser producto de la acumulación de productos metabólicos sintetizados en el retículo como fosfolípidos que no logran ser incorporados a la membrana mitocondrial (Vance 1990). Para ello se realizaron estudios de inmunofluorescencias con un anticuerpo frente a la BiP, una proteína soluble presente en el lumen del retículo endoplasmático, que está altamente conservada en eucariotas, y se emplea de manera habitual como marcador del retículo endoplasmático de *T. brucei* (Bangs et al. 1996).

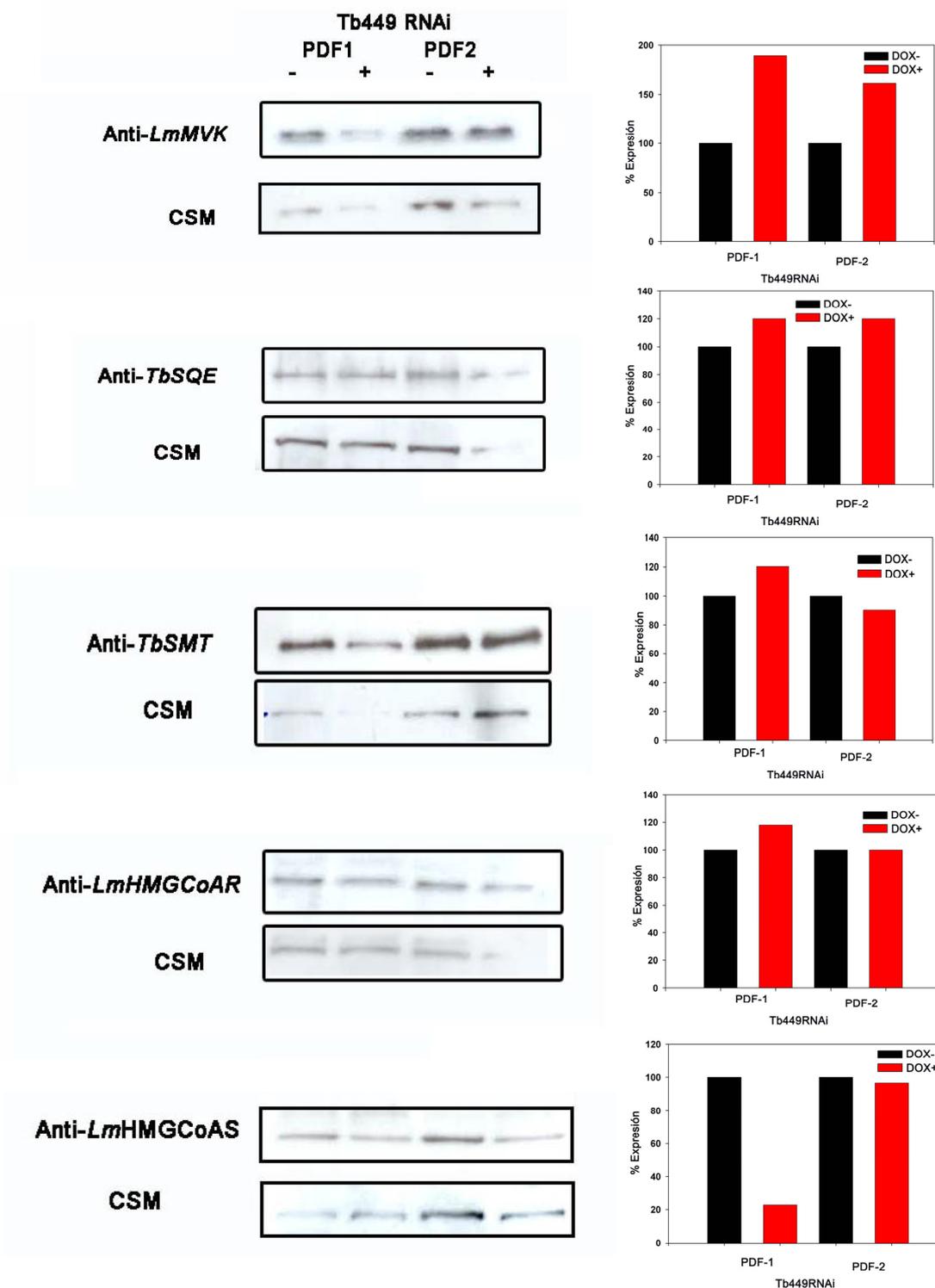


Figura D.VI.8. Análisis de los niveles de expresión de enzimas involucradas en la biosíntesis de esteroides en tripanosomátidos. Extractos totales de parásitos fueron preparados a partir de cultivos de la forma procíclica de *Trypanosoma brucei* donde se ha inducido el fenómeno de RNAi de PDF-1 y PDF-2. Cada carril contiene 2.5×10^6 parásitos. HMGCAR (Pena-Díaz et al. 2004) y HMGCAS, localización mitocondrial (Carrero-Lerida et al. 2009), mevalonato quinasa (MK) localización glicosomal (Carrero-Lerida et al. 2009), esterol metil transferasa (SMT) y escualeno epoxidasa (EPO) localizadas en el retículo endoplasmático (Pérez-Moreno, 2010).

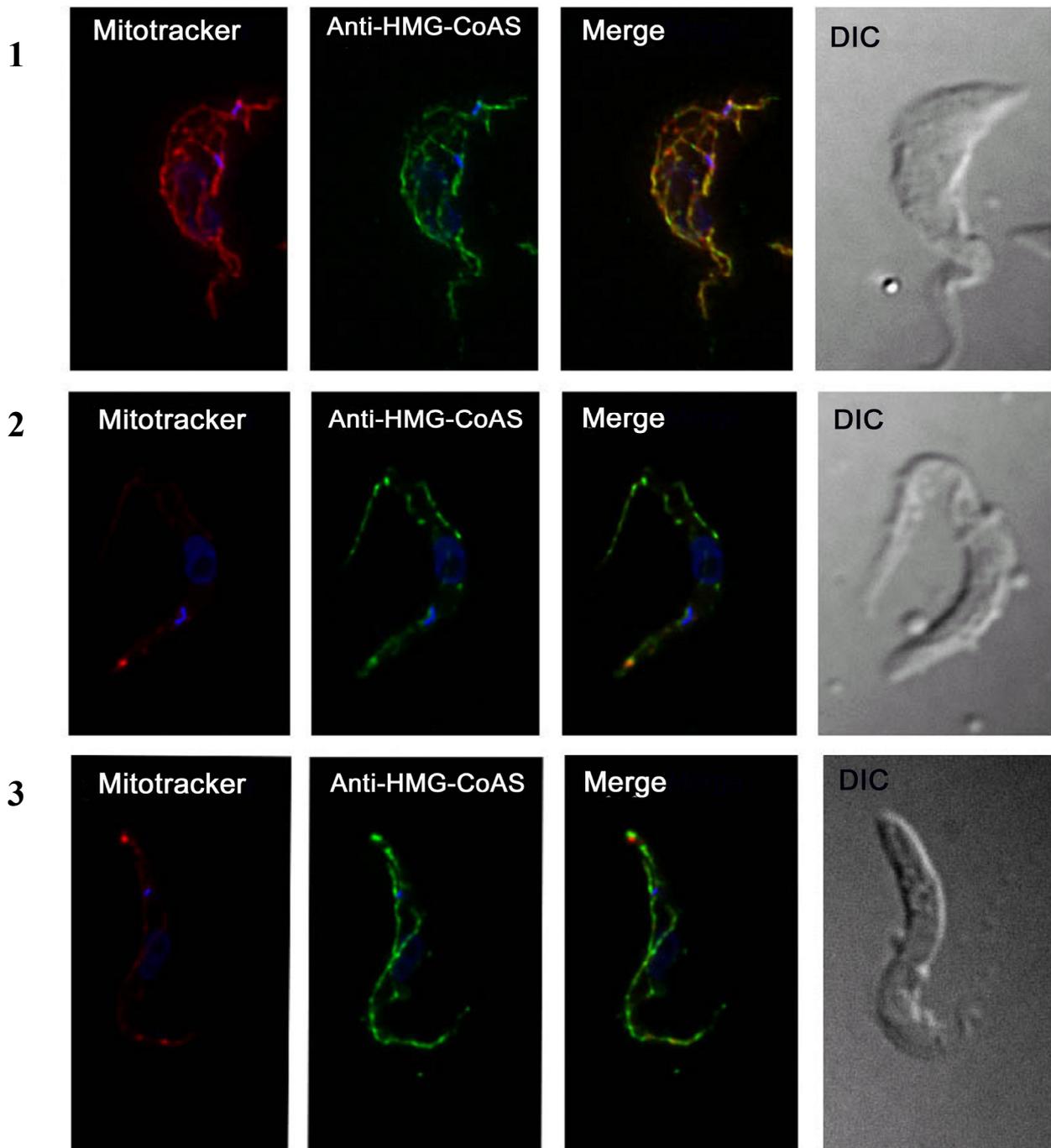


Figura D.VI.9. Inmunofluorescencias de formas procíclicas de *T. brucei*. Patrón de distribución de la proteína HMGCoA sintasa de localización mitocondrial. 1) *Tb449*, 2) *Tb449/RNAiPDF-1* en presencia de doxiciclina y 3) *Tb449/RNAi PDF-2* en presencia de doxiciclina.

En la figura D.VI.10. se presentan preparaciones de células donde se ha inducido el fenómeno de RNAi frente a PDF-1 y PDF-2 no apreciándose alteraciones evidentes en el patrón de distribución del anticuerpo ni en la intensidad de la fluorescencia con respecto a células control.

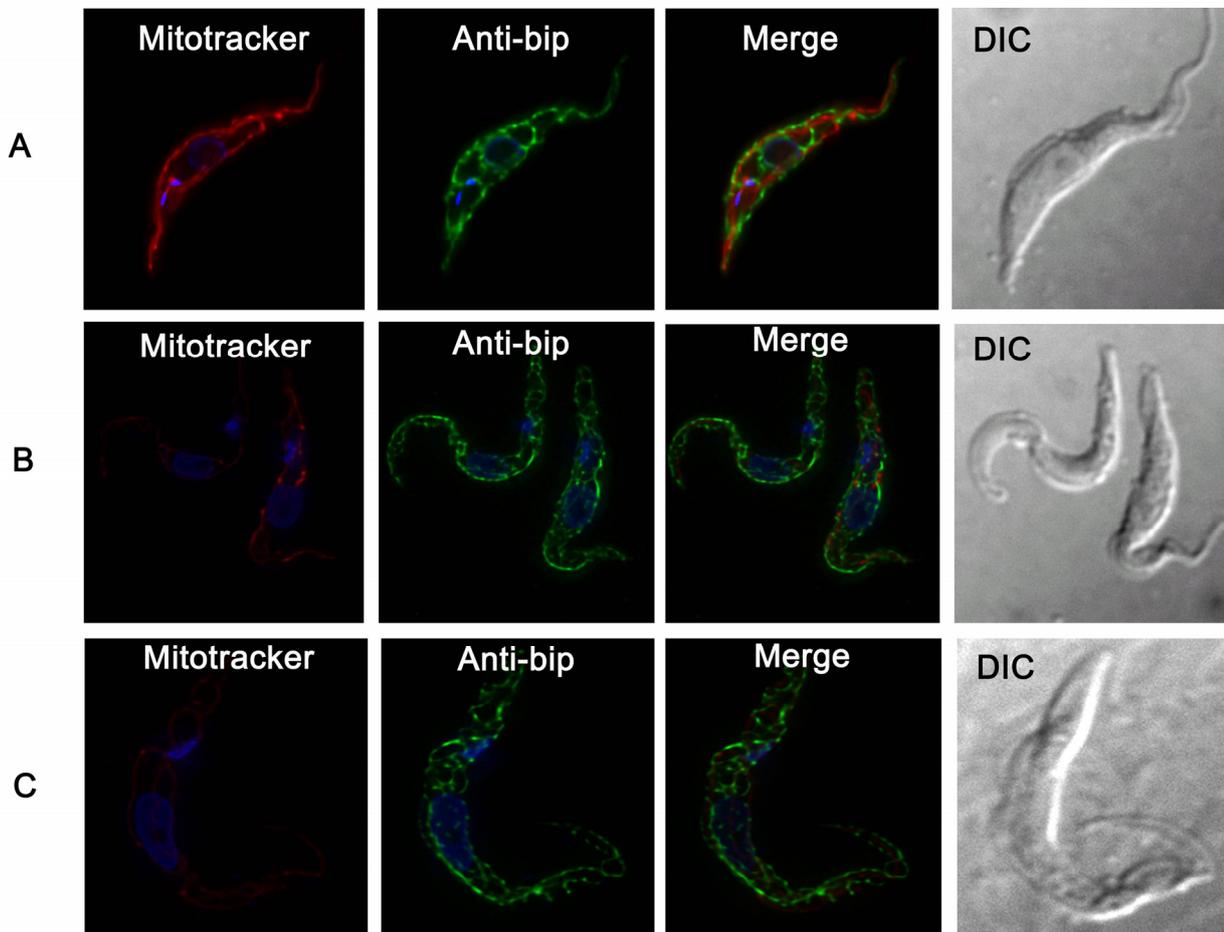


Figura D.VI.10. Inmunofluorescencia de formas procíclicas de *T. brucei*. Patrón de distribución de la proteína BiP localizada en el retículo endoplasmático. A) *Tb449*, B) *Tb449*/RNAiPDF-1 en presencia de doxiciclina y C) *Tb449*/RNAi PDF-2 en presencia de doxiciclina.

D.VII. EFECTO DE LA DEPLECIÓN DE LA ACTIVIDAD PDF-1 SOBRE LA SENSIBILIDAD A OLIGOMICINA

La oligomicina pertenece a una familia de antibióticos producidos por *Streptomyces spp* que presenta una toxicidad selectiva frente a organismos aeróbicos bloqueando la respiración acoplada a la fosforilación oxidativa a través de la inhibición de la ATP sintetasa. Se asocia específicamente con el componente Fo (Lardy 1980) el cual, además de estar compuesto por proteínas codificadas en el núcleo, contiene una subunidad conocida como ATP6 que es codificada por el genoma mitocondrial en *Trypanosoma spp*. Estas proteínas deben ser sintetizadas con un grupo formilo en la primera metionina de la cadena nascente y por lo tanto requieren para su funcionalidad biológica la escisión del grupo formilo a través de la actividad deformilasa. Es concebible que en células donde se ha silenciado la expresión de la PDF-1, la subunidad ATP6 no puede ser procesada ni incorporarse adecuadamente durante el ensamblaje de la ATP sintetasa. Teniendo esto en cuenta se ha estudiado la sensibilidad de células donde se ha inducido el RNAi de PDF-1 a la oligomicina.

En la figura D.VII.1. se presentan los efectos antiproliferativos de la oligomicina en la línea celular Tb449 de la forma procíclica de *Trypanosoma brucei*.

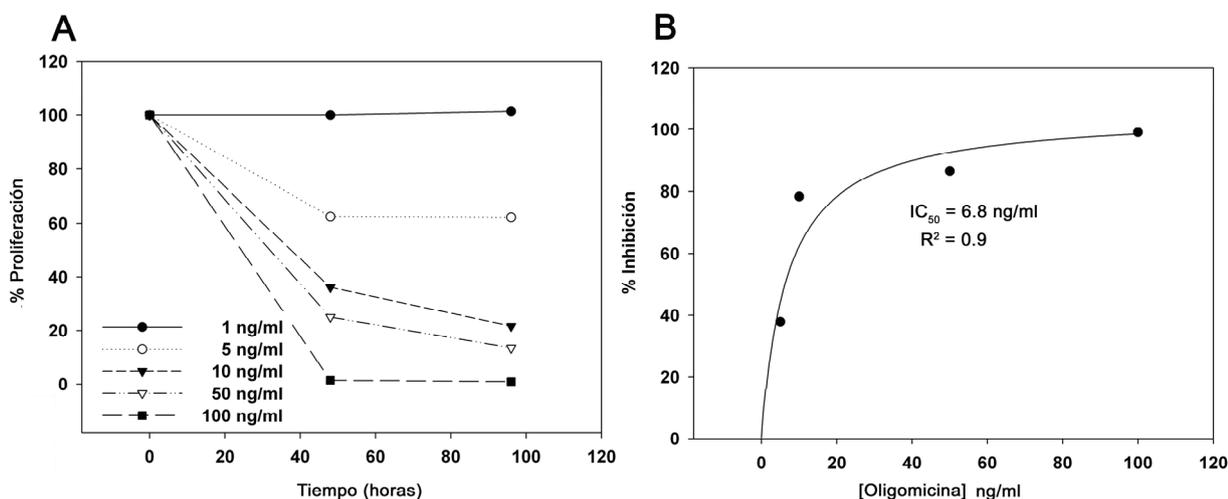


Figura D.VII.1. A) Efecto antiproliferativo de oligomicina en la línea celular Tb449 de la forma procíclica de *Trypanosoma brucei*. A) Análisis del porcentaje de inhibición. B) Estimación de la IC_{50} para los estudios de hipersensibilidad. El valor obtenido para la forma procíclica fue de 6.8 ng/ml.

Como puede observarse en la figura D.VII.2.B, la línea celular donde se ha silenciado la expresión de PDF-2 no presenta diferencias en la sensibilidad a oligomicina en comparación con la línea parental *Tb449*. Sin embargo la línea *Tb449*RNAi-PDF-1, incluso en ausencia de inducción, parece ser hipersensible a oligomicina con respecto a la línea celular control. Esta observación junto con los resultados anteriores sugiere que la depleción de tanto PDF-1 como PDF-2 alteran la función mitocondrial, pero solo PDF-1 parece estar asociado a la actividad del complejo de la ATP sintetasa.

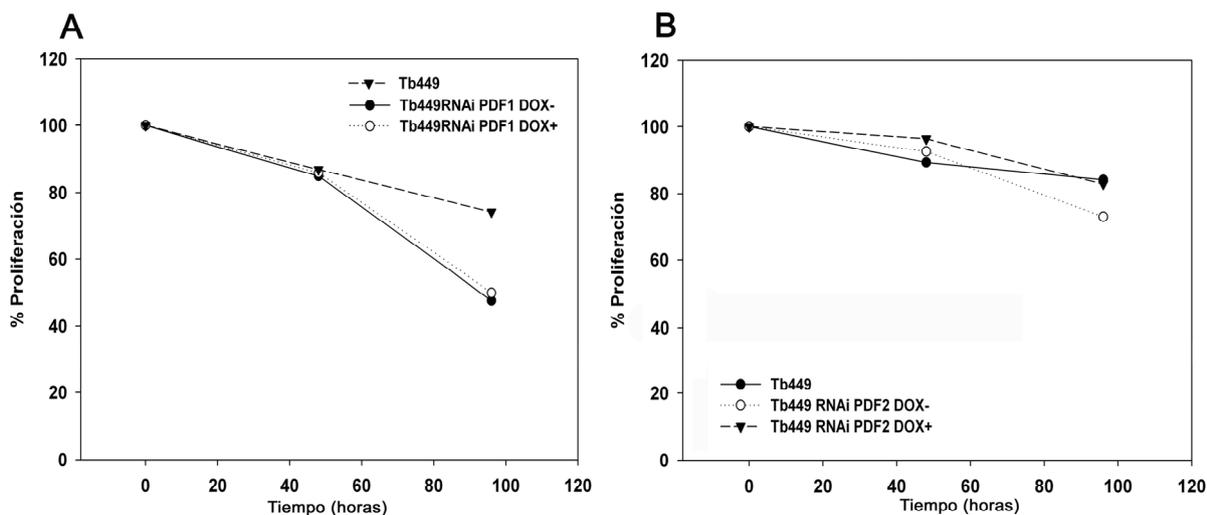


Figura D.VII.2. Efecto de la oligomicina sobre la proliferación celular en líneas celulares de la forma procíclica de *Trypanosoma brucei* donde se ha silenciado la expresión de PDF-1 y de PDF-2. A) Porcentaje de proliferación de la línea celular *Tb449*/RNAi-PDF-1 en presencia de oligomicina (5ng/ml) con respecto al control sin fármaco. B) Porcentaje de proliferación la línea celular *Tb449*/RNAi-PDF-2 en presencia de oligomicina con respecto al control sin fármaco.

Teniendo en cuenta que el incremento en la sensibilidad a oligomicina podría ser consecuencia de una alteración en los niveles del complejo de la ATP sintetasa, se realizaron estudios de microscopía de fluorescencia empleando un anticuerpo específico frente al componente F1 de la ATP sintetasa mitocondrial ya que no hay anticuerpos disponibles frente al componente Fo (Brown et al. 2001). Este componente esta conformado mayoritariamente por dos subunidades: la cadena α y la cadena β . El análisis por inmunofluorescencia se puede observar diferencias en cuanto a la intensidad de la señal y a la distribución del anticuerpo en las células donde se ha silenciado PDF-1 y PDF-2 en relación a la línea parental (figura VII.3.)

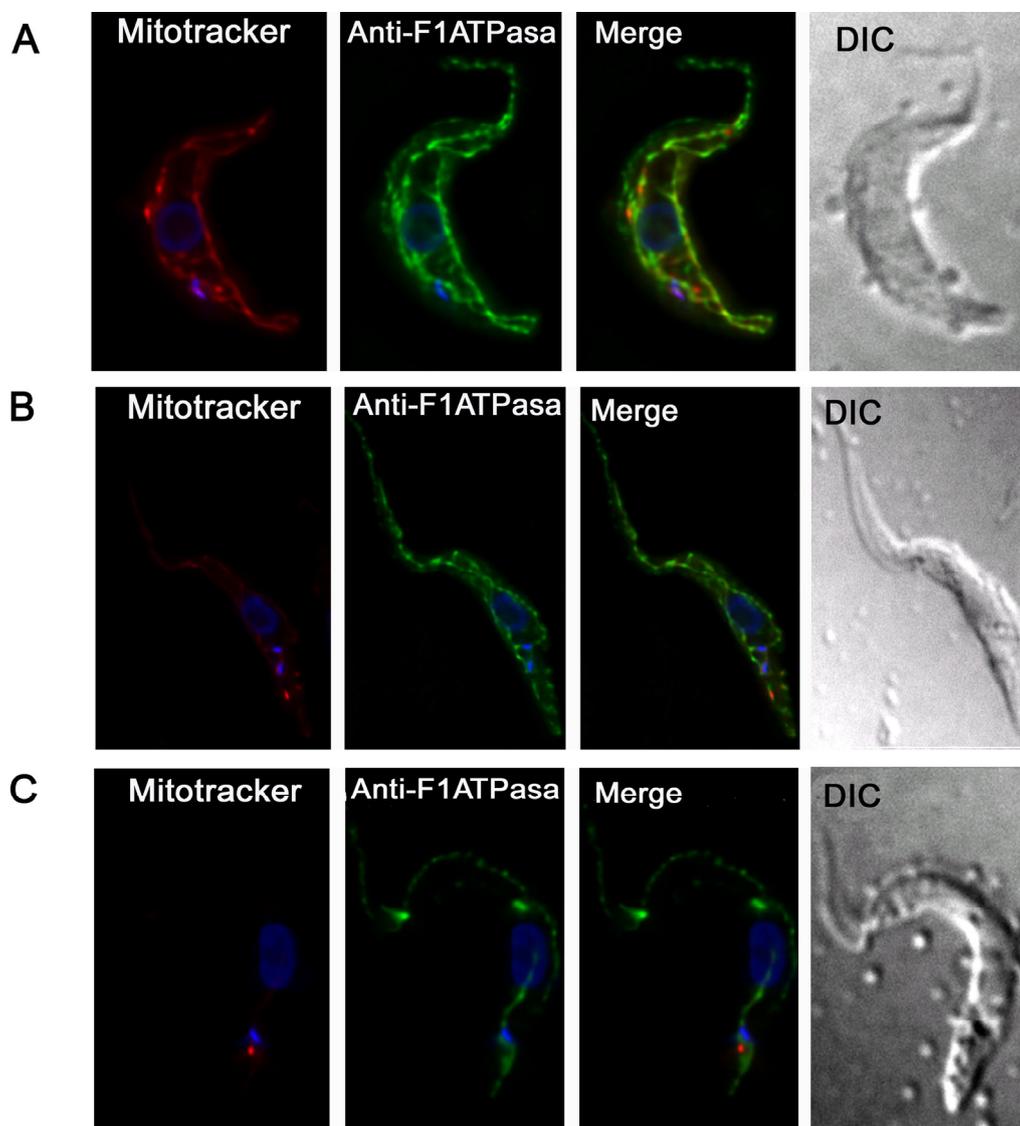


Figura D.VII.3. Niveles intracelulares del componente F1 del complejo ATP sintetasa mitocondrial determinados mediante. A) Tb449 B) Tb449/RNAi-PDF-1 en presencia de doxiciclina. C) Tb449/RNAi-PDF-2 en presencia de doxiciclina.

D.VIII. ANÁLISIS DE LOS REQUERIMIENTOS DE ACTIVIDAD METIONIL-TRNA-TRANSFORMILASA (MTF), EN *Trypanosoma brucei*

Estudios en *Saccharomyces cerevisiae* han puesto de manifiesto que en ausencia de PDF, es la formilación de metionina-tRNA lo que puede resultar perjudicial dado el carácter tóxico de un exceso de proteínas formiladas. Así a diferencia de plantas y mamíferos, no existen homólogos de PDF en el genoma de levaduras. Sin embargo presentan un gen que codifica para la metionil-tRNA-transformilasa (MTF), la enzima que cataliza la incorporación covalente de un grupo formilo a la tRNA-metionina previo a su incorporación a la proteína naciente y que está localizada en la mitocondria. En estos organismos la síntesis de proteínas bajo ciertas condiciones puede ser operativa sin transformilación (Blanquet et al. 2000). Transfectantes de *S. cerevisiae* que sobreexpresan la MTF de *E. coli*, presentan un fenotipo de crecimiento deficiente lo que parece ser debido a un exceso de proteínas formiladas que resultan tóxicas y a un bloqueo de las modificaciones post-traduccionales necesarias para que la proteína alcance su madurez biológica. Estos efectos son revertidos cuando estas cepas son transfectadas con un plásmido que sobreexpresa la PDF de *E. coli* (Ramesh et al. 2002) presumiblemente gracias a una eficiente deformilación de proteínas formiladas.

Teniendo en cuenta esta observación, se procedió a estudiar la posible reversión de los efectos antiproliferativos de la interferencia de PDF-1, transfectando la línea celular *Tb449/RNAiPDF-1* de la forma procíclica con un plásmido inducible para el silenciamiento de la expresión por RNAi de MTF, considerando que es posible que en ausencia de transformilación, la ausencia de actividad deformilasa pudiera ser menos citotóxica y habría una reducción de la pérdida de viabilidad de las células donde se ha silenciado la expresión de PDF-1.

D.VIII.1. Construcción de plásmidos para el silenciamiento génico mediante RNAi de la MTF de *Trypanosoma brucei*

Para el silenciamiento del gen *MTF*, en primer lugar se clonó en ambos sentidos un fragmento de 566 pares de bases correspondiente a la posición 47 a 613 de la secuencia codificante de la MTF separados por una secuencia de DNA “stuffer” en el vector pGR19 para dar el plásmido pGR19-MTF. Para realizar el doble silenciamiento junto con el gen *PDF-1*, se generó un segundo plásmido a partir del pGR19-MTF, tras la inserción de un fragmento que contiene la secuencia utilizada para silenciar el gen *MTF* obtenida al partir del plásmido pGR19-MTF en el plásmido pGR12, el cual presenta un marcador de selección para blasticidina, obteniéndose la construcción pGR12-MTF.

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

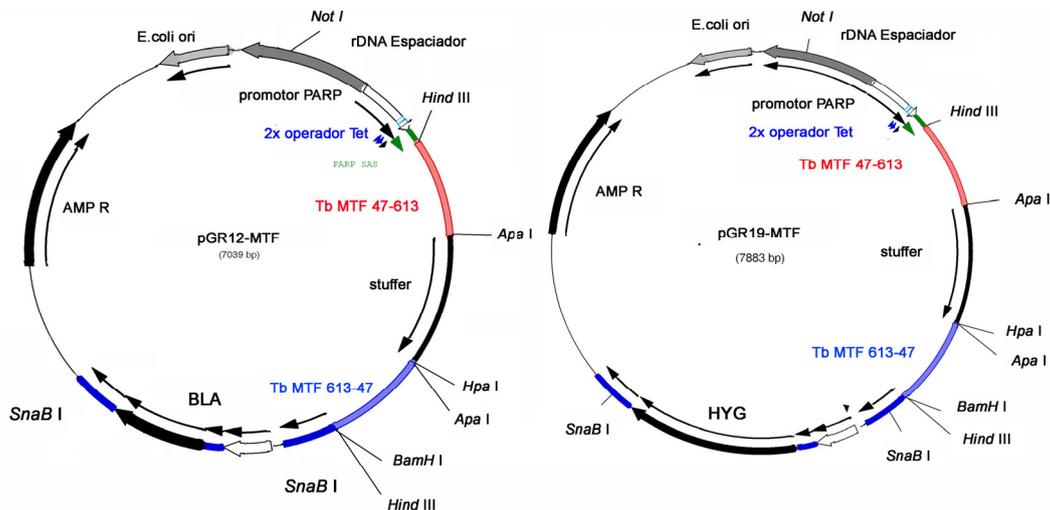


Figura D.VIII.1. Plásmidos de transfección pGR12-MTF y pGR19-MTF para generar el silenciamiento del gen *MTF* de *T. brucei*.

La transfección de células de *Trypanosoma brucei* se realizó mediante electroporación. El plásmido pGR19-MTF se utilizó para transfectar la línea celular *T. brucei* 449 (forma procíclica), y el plásmido pGR12-MTF para transfectar la línea *T.*

brucei 449 pGR19-PDF-1 (forma procíclica). La selección de los clones se realizó por dilución límite.

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 hasta su utilización para llevar a cabo los diferentes estudios.

D.VIII.1.2. Estudio del efecto del RNAi de la MTF y del doble RNAi de la PDF-1 y MTF sobre la proliferación celular

En primer lugar se estudió el efecto sobre la proliferación celular del silenciamiento del gen *MTF*. Para ello se indujo el fenómeno del RNAi con doxiciclina con ambas construcciones y en las distintas líneas celulares de la forma procíclica generadas en la primera parte de este trabajo y que corresponden a *Tb449*/RNAi-PDF-1 así como también en la línea parental *Tb449*.

D.VIII.1.3. Silenciamiento del gen de la MTF

Se estudió el efecto del RNA de interferencia de la línea celular *T. brucei* 449 pGR12-MTF 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 período estudiado (figura D.VIII.2.)

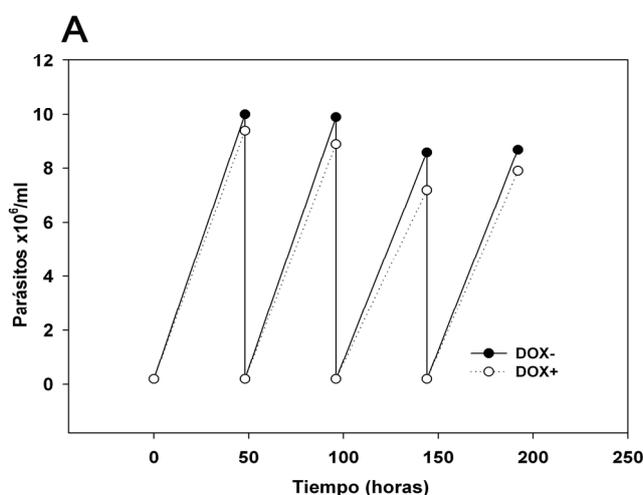


Figura D.VIII.2. Efecto del RNAi sobre el crecimiento celular y niveles de RNA mensajero del gen *MTF* de *T. brucei* 449 pGR12-MTF. A) Curva de crecimiento de *T. brucei* 449 pGR12-MTF.

D.VIII.1.4. Efecto del doble silenciamiento mediante RNAi de los genes de la PDF-1 y MTF de *T. brucei*

A continuación se analizó el efecto del RNA de interferencia en la línea celular *T. brucei* 449 pGR19-12-RNAi-PDF-1/MTF. La inducción del doble RNAi revierte significativamente el fenotipo de pérdida de viabilidad existente en el caso del gen *PDF-1* en el medio de cultivo SDM-79 cuando se compara con la línea celular donde solo se ha silenciado el gen *PDF-1* (figura D.VIII.3.)

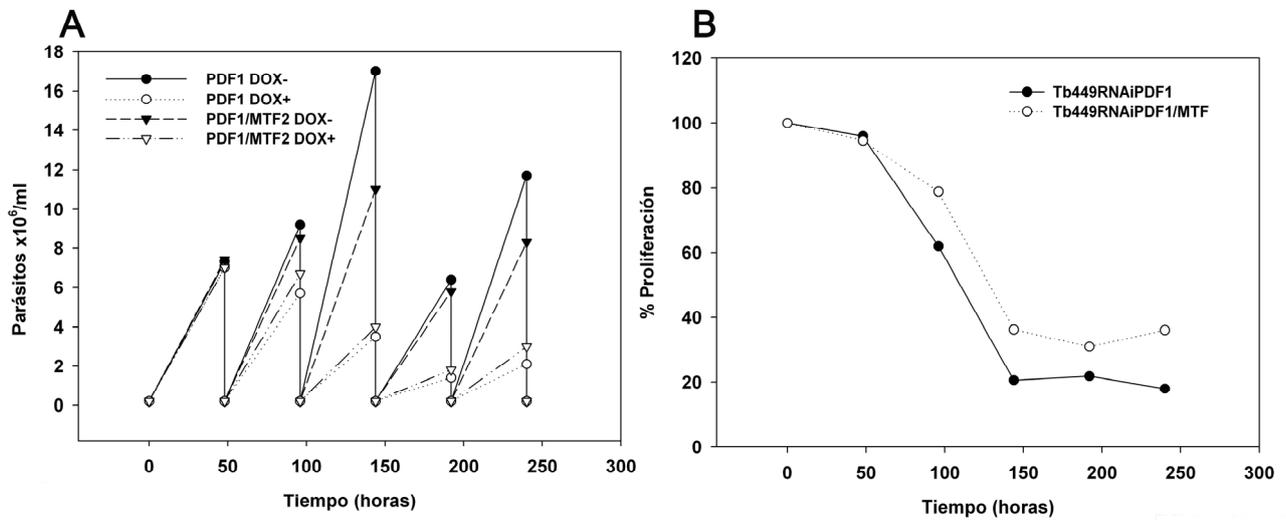
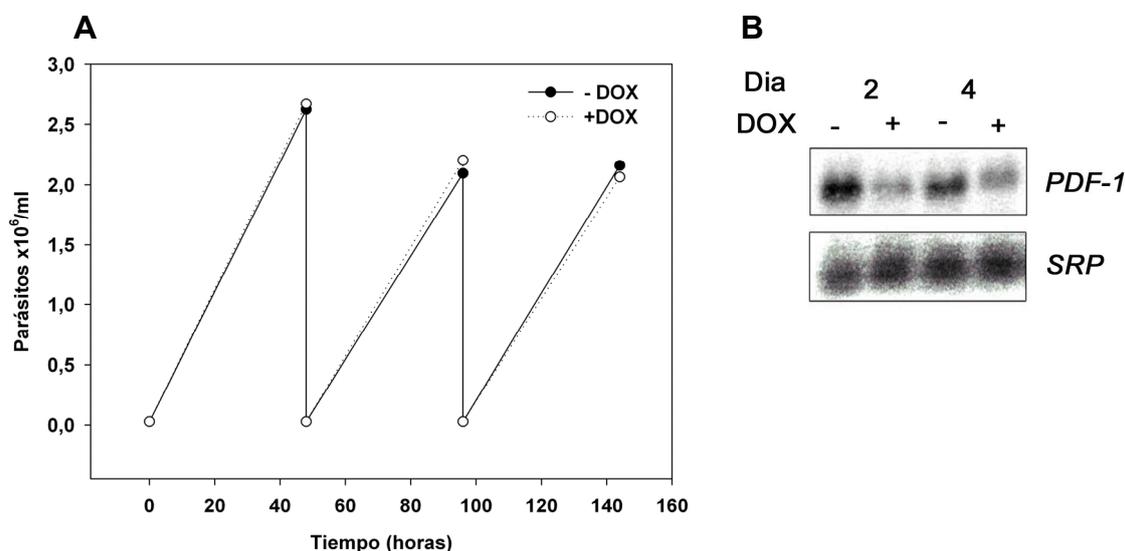


Figura D.VIII.3. Efecto del doble RNAi sobre el crecimiento celular y niveles de RNA mensajero del gen *MTF* A) Curva de proliferación de *T. brucei* 449/pGR19-RNAi-PDF-1 y pGR19-12-RNAi-PDF-1/MTF. B) Análisis del porcentaje de proliferación obtenido en las líneas celulares *Tb449*/pGR19-RNAi-PDF1 y *Tb449*/pGR19-12-RNAi-PDF1/MTF donde se ha inducido la doble interferencia con respecto al crecimiento obtenido en ausencia de doxiciclina .

D.IX. Papel biológico de la péptido deformilasa en las formas sanguíneas

A pesar de la baja actividad mitocondrial en formas sanguíneas, existen unos requerimientos mínimos para la viabilidad celular como la existencia de un complejo FoF1 ATP sintetasa funcional. Teniendo esto en cuenta, se analizó el papel de las PDFs en formas sanguíneas. En las figuras D.IX.1. y D.IX.2. se muestran los perfiles de crecimiento de las líneas celulares de la forma sanguínea, *TbS16/pGR19-RNAi-PDF-1* y *TbS16/PGR19-RNAi-PDF-2* en las cuales se ha inducido el silenciamiento de la expresión de PDF-1 y PDF-2 respectivamente. En ambas líneas celulares la inducción del RNA de interferencia no produjo efectos importantes en la proliferación, ya que no se aprecian diferencias significativas entre el cultivo inducido y no inducido.

Se analizaron asimismo los niveles de RNAm en los puntos correspondientes al día 2 y 4 de inducción mediante la técnica de *Northern blot*. Para la verificación de la interferencia de la expresión de PDF-1 y PDF-2 se utilizó una región de la secuencia codificante de la PDF-1 tal y como se hizo en los estudios en la forma procíclica. Del mismo modo se procedió para la PDF-2. Como se puede ver en las figuras D.IX.1. y D.IX.2., tras la adición de doxiciclina se produce una disminución en los niveles de RNAm de PDF-1 del 71% y 48 % a las 48 y 96 horas respectivamente, en tanto que el silenciamiento de PDF-2 produce una disminución en los niveles de RNAm del orden



D.IX.1. Efecto del RNAi sobre la proliferación celular y los niveles de RNAm del gen *PDF-1*.

A) Curva de proliferación de la línea celular *T. brucei* S16/pGR19-RNAi-PDF-1 en HMI-9 suplementado con 10 % de SBF, en ausencia (●) o en presencia (○) de doxiciclina. B) Niveles de RNAm del gen *PDF-1* en ausencia o presencia de doxiciclina, determinados por *Northern blot* y normalizados con la sonda SRP.

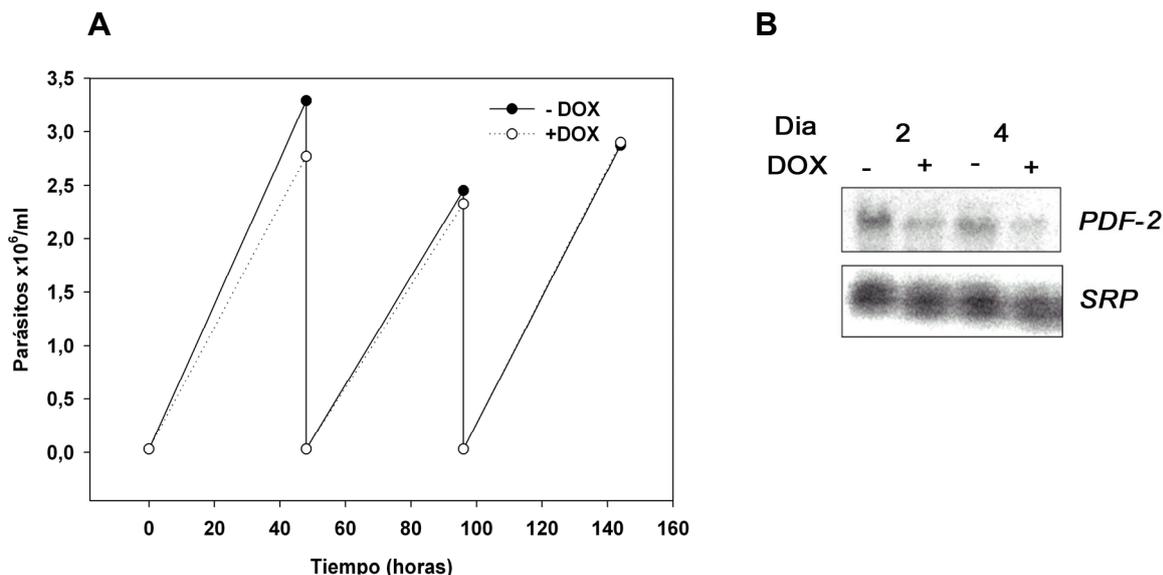


Figura D.IX.2. Efecto del RNAi sobre la proliferación celular y los niveles de RNAm del gen *PDF-1*. A) Curva de crecimiento de la línea celular *T. brucei* S16 pGR19-RNAi-PDF-2 en HMI-9 suplementado con 10 % de SBF, en ausencia (●) o en presencia (○) de doxiciclina. B) Niveles de RNAm del gen *PDF-2* en ausencia o presencia de doxiciclina, determinados por *Northern blot* y normalizados por la sonda SRP.

En definitiva, si bien no se observan diferencias en el perfil de crecimiento en células sanguíneas, hay que tener en cuenta que la eficiencia de la depleción mediada por RNAi fue baja y no se pudo eliminar el mensajero en condiciones de incubación prolongadas con doxiciclina. Es posible que bajo estas condiciones, existan niveles bajos de PDF-1 y PDF-2 que sean suficientes para mantener la viabilidad celular. En relación a los estudios de *Western blot* no fue posible detectar niveles significativos de PDF-1 y PDF-2 en ninguna de las líneas estudiadas.

D.X. Estudios de doble reemplazo alélico de PDF-1 en la forma sanguínea de *Trypanosoma brucei*

Con el fin de determinar de forma inequívoca el papel de las PDFs en las formas sanguíneas que constituyen la forma clínicamente relevante y dado que los estudios de interferencia no han sido concluyentes, se procedió a utilizar estrategias experimentales adicionales diseñadas para reemplazar el gen de la PDF-1 de forma directa o bien de manera condicionada en una línea celular que haya incorporado la

capacidad de expresar una copia ectópica de PDF-1 bajo el control de un promotor inducible.

Trypanosoma brucei es predominantemente diploide, por ello la inactivación de un gen requiere el reemplazamiento secuencial de cada uno de los alelos. Datos del proyecto genoma de *T. brucei*, así como análisis de *Southern blot* demuestran que el gen de *TbPDF-1* es disómico está presente en una sola copia en el cromosoma número 11 y codifica una proteína con una masa predicha de 29.64 kDa y un PI de 7.53. Se procedió a la preparación de dos construcciones para el reemplazamiento alélico de la secuencia completa de PDF-1 (Figura D.X.1.).

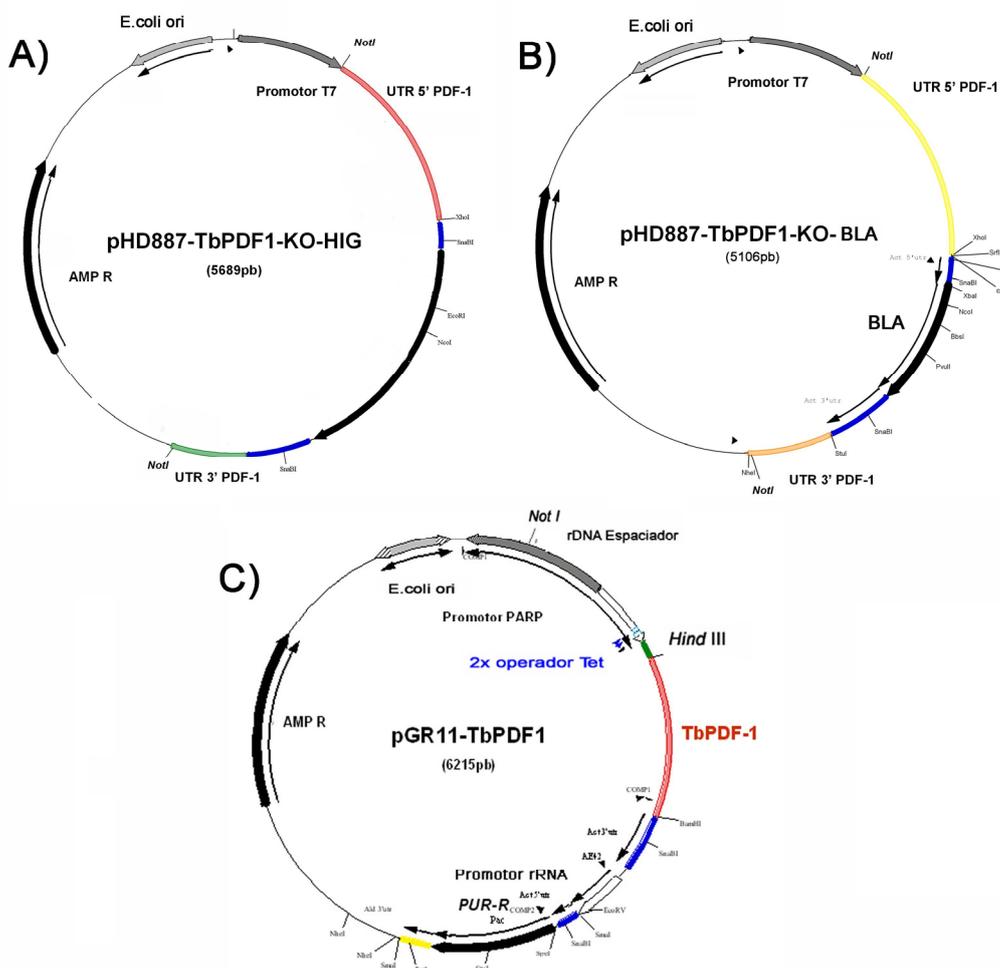
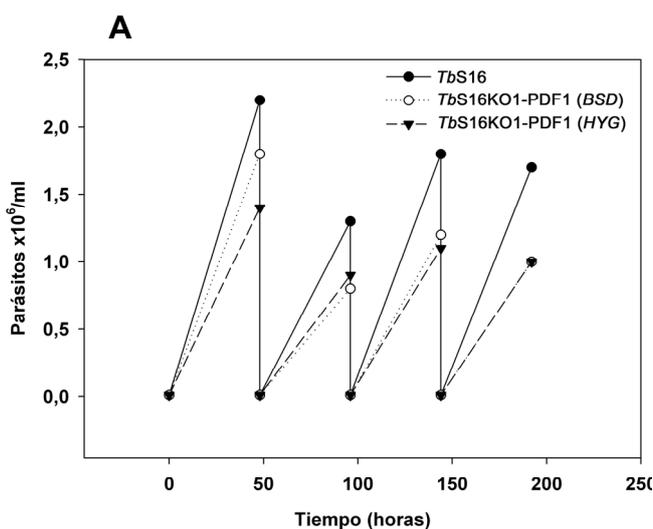


Figura D.X.1. Plásmidos de transfección para generar el reemplazo alélico condicionado de PDF1 en la forma sanguínea de *T. brucei*. A) Plásmido para el reemplazo de PDF-1 con el marcador de resistencia al antibiótico blasticidina; B) Construcción que contiene el marcador de resistencia al antibiotico higromicina; C) Plásmido que permite la expresión de una copia ectópica inducible por doxiclina de *TbPDF-1*.

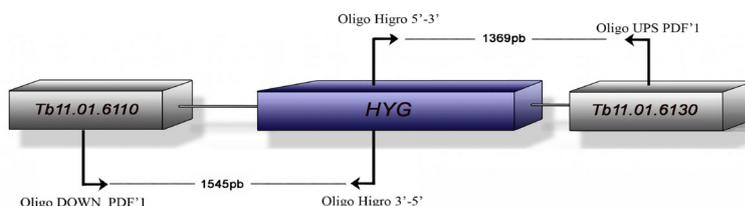
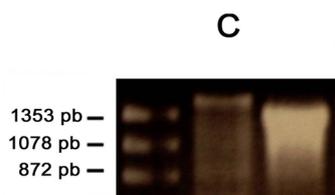
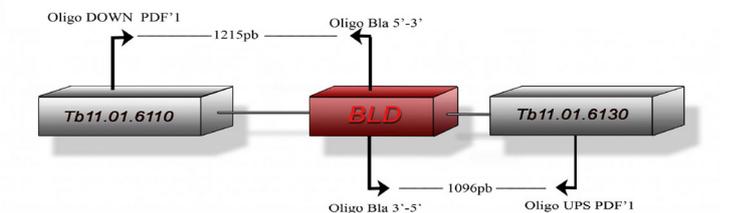
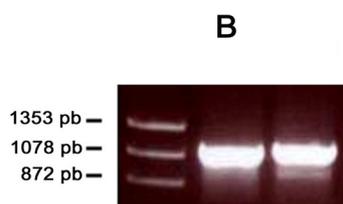
Uno de ellos contiene el marcador de selección de la blasticidina S deaminasa (BSD) y otro el de la higromicina fosfotransferasa (HYG). En ambos casos la expresión se basa en el empleo de la actividad transcripcional endógena del locus *TbPDF-1*. Las construcciones empleadas para cada paso de reemplazamiento génico contienen las secuencias flanqueantes UTR 5' y 3' del gen PDF-1 en donde el ORF ha sido reemplazado por el correspondiente marcador de selección (Figura D.X.1.) El procedimiento para la construcción de los vectores para el reemplazo alélico está descrito en la sección de Materiales y Métodos.

Para el reemplazamiento del primer alelo de *TbPDF-1* se obtuvieron dos líneas celulares: una que porta el marcador BSD y otra con la construcción que contenía el marcador de higromicina. Ambas líneas resultaron viables y aunque presentaban una tasa proliferativa ligeramente inferior a la de la cepa *TbS16*, no exhibían cambios aparentes a nivel morfológico.



D.X.2. Efecto del reemplazo alélico sencillo del gen *PDF-1* sobre la proliferación celular.

A) Curva de proliferación de la línea celular *T. brucei* S16 (●), línea celular transfectada con el plásmido pHD887-*TbPDF-1*-KO-BLA (○), y línea celular transfectada con el plasmido pHD887-*TbPDF-1*-KO-HIG(▼). Comprobación por PCR de cada uno de los reemplazamientos. **B)** Reemplazamiento con el marcador *BSD* e **C)** *HYG*. Para cada caso se presenta un esquema gráfico del tamaño esperado de los productos de amplificación.



A continuación se procedió a la transfección con la segunda construcción para reemplazar directamente el segundo alelo. Los clones obtenidos en cada paso de transfección fueron comprobados por PCR con oligonucleótidos específicos para cada caso, tal y como se describe en el apartado de Materiales y Métodos y en la figura D.X.2. se muestran los productos de PCR junto con un esquema donde se representa el tamaño esperado para cada caso.

Sin embargo, tras repetidos intentos de transfección no fue posible obtener clones viables donde se hubiera producido el doble reemplazamiento alélico de PDF-1. Este resultado sugiere que la PDF-1 es esencial.

Para genes esenciales debe ser posible obtener líneas celulares donde se ha efectuado el doble reemplazamiento en presencia de una copia ectópica. Se procedió por tanto a generar un doble “*knock-out*” condicionado. Así se generó una línea celular que expresa una copia ectópica inducible de PDF-1 mediante la transfección con el plásmido pGR11-CE-*TbPDF-1* diseñado para expresar una copia del gen bajo el control del promotor de prociclina y utilizando la puromicina N-acetil transferasa (PAC) como marcador de selección. Esta línea celular fue viable y sin cambios aparentes en la viabilidad y morfología en presencia o ausencia de doxiciclina (Figura D.X.3.).

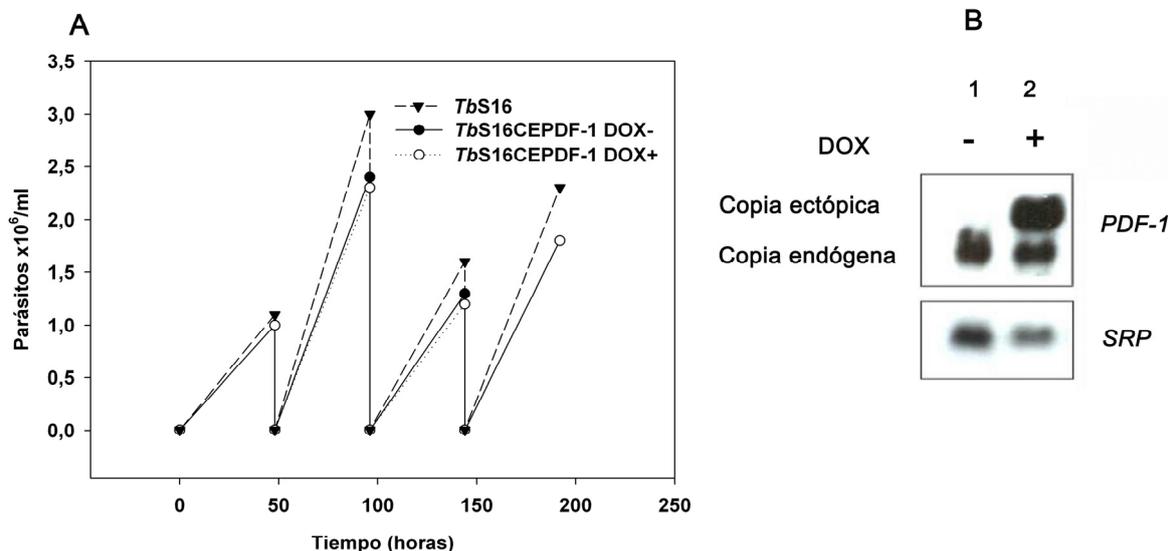


Figura D.X.3. Análisis de la línea celular *Tbs16* que sobreexpresa una copia ectópica inducible de PDF-1. A) Curva de proliferación de la línea celular parental *T. brucei* S16(●). *Tbs16* transfectado con el plásmido pGR11-*TbPDF-1* sin doxiciclina (○). *Tbs16* transfectado con el plásmido pGR11-*TbPDF-1* con doxiciclina (▼). B) Niveles de RNA mensajero del gen de la *PDF-1* correspondientes a la copia endógena y a la copia ectópica inducida, determinados por *Northern blot* y normalizados con la sonda *SRP*. Carril 1: *T. brucei* S16CE PDF-1 sin doxiciclina, carril 2: *T. brucei* S16CEPDF-1 con doxiciclina.

En la figura D.X.4 se observa el perfil de crecimiento de la línea celular *TbS16KO1CEPDF-1* que corresponde a la línea que expresa la copia ectópica inducible de PDF-1 a la cual se le ha reemplazado el primer alelo de PDF-1. Se observa una disminución en la proliferación en relación a la línea parental *TbS16* pero sin cambios aparentes de morfología. Una vez obtenida esta línea celular se procedió a realizar las transfecciones para el reemplazo secuencial del segundo alelo del gen *TbPDF-1*.

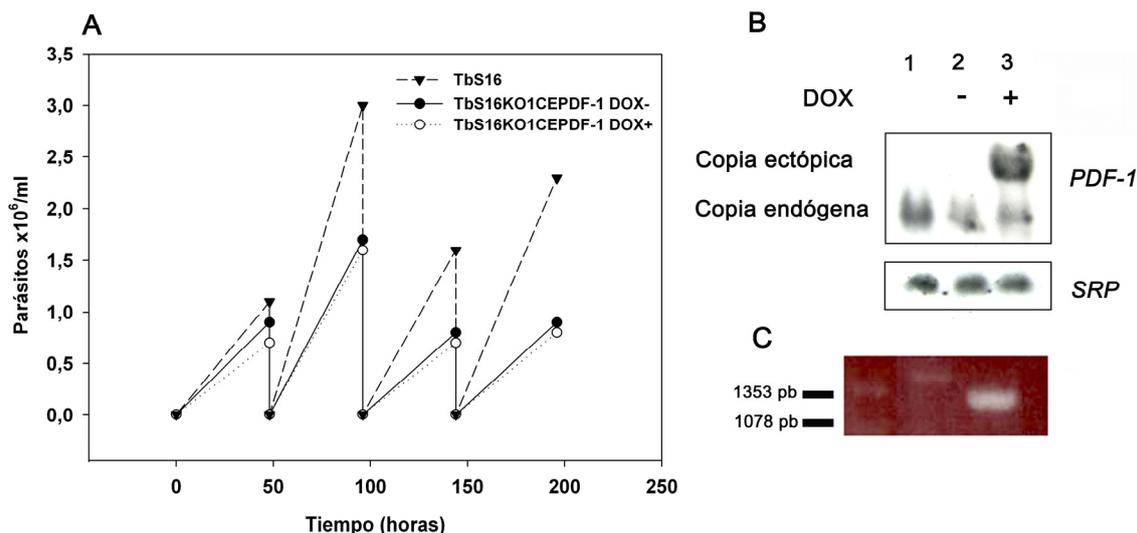
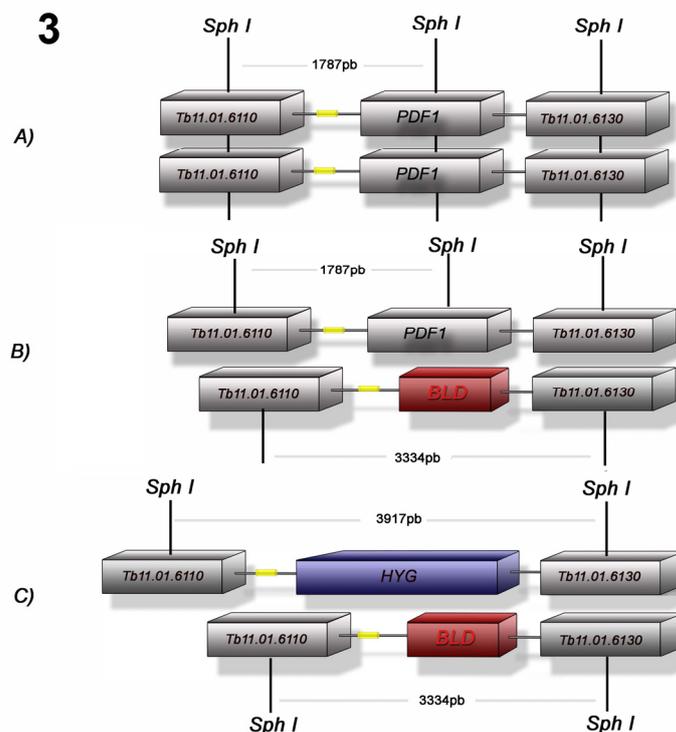
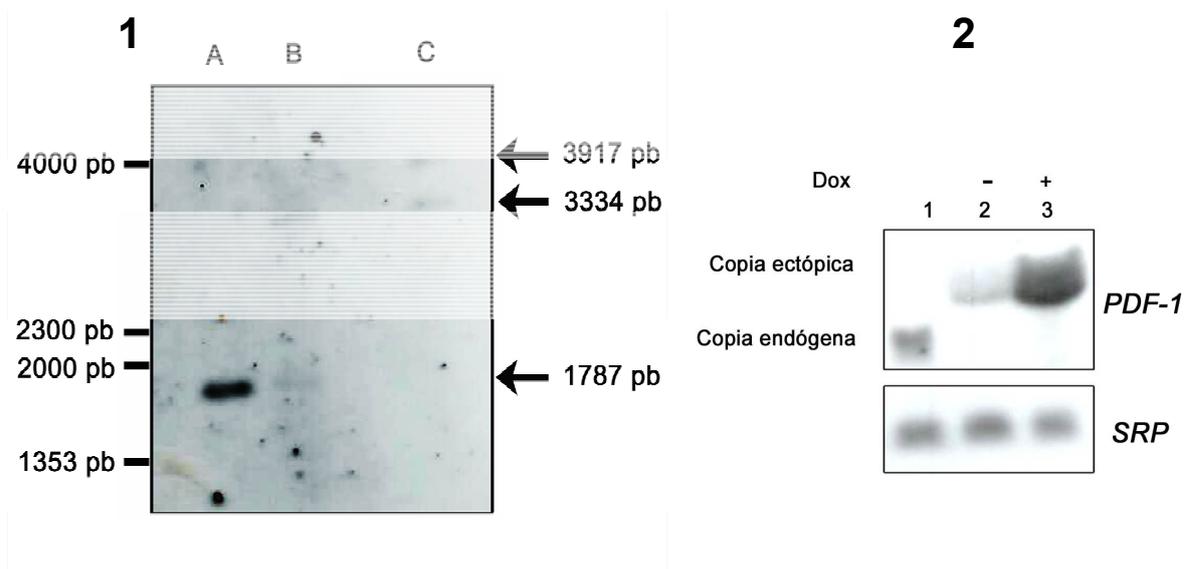


Figura D.X.4. Análisis de la línea celular *TbS16KO1CE*. Esta línea celular sobreexpresa una copia ectópica inducible de PDF-1 y se le ha reemplazado uno de los alelos del gen *PDF-1*. A) Curva de proliferación de la línea celular parental *T. brucei* S16(●), *TbS16KO1CEPDF-1* sin doxiciclina (○), *TbS16KO1CEPDF-1* con doxiciclina (▼). B) Niveles de RNA mensajero del gen de la *PDF-1* correspondientes a la copia endógena y a la copia ectópica inducida, determinados por *Northern blot* y normalizados con la sonda SRP. Carril 1: *T. brucei* S16, carril 2: *T. brucei* S16KO1CEPDF-1 sin doxiciclina., carril 3: *T. brucei* S16KO1CEPDF-1 con doxiciclina. C) Comprobación por PCR de la línea celular *TbS16CE* transfectada con el plásmido pHD887-TbPDF-1-KO-HIG.

Los análisis de *Southern blot* y *Northern blot* (Figura D.X.5.) así como las comprobaciones por PCR (Figura D.X.6.) demuestran que cada una de las construcciones se ha incorporado en el locus correcto y que no han ocurrido otros eventos de integración, confirmando que las copias endógenas de *TbPDF-1* han sido completamente eliminadas. Sin embargo, después de sucesivas transfecciones no fue posible obtener un clon donde la expresión de la copia ectópica de PDF-1 estuviese completamente reprimida en ausencia de doxiciclina (figura D.X.5).

Figura D.X.5. Análisis del clon donde se ha efectuado el doble reemplazo alélico de *TbPDF-1* en la forma sanguínea de *Trypanosoma brucei* de PDF-1. 1) *Southern blot*. El DNA genómico fue aislado de A) *TbS16*, B) *TbS16 PDF-1KO1* y C) *TbPDF-1 KO2*, digerido con la enzima *Sph I*, separado en un gel de agarosa, transferido a una membrana de nylon e incubado con una sonda específica de la región de la UTR5' de la PDF-1 (amarillo). El tamaño esperado para cada fragmento está indicado en el esquema. 2) Niveles de RNAm del gen de la PDF-1 correspondientes a la copia endógena y a la copia ectópica inducida por doxiciclina, determinados por *Northern blot* y normalizados con la sonda *SRP*. Carril 1, *T. brucei* S16; 2 y 3, *T. brucei* S16 KO2 PDF1CE sin inducir e inducido respectivamente.



Como puede verse en la figura D.X.7. la línea celular correspondiente al doble reemplazo alélico condicionado de PDF-1 presenta una drástica reducción de la proliferación en comparación con la línea parental. La inducción con doxiciclina de la copia ectópica solo permite una pequeña recuperación del fenotipo de crecimiento defectivo observado en ausencia de doxiciclina. En definitiva, no fue posible modular el fenotipo de crecimiento defectivo con la expresión de la copia ectópica.

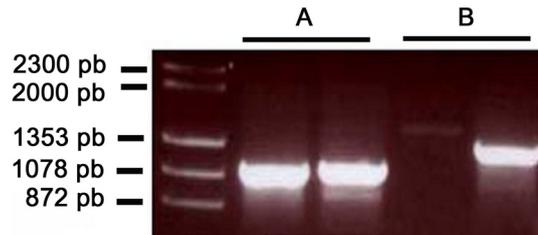
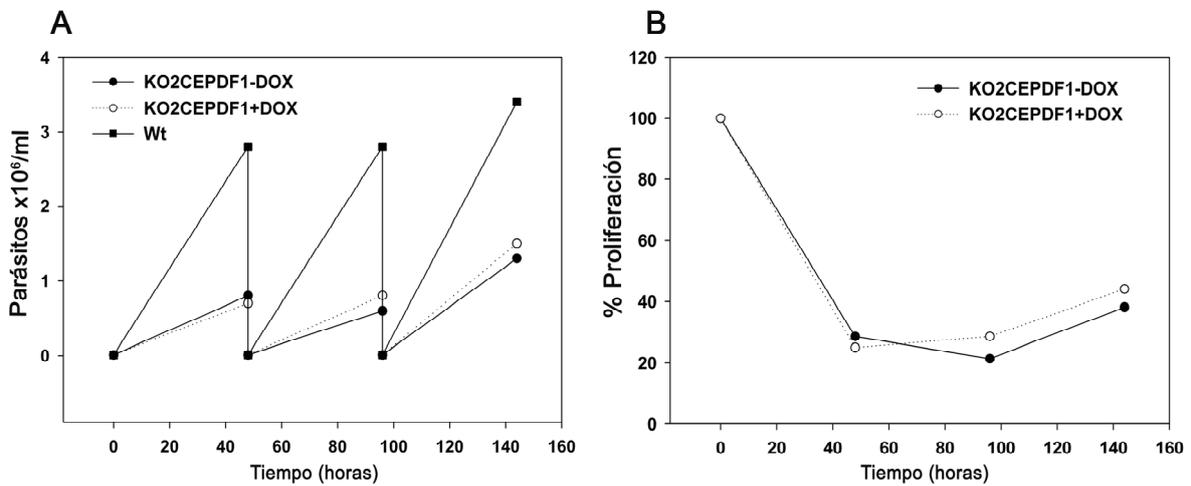


Figura D.X.6. Comprobación por PCR del doble reemplazo alélico de PDF-1 . A) Comprobación de la transfección con el plásmido pHD887-TbPDF-1-KO-BLA. B) Comprobación de la transfección transfectado con el plásmido pHD887-TbPDF-1-KO-HIG. Para cada caso se presenta un esquema gráfico del tamaño esperado de los productos de amplificación por PCR (Figura D.X.2. Panel B y C).



D.XI. Células deficientes en PDF-1 presentan alteraciones en el potencial de membrana mitocondrial y son hipersensibles a oligomicina

La forma sanguínea de *Trypanosoma brucei* se caracteriza por presentar un metabolismo mitocondrial reducido en relación a la forma procíclica donde procesos como la cadena respiratoria y el ciclo de Krebs no son operativos (Schnauffer et al. 2002). Por otra parte, se ha descrito que el complejo de la ATP sintetasa funciona de manera reversa, hidrolizando ATP para generar un gradiente transmembrana el cual es necesario para el importe de iones y metabolitos esenciales para la funcionalidad del orgánulo (Schnauffer et al. 2005). El gen *ATP6* codifica para una de las subunidades del componente Fo y es el único gen codificado por el kinetoplasto que se expresa en esta forma del ciclo de vida y se ha demostrado que es esencial tanto en tripanosomátidos, como en células de mamíferos y levaduras (Schnauffer et al. 2005; Zikova et al. 2009). En plantas esta subunidad requiere modificaciones post-traduccionales y probablemente debe ser sintetizada con un grupo formilo el cual debe ser retirado para que puedan tener lugar los procesos involucrados en la maduración de la proteína (Gigliome and Meinel 2001). En células deficientes en PDF-1 es posible que esta subunidad no sea procesada adecuadamente y se incorpore al complejo de manera defectuosa o bien se acumule en su forma formilada.

Un ensamblaje defectuoso de la ATP sintetasa puede dar lugar a deficiencias en el potencial de membrana mitocondrial y posiblemente hipersensibilidad a inhibidores de la ATP sintetasa. Para estudiar esta posibilidad se realizaron análisis de citometría de flujo con la sonda dependiente de potencial transmembrana mitotracker y estudios de microscopía de fluorescencia.

Como se observa en la figura D.XI.1. y D.XI.2., la línea celular donde se ha realizado el doble reemplazo alélico de PDF-1 presenta una alteración de la tinción con mitotracker así como cambios en la morfología mitocondrial pudiéndose detectar una alteración en el patrón de tinción con mitotracker en relación a la línea parental *TbS16*. Así, la mitocondria aparece fragmentada y en algunos casos se observan células que presentan una menor intensidad de fluorescencia.

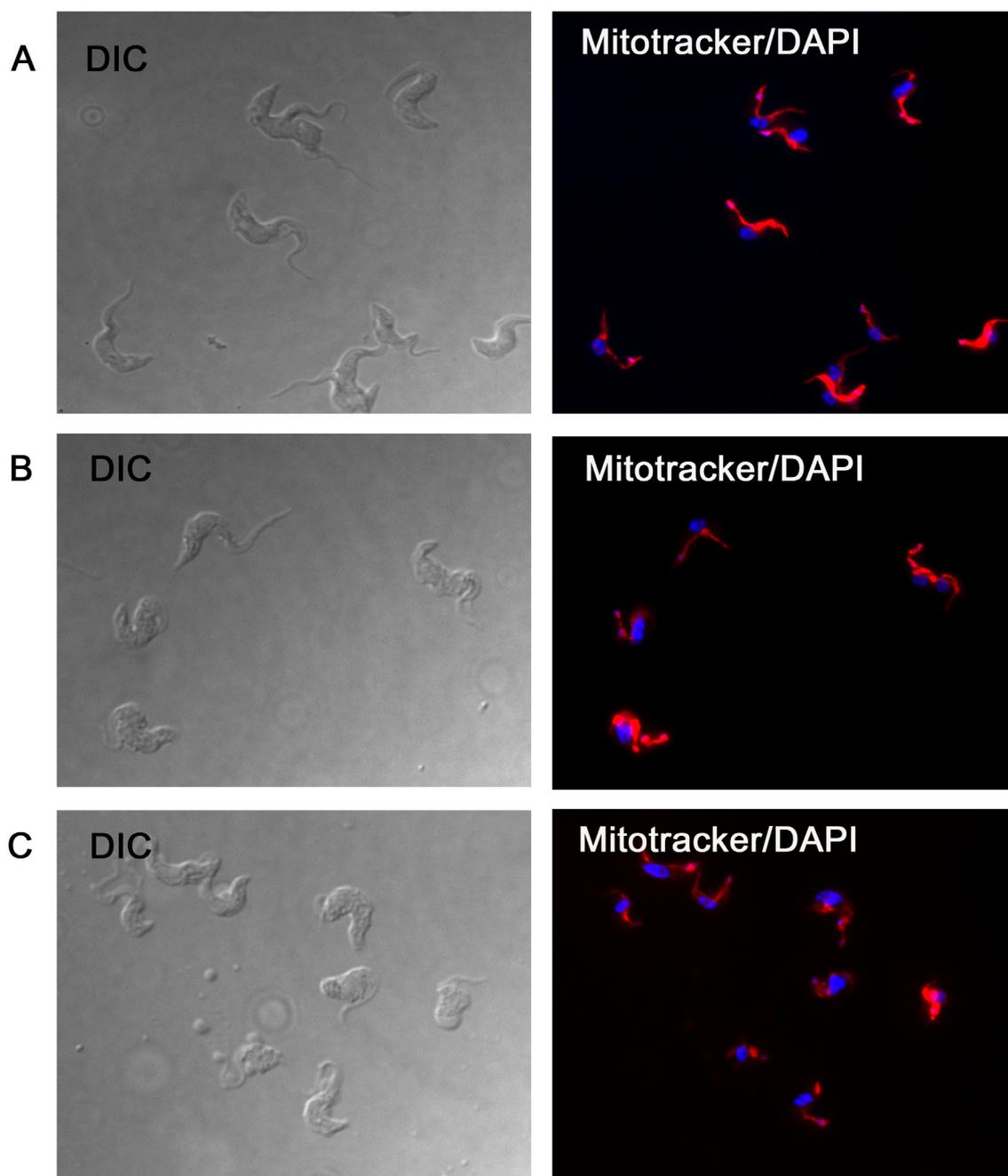


Figura D.XI.1. Microscopía de fluorescencia de parásitos incubados con Mitotracker Red CMXRos (Molecular Probes. A) *TbS16*, B) *TbS16KO2CEPDF-1 DOX-*, C) *TbS16KO2CEPDF-1 DOX+*.

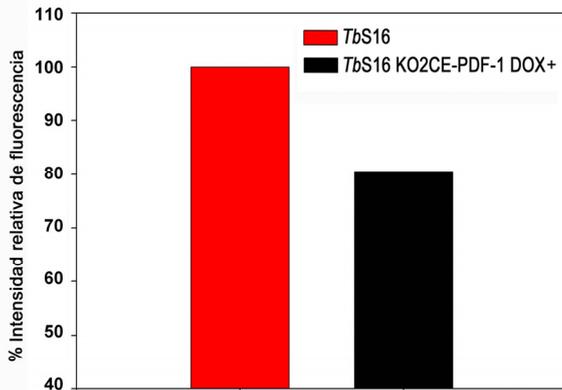
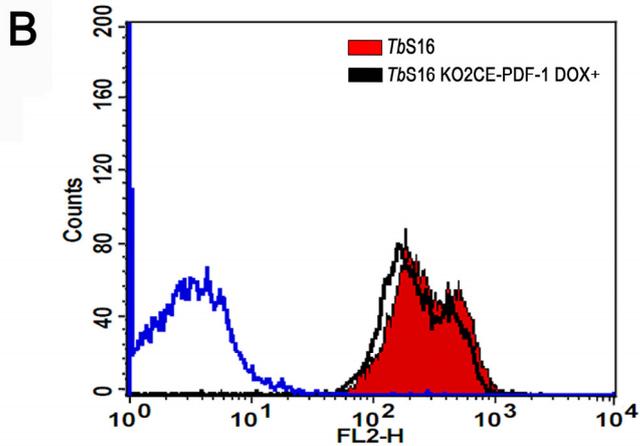
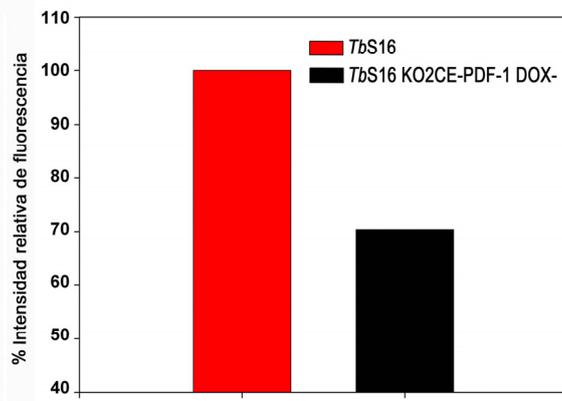
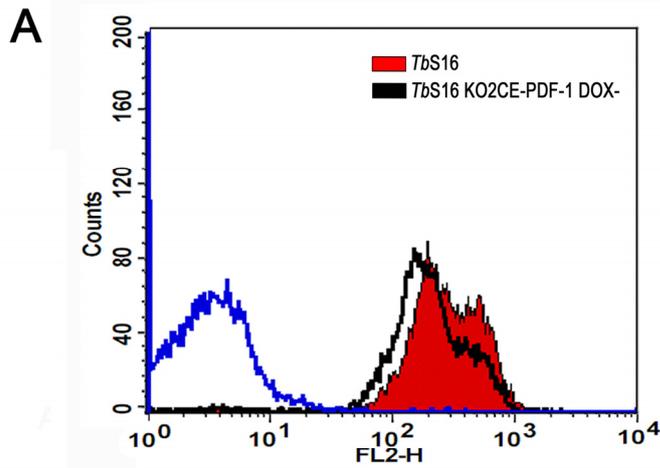


Figura D.XI.2. Análisis mediante citometría de flujo del efecto del doble reemplazo alélico de PDF-1 en la forma sanguínea de *T. brucei* sobre el potencial de membrana mitocondrial.

Los parásitos fueron incubados con Mitotracker Red CMXRos (Molecular Probes). A) Intensidad de fluorescencia correspondiente a la línea celular *TbS16* y *TbS16KO2CEPDF-1 DOX-*.

B) Intensidad de fluorescencia correspondiente a la línea celular *TbS16* y *TbS16KO2CEPDF-1 DOX+*.

El conjunto de resultados obtenidos con las líneas doble “*knock out*” de PDF-1 conducen a pensar que existen alteraciones en el potencial de membrana mitocondrial que podrían derivar de alteraciones de la ATP sintetasa. La oligomicina es un inhibidor específico del complejo ATP sintetasa que reconoce exclusivamente el componente Fo.

Se procedió a determinar los valores de IC₅₀ para la oligomicina en la forma sanguínea de *T. brucei* (figura D.XI.3.). Como se puede observar en las figura D.XI.4, la línea deficiente en PDF-1 generadas en este estudio y que corresponde al doble “*knock out*” condicionado exhibe una hipersensibilidad a la oligomicina, aunque esta hipersensibilidad se observa en ausencia o presencia de doxiciclina. Esto sugiere nuevamente que la inducción con doxiciclina no permite aumentar los niveles de PDF-1 y recuperar el fenotipo observado en el doble “*knock out*”.

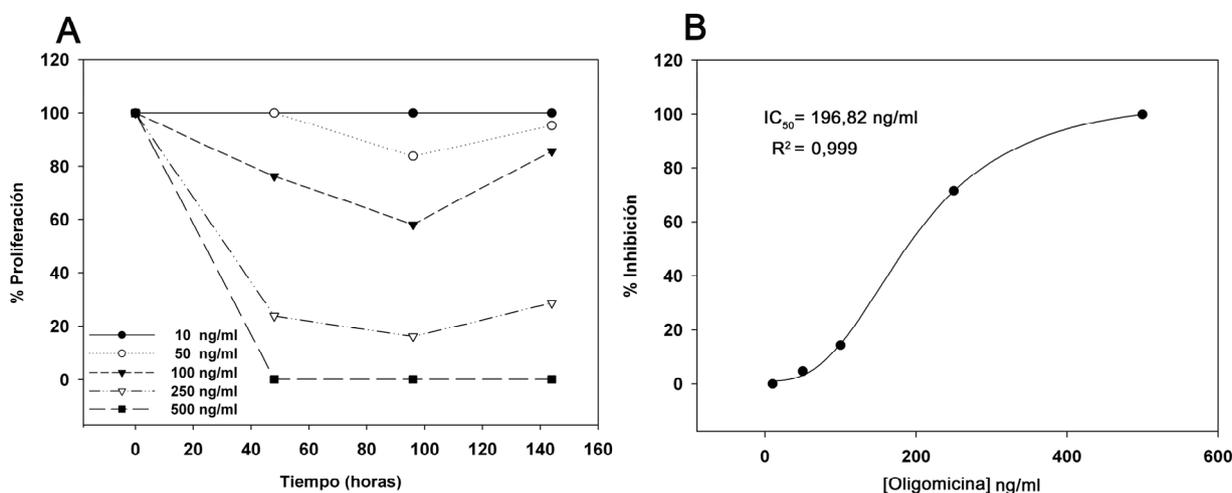


Figura D.XI.3. Efecto antiproliferativo de oligomicina en la forma sanguínea de *Trypanosoma brucei*. A) Análisis del porcentaje de inhibición de la proliferación. B) Determinación del IC₅₀ para los estudios de hipersensibilidad. El valor obtenido de IC₅₀ mediante un ajuste sigmoideal a los valores de porcentaje de inhibición fue de 196 ng/ml.

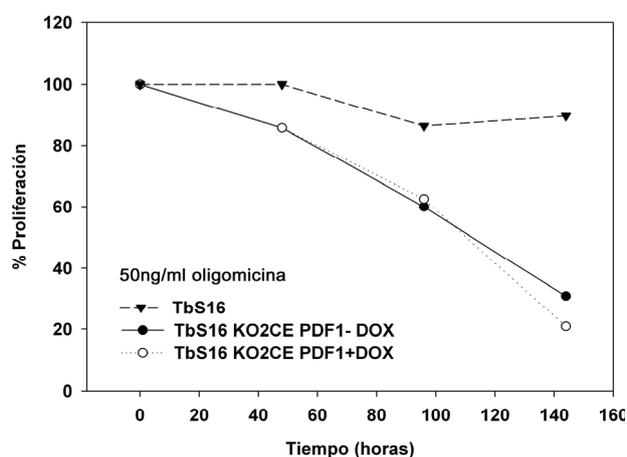


Figura D.XI.4. Hipersensibilidad a oligomicina de una línea celular de la forma sanguínea de *Trypanosoma brucei* deficiente en PDF-1.

D.XII. Efecto de la actinonina en la forma procíclica y sanguínea de *Trypanosoma brucei*

En este trabajo se estudiaron los efectos de la actinonina, un agente antimicrobiano el cual es un inhibidor de la PDF bacteriana. Este compuesto ha demostrado ser activo en plantas, *P. falciparum* y en líneas tumorales humanas. En todos los casos los efectos antiproliferativos han sido relacionados con una inhibición de la péptido deformilasa. Sin embargo, en este estudio se observó que a concentraciones tan altas como 100 μM no tiene ningún efecto en la forma procíclica de *Trypanosoma brucei* mientras que en la forma sanguínea esta dosis solo afecta ligeramente la proliferación (figura XII.1.).

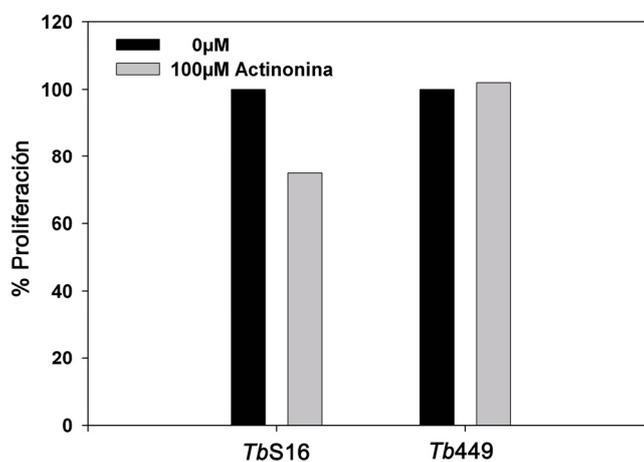


Figura D.XII.1. Efecto de la actinonina en la forma sanguínea y procíclica de *Trypanosoma brucei*.
El porcentaje de proliferación en ausencia de fármaco corresponde al 100% .

DISCUSIÓN

E. DISCUSIÓN

La evolución de la mitocondria a partir de bacterias y células ancestrales que establecieron una simbiosis intracelular ha estado asociada a la consecuente pérdida de muchos genes, eliminando posiblemente, procesos redundantes que en principio habían contribuido al establecimiento de la simbiosis.

Sin embargo, a pesar de la reducción de diversas funciones, los orgánulos eucariotas en general, conservan propiedades características de su ancestro bacteriano tales como la formilación de tRNA^{Met} y la deformilación de péptidos nacientes, que son fundamentales para la traducción y la biogénesis organelar y que forman parte de los procesos de escisión de metionina en posición N-terminal (NME). Estos procesos determinan la madurez biológica de la proteína y debido a que son esenciales en eubacterias, recientemente han recibido mucho interés como diana terapéutica para el desarrollo de agentes antimicrobianos (Giglione and Meinnel 2001).

Estos mecanismos de procesamiento que parecen ser operativos también en orgánulos eucariotas, presentan diferencias significativas entre los distintos grupos del reino animal. Así, se ha sugerido que esta aplicación quimioterapéutica pueda extenderse a parásitos protozoarios de relevancia biomédica tales como *Plasmodium spp* y *Trypanosoma spp*, causantes de enfermedades que suponen en la actualidad un serio problema tanto sanitario como socioeconómico en todo el mundo.

La escisión de la metionina N-terminal es un mecanismo esencial en todos los organismos (Chang et al. 1989; Solbiati et al. 1999). El grupo N-formilo que modifica la primera metionina de todas las proteínas sintetizadas en procariotas y orgánulos de eucariotas, generalmente no es retenido y es escindido de la proteína madura como parte de modificaciones post-traduccionales y de procesos asociados a la regulación de la vida media de la proteína (Varshavsky 1996).

En esta ruta están involucradas dos familias de enzimas: las péptido deformilasas (PDF) y las aminopeptidasas (MAP). La PDF retira todos los grupos formilo y desenmascara el grupo amino de la primera metionina lo cual es un requisito para el reconocimiento y la actividad de las MAPs (Solbiati et al. 1999).

Inicialmente se pensaba que la PDF era una enzima exclusivamente procariótica, y por lo tanto ausente en mamíferos, lo que la postuló como un blanco bioquímico novedoso y prometedor para el diseño de antibióticos específicos y selectivos sin toxicidad aparente en humanos.

Aunque gran parte del trabajo inicial de la caracterización de la PDF estuvo enfocado en la PDF de *E. coli*, posteriormente hubo un enorme interés en esta enzima como blanco para desarrollar terapias frente a patógenos y se estudiaron las de *Bacillus stearothermophilus* (Dardel et al. 1998), *Staphylococcus aureus* (Chen et al. 2000), *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae* (Margolis et al. 2001) *Leptospira interrogans* (Besteiro et al. 2002) y *Mycobacterium tuberculosis* (Cynamon et al. 2004).

A lo largo de los últimos años se han desarrollado numerosos inhibidores que han demostrado ser muy activos *in vitro* frente a muchos de estos patógenos lo que ha conducido a especular que estas moléculas podían ser usadas como antibióticos de amplio espectro frente a una variedad de enfermedades infecciosas (Giglione et al. 2000). Sin embargo, el desarrollo de fármacos específicos frente a la PDF bacteriana encontró un potencial obstáculo. La disponibilidad de secuencias genómicas completas de eucariotas ha revelado la presencia de homólogos de PDF en parásitos, plantas y mamíferos (Giglione et al. 2000) y estudios recientes han demostrado que las PDFs eucarióticas son activas *in vitro* e *in vivo* (Bracchi-Ricard et al. 2001; Serero et al. 2003 Dirk et al. 2001; Nguyen et al. 2003; Coustou et al. 2003) sugiriendo que la formilación y deformilación de proteínas nacientes son procesos evolutivamente conservados y que pueden ser importantes en mitocondria y cloroplastos de organismos eucarióticos, aunque su papel en mamíferos ha estado sujeto a un intenso debate (Cynamon et al. 2004; Nguyen et al. 2003).

Estudios de cristalografía, alineamientos de secuencias de aminoácidos y algunos parámetros fisiológicos como la identidad del cofactor metálico y la localización celular de las distintas PDFs (Giglione et al. 2000; Guilloteau et al. 2002) han conducido a establecer una clasificación que, a pesar de no cubrir el amplio espectro de PDFs, ha permitido establecer algunas características distintivas entre PDFs eucarióticas y procarióticas. En base a esto se han definido tres tipos:

Las PDFs tipo 1 que se encuentran en bacterias y tienen ortólogos presentes en muchos eucariotas, las PDFs tipo 2 que están restringidas a bacterias y las PDFs tipo 3 que incluyen a las PDFs de archaeobacterias y las PDFs de tripanosomátidos.

E.I. Análisis comparativo de las secuencia de proteínas de las PDFs de tripanosomátidos

Un análisis filogenético basado en alineamientos de los tres motivos conservados de las PDFs eucarióticas y procarióticas ha sugerido que las PDFs tripanosomales están más estrechamente vinculadas a las PDFs de archaeobacterias (Giglione and Meinnel 2001) y estos grupos son tan diferentes del resto de PDFs como para clasificarlas en un grupo separado al cual se ha denominado PDF tipo 3 (Boularot et al. 2004). Sin embargo, las archaeobacterias no usan formil-metionina para iniciar la síntesis de proteínas, así que se desconoce que tipo de reacción catalizan los ortólogos de PDF en estos organismos. Parásitos tripanosomátidos presentan dos ortólogos de PDF en su genoma a los cuales se ha referido en este trabajo como PDF-1 y PDF-2.

Por otra parte, la PDF-1 de *T. cruzi*, la cual se ha definido como una enzima de tipo 3, en este estudio se ha demostrado que presenta actividad deformilasa y comparte algunas características con la PDF bacteriana..

Alineamientos de las secuencias correspondientes a la PDF-1 de *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania major* y *Trypanosoma brucei*, revelan que esta proteína está muy conservada dentro de este grupo de tripanosomátidos. La misma afirmación es válida para las PDF-2. Sin embargo, a pesar del grado de conservación que existe al comparar las PDF-1 con las PDF-2 tripanosomales, son evidentes algunas diferencias a nivel de la secuencia de aminoácidos específicamente en los tres motivos característicos de las PDFs y en los dominios amino y carboxilo terminal.

En el caso de la PDF-2, el dominio amino terminal es mucho más largo que en PDF-1 y esto es más evidente en la PDF-2 de *L. major*. Del mismo modo todas las PDF-2 tripanosomales presentan una inserción interna de 16 aminoácidos, así como otra inserción de 11 aminoácidos en el extremo carboxilo, las cuales están ausentes en las PDF-1. Otra diferencia evidente en las PDFs de tripanosomátidos es que en todas las PDF-2 el dominio C-terminal es mucho más extenso que en las PDF-1.

El motivo 1 definido como GIGLAATQ en *E.coli* está muy conservado dentro de las PDF-1 de tripanosomátidos (CX₁SFSAPK) donde X es un aminoácido no polar, concretamente isoleucina (I) en *T. cruzi* y *T. brucei* y leucina (L) en *L. major*. En el caso de la PDF-2 este dominio también está conservado en tripanosomátidos (YPSX₁X₂APX₃) donde X₁ es un aminoácido no polar, leucina (L) en *T. cruzi* y *T. brucei* y metionina (M) en *L. major*, X₂ es un aminoácido polar con un grupo R sin

carga, cisteina (C) en *T. cruzi* y *T. brucei* y serina (S) en *L. major* y *X3* corresponde a glutamina (Q) en *L. major* y *T. brucei* y lisina (K) en *T. cruzi*. Este motivo difiere significativamente del motivo 1 presente en la PDF-1 (figura E.I.1.).

En el caso del motivo 2 el cual se define como EGCLS en *E. coli*, en tripanosomátidos está conformado por ENCIS en todas las PDF-1 y EPCAS en todas las PDF-2, sin embargo, nuevamente existen diferencias dentro de este motivo entre PDF-1 y PDF-2. El motivo 3 está muy conservado entre las PDF-1 y PDF-2 tripanosomales (XHELDHL) donde X es un aminoácido con un grupo alifático, metionina (M) en la PDF-1 y leucina (L) en la PDF-2 de tripanosomátidos.

Dominio amino terminal

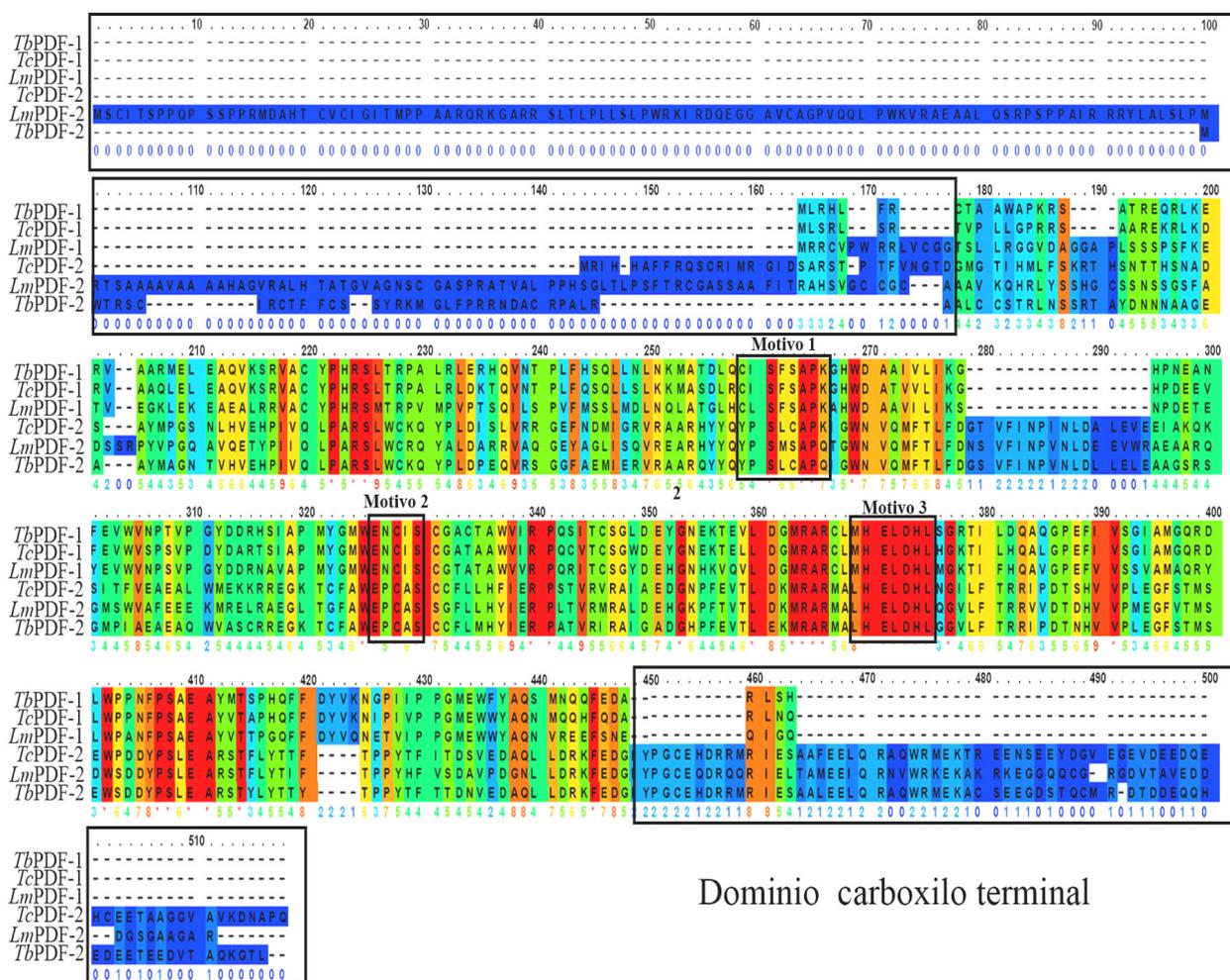


Figura E.I.1. Alineamientos de las secuencias de PDF-1 y PDF-2 de tripanosomátidos. En la figura aparecen señalados cada uno de los tres dominios típicos de esta familia de metaloproteasas. Del mismo modo se indican los dominios amino y carboxilo terminal presentes en las PDFs de tripanosomátidos.

E.II. Análisis comparativos de secuencias de PDFs eucariotas y procariotas

Un análisis comparativo de las secuencias de las PDF-1 y PDF-2 de tripanosomátidos obtenidas en este estudio con miembros de las PDF bacterianas, así como otras PDFs eucarióticas ha permitido detectar algunas características en común, así como también diferencias importantes a nivel de los motivos conservados de esta familia de metaloproteasas (figura E.I.2.).

Ortólogos de las PDFs eucariotas poseen un dominio N-terminal que está involucrado en la localización subcelular, que en el caso de humanos es mitocondrial mientras que en plantas presenta una localización dual tanto en la mitocondria como en plastidios (figura E.I.2.). En parásitos del orden apicomplexa esta extensión N-terminal está asociada a la localización en el apicoplasto (Giglione and Meinnel 2001; Bracchi-Ricard et al. 2001; Giglione and Meinnel 2001; Serero et al. 2003). En la mayoría de los casos una parte de este dominio es procesado y escindido una vez que la proteína alcanza su destino final intracelular.

En la PDF humana la región N-terminal parece adoptar una conformación que estabiliza el sitio activo y forma parte de la actividad deformilasa (Serero et al. 2003). Algunos residuos cercanos al N-terminal podrían estar participando en estabilizar a la proteína, posiblemente facilitando la adaptación a los metales disponibles o al elevado ambiente oxidativo del orgánulo. Las PDFs de plantas contienen una inserción característica que parece estar involucrada en la modulación del acceso del sustrato al sitio catalítico de la enzima (Fieulaine et al. 2005; Meinnel et al. 1996). Esta inserción también está presente en la PDF humana y en las PDF-2 tripanosomales, pero ausente en el resto de PDFs (figura E.I.2.).

El plegamiento de la región C-terminal de cada tipo de PDF es una propiedad distintiva que conducen a una conformación característica y esta diferencia no afecta el plegamiento del sitio activo (Fieulaine et al. 2005; Meinnel et al. 1996). Sin embargo, tanto la PDF-1 como la PDF-2 de tripanosomátidos, a diferencia del resto de PDFs analizadas, contienen un extenso dominio C-terminal el cual es mucho más evidente en las PDF-2 y su función queda por establecer. Es posible que estas extensiones estén implicadas en procesos de interacción proteína-proteína o que contribuyan a la estabilización de la estructura cuaternaria.

DISCUSIÓN

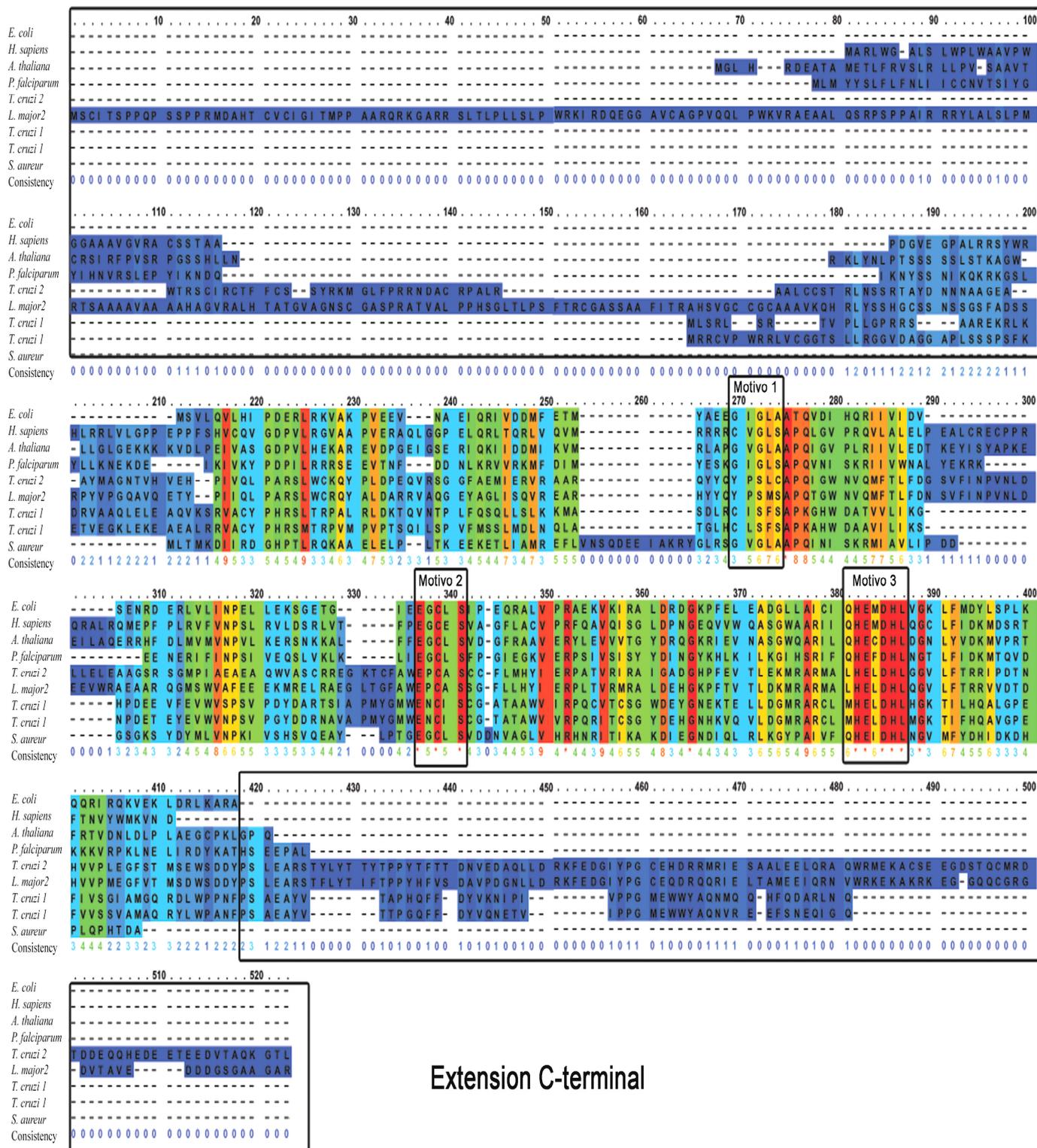


Figura E.I.2. Alineamientos de las secuencias de PDFs eucarióticas y procarióticas. En la figura aparecen señalados los tres dominios típicos de esta familia de metaloproteasas. Del mismo modo se indican los dominios amino y carboxilo terminal presentes en la PDF eucarióticas.

La estructura tridimensional de diversas PDFs ha sido obtenida, demostrando que en procariotas la unidad funcional de la enzima es un homodímero a excepción de

L. interrogans que al igual que las PDF de plantas y mamíferos forma dímeros aunque se desconoce el significado fisiológico de esta conformación (Escobar-Alvarez et al. 2009). Estos estudios han permitido identificar a nivel tridimensional la posición de los tres motivos característicos de estas proteínas así como el papel de los residuos del sitio activo implicados en catálisis además de proponer un mecanismo para la reacción de deformilación.

El motivo 1, el cual es GIGLAATQ en *E.coli*, y CVGLSAPQ en *Homo sapiens*, exhibe sustituciones sistemáticas en tripanosomátidos (YPSMSAPQ en las PDF-2 y CXSFSA PK en las PDF-1). El motivo 2 (EGCLS en *E. coli*, y EGCES en *Homo sapiens*) presenta también algunos cambios importantes. La leucina (L) presente en la PDF bacteriana, es uno de los aminoácidos críticos para la actividad catalítica de la enzima y está involucrado en interacciones hidrofóbicas con la cadena lateral P₂' del sustrato (Becker et al. 1998). Este aminoácido ha sido reemplazado por ácido glutámico en la PDF humana (E) y se ha especulado que esta mutación justifica la baja actividad de la enzima humana hasta el punto de que algunos autores piensan que solo se trata de un vestigio evolutivo sin función aparente (Lee et al. 2004; Nguyen et al. 2003). Al reemplazar el ácido glutámico por leucina la enzima humana se hace tan activa como su ortólogo bacteriano y al reemplazar la leucina por glutámico en la PDF bacteriana, la enzima se vuelve prácticamente inactiva (Nguyen et al. 2003). Esta baja actividad unido a que algunos inhibidores experimentales de la PDF que parecían activos frente a la enzima recombinante no tenían efecto sobre células humanas en cultivo, hizo pensar que en mitocondrias humanas no se produce deformilación (Nguyen et al. 2003).

Sin embargo, otros estudios más recientes contradicen esta hipótesis y plantean la posibilidad de que esos inhibidores no eran activos *in vivo* debido a que no logran atravesar la barrera de la membrana mitocondrial y que el sustrato utilizado en los ensayos enzimáticos no era el adecuado. Lee et al, empleando sustratos diseñados en base a proteínas mitocondriales humanas, demostraron que la enzima humana era mucho más activa y que derivados de la actinonina presentaban potentes efectos antiproliferativos frente a 16 líneas tumorales. Esto sugiere que la deformilasa humana es funcional y que podría ser un blanco bioquímico novedosos para el diseño de antitumorales en base a la dependencia de un metabolismo energético mitocondrial activo por parte de ciertos tipos de tumores (Lee et al. 2004).

En el caso de PDF de tripanosomátidos el dominio 2 está conformado por la secuencia ENCIS en PDF-1 y EPCAS en PDF-2, y en ambos casos la leucina ha sido

reemplazada por isoleucina (**I**) en la PDF-1 y por alanina en la PDF-2. Sin embargo, en ambos casos la sustitución ha sido por un aminoácido apolar del mismo tipo que la leucina, mientras que la sustitución en la PDF humana ha sido por un aminoácido cargado negativamente (**E**) (figura E.I.2.)

El motivo 3 (QHEMDHL) en *E. coli*, el cual es crítico para la coordinación del metal y activación del sustrato, está bastante conservado entre todas las PDFs analizadas.

En el caso de las PDFs de tripanosomátidos este motivo está conformado por la secuencia XHELDHL donde X es un aminoácido alifático, siendo metionina (Met) en la PDF-1 y leucina (Leu) en la PDF-2.

El ciclo catalítico propuesto para la péptido deformilasa (Becker et al. 1998) es similar al descrito para otras metalopeptidasas de zinc tales como termolisina (Meinzel et al. 1996) y carboxipeptidasa A (Leopoldini et al. 2006) (figura E.I.3.).

El paso 1 representa el estado inicial de la PDF asociado a su cofactor metálico y a dos moléculas de agua. En el paso 2, el péptido formilado se asocia a la enzima reemplazando la molécula de agua (W2) uniéndose al metal a través del oxígeno carbonilo del formilo, dando lugar a un complejo enzima sustrato. El grupo carbonilo es polarizado por puentes de hidrógeno entre el grupo amida de la leucina del motivo 2 y la cadena lateral de la segunda glicina (50 en la PDF de *E. coli*) del motivo 1 mientras que el grupo NHR en el sustrato interactúa con el oxígeno carbonilo de la primera glicina del motivo 1 (45 en la PDF de *E. coli*), esto promueve el ataque nucleofílico del hidróxido del agua unido al metal sobre el carbono del grupo formilo, lo cual conduce a un intermediario tetrahedral.

En el paso 3 el protón resultante es entonces transferido al amida del amino terminal del péptido con la ayuda de la glutamina del motivo 3, la protonación del grupo amida determina la escisión del enlace C-N, el formato aparece unido al metal y el N-terminal amino libre está vinculado a la glutamina y a la Gly 45 por un enlace de hidrógeno (paso 4). En el paso 5 la reacción procede hacia la disociación del péptido, el cual deja un complejo activado enzima-formiato.

El ciclo de la reacción se completa con la liberación de formiato y la unión de dos moléculas de agua W1 y W2 al cofactor metálico (Becker et al. 1998).

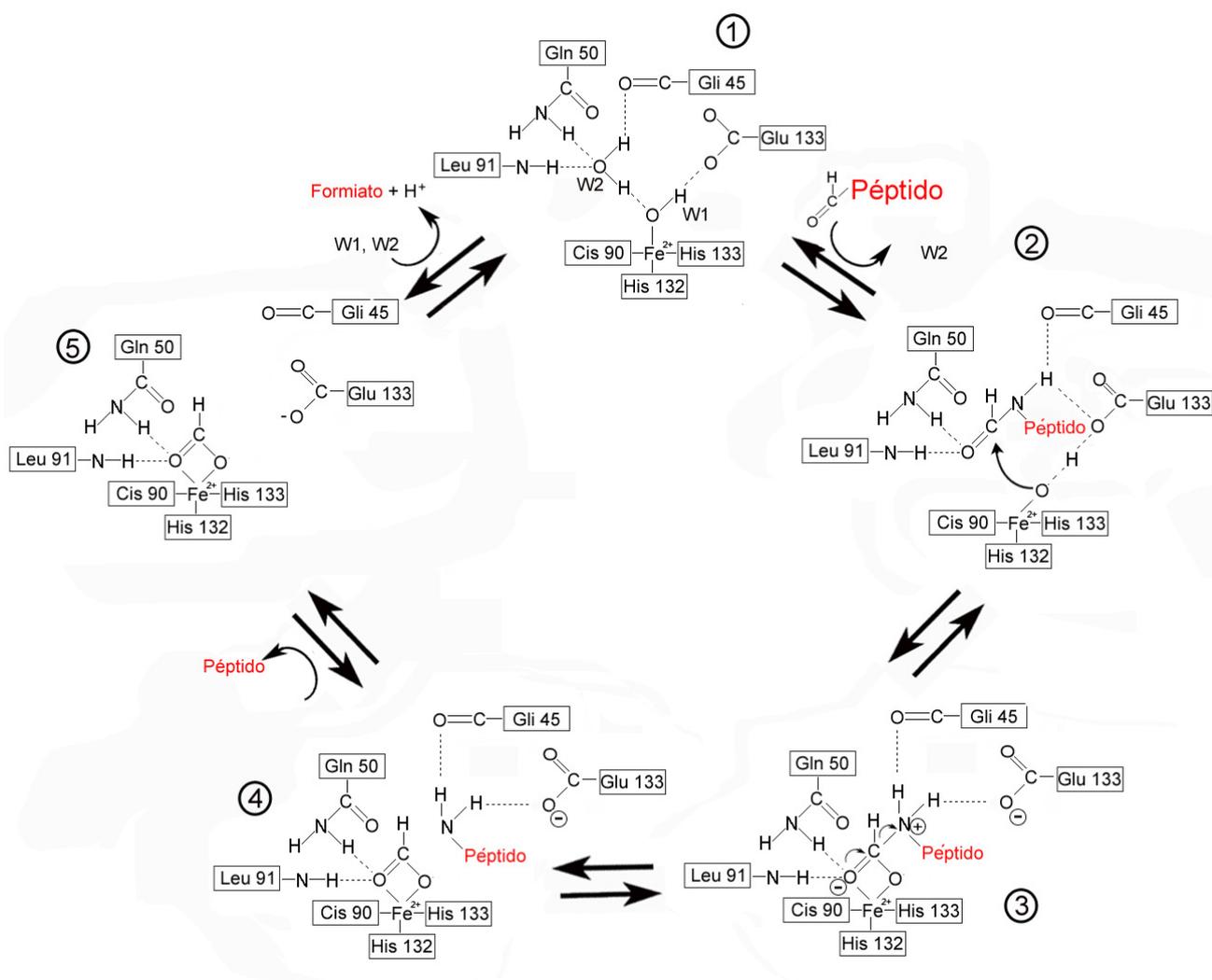


Figura E.I.3. Mecanismo de reacción propuesto para la péptido deformilasa (Becker et al. 1998).

La presencia de dos ortólogos de PDFs en tripanosomátidos, hace pensar que los procesos fisiológicos en los que participan estas proteínas pueden ser fundamentales en el metabolismo de estos organismos. Dada la fuerte homología del dominio catalítico con otras PDFs bien caracterizadas (Giglione and Meinnel 2001) y el hecho de que en este estudio se ha demostrado que tanto PDF-1 como PDF-2 son esenciales para la supervivencia celular, todo apunta a que probablemente ambas proteínas tengan actividad deformilasa. Algunas bacterias contienen dos copias del gen *def*. En el caso de

S. aureus sólo una es funcional, mientras que la otra presenta algunas desviaciones en las secuencias de los motivos catalíticamente importantes y se ha demostrado que no es activa. En el caso de *Bacillus subtilis* también están presentes dos copias del gen *def*, ambas son funcionales y la presencia de al menos una hace prescindible la otra copia. Este no es el caso de tripanosomátidos, ya que el efecto deletereo de la depleción de PDF-1 no puede ser compensado por la presencia de PDF-2, y del mismo modo los efectos antiproliferativos producto de la depleción de PDF-2 no son contrarrestados por la presencia de PDF-1.

Recientemente se ha sugerido que PDF-1 y PDF-2 pueden tener funciones solapantes. Así PDF-1 puede estar deformilando todas la proteínas sintetizadas en la mitocondria, aunque algunas de manera poco eficaz y PDF-2 puede ser mas selectiva y sólo deformila proteínas que son reconocidas ineficientemente por PDF-1 (Bouzaidi-Tiali et al. 2007).

En el caso de plantas también existen dos ortólogos de PDF (Giglione et al. 2000). Una está esencialmente localizada en la mitocondria (PDF1A) mientras que la otra (PDF1B) se localiza en plastidios y mitocondrias. A diferencia de PDF1A, PDF1B es esencial para la función de cloroplastos (Giglione and Meinnel 2001). Sin embargo, las dos proteínas son funcionalmente redundantes. La sobreexpresión de PDF1A compensa parcialmente la ausencia de PDF1B y la sobreexpresión de PDF1A puede complementar la ausencia de PDF1B (Giglione et al. 2003). Los tripanosomátidos están estrechamente relacionados con los euglenoides, muchos de los cuales tienen plastidios. Un número de genes que codifican homólogos de proteínas encontradas en cloroplastos han sido encontrados en el genoma de *T. brucei* (Hannaert et al. 2003). Así se ha sugerido que *T. brucei* puede tener un plastidio el cual se ha perdido secundariamente (Serero et al. 2003). Es probable, por lo tanto, que una de las dos PDFs tripanosomales represente un remanente evolutivo de una PDF que originalmente estaba localizado en el plastidio. Sin embargo, aunque la historia evolutiva de una de las PDFs tripanosomales puede estar vinculada al plastidio, esta claro que actualmente ambas proteínas tienen una función mitocondrial. En este trabajo aunque se obtuvo la PDF-2 de *T. cruzi* en forma soluble, no fue posible purificarla a homogeneidad, ni detectar actividad deformilasa.

Ortologos de PDF han sido identificados y caracterizados en *P. falciparum* (Giglione et al. 2000; Bracchi-Ricard et al. 2001). Se ha demostrado que inhibidores de la PDF interfieren con el crecimiento del estadio intraeritrocítico de este parásito

(Bracchi-Ricard et al. 2001). Basado en estas observaciones se ha propuesto que la PDF plasmoidal puede ser explotada como un nuevo blanco para fármacos antimaláricos (Giglione and Meinel 2001; Giglione et al. 2000).

El trabajo desarrollado en esta tesis se ha planteado con el fin de estudiar el papel de las PDFs de *T. brucei* en la proliferación y sus repercusiones en el metabolismo celular así como caracterizar su actividad enzimática. Las importantes diferencias entre las PDFs a nivel estructural, así como el carácter esencial de la ruta en la cual están involucradas, pueden constituir un punto de partida para el desarrollo de una terapia novedosa frente a enfermedades parasitarias.

E.III. Expresión, purificación y caracterización de la proteína recombinante de *Trypanosoma cruzi*

La pauta abierta de lectura del gen *TcPDF-1* codifica una proteína de 260 aminoácidos, con una masa molecular teórica de 29.5 kDa y un punto isoeléctrico teórico de 8.15. En el caso de *TcPDF-2* el gen correspondiente codifica una proteína de 366 aminoácidos, con una masa molecular teórica de 42.1 kDa y un punto isoeléctrico de 5.37. Como se ha mencionado previamente, la secuencia primaria de PDF-1 esta muy conservada entre los miembros de la familia *Trypanosomatidae* y esta afirmación se puede extender a la PDF-2.

Alineamientos de diferentes PDFs permiten identificar una larga extensión N-terminal presentes en todas las PDFs eucariotas pero ausente en las PDFs bacterianas (figura E.I.2.). Los primeros intentos de expresión de la forma nativa de PDF-1 y PDF-2 de tripanosomátidos en forma soluble en sistemas heterólogos de *E. coli* fueron infructuosos. Estudios realizados con otras PDFs eucariotas, que describen las dificultades en obtener proteína nativa soluble, justifican esta observación por el carácter hidrofóbico de la extensa región N-terminal que posiblemente conduce a la acumulación en cuerpos de inclusión en los sistemas de expresión bacteriano. Teniendo en cuenta que la proteína que se localiza en la mitocondria de plantas y en humanos es de menor longitud y que la mayoría de las proteínas mitocondriales sufren un procesamiento de su extremo amino tras su interiorización, se han realizado truncamientos sistemáticos en la región N-terminal, sin comprometer los residuos importantes para la actividad enzimática. Esta estrategia ha permitido expresar otras

PDFs en forma soluble y activa en cantidades (Bracchi-Ricard et al. 2001; Fieulaine et al. 2005; Giglione et al. 2000; Serero et al. 2003).

Inicialmente se abordó la caracterización de la PDF-1 y la PDF-2 de *T. cruzi*, *T. brucei* y *L. major*. Por ello se diseñó una estrategia basada en la obtención de proteínas truncadas como se ha mencionado previamente. En el caso de la PDF-1 y PDF-2 de *L. major* bajo diferentes condiciones experimentales, no fue posible obtener proteínas en forma soluble. Del mismo modo se procedió con las PDFs de *T. brucei* y en este caso se obtuvieron truncamientos con los cuales se pudo expresar proteína en forma soluble, eliminando 10, 33 o 35 aminoácidos, aunque la purificación fue difícil de optimizar para obtener un alto rendimiento de proteína. Se centró el estudio en la PDF-1 y PDF-2 de *T. cruzi* donde fue posible obtener proteína soluble y en el caso de la PDF-1 la proteína fue purificada con un alto grado de pureza (Figura E.1.4.).

Los análisis de las secuencias de las PDFs de tripanosomátidos mencionados al inicio de este apartado, permiten establecer un alto grado de conservación entre las PDF-1 y las PDF-2 de tripanosomátidos y ello conducen a pensar que algunas de las conclusiones derivadas de los estudios realizados con las enzimas recombinantes de *T. cruzi* pueden ser válidas también para las PDF-1 y PDF-2 de *T. brucei* y *L. major*.

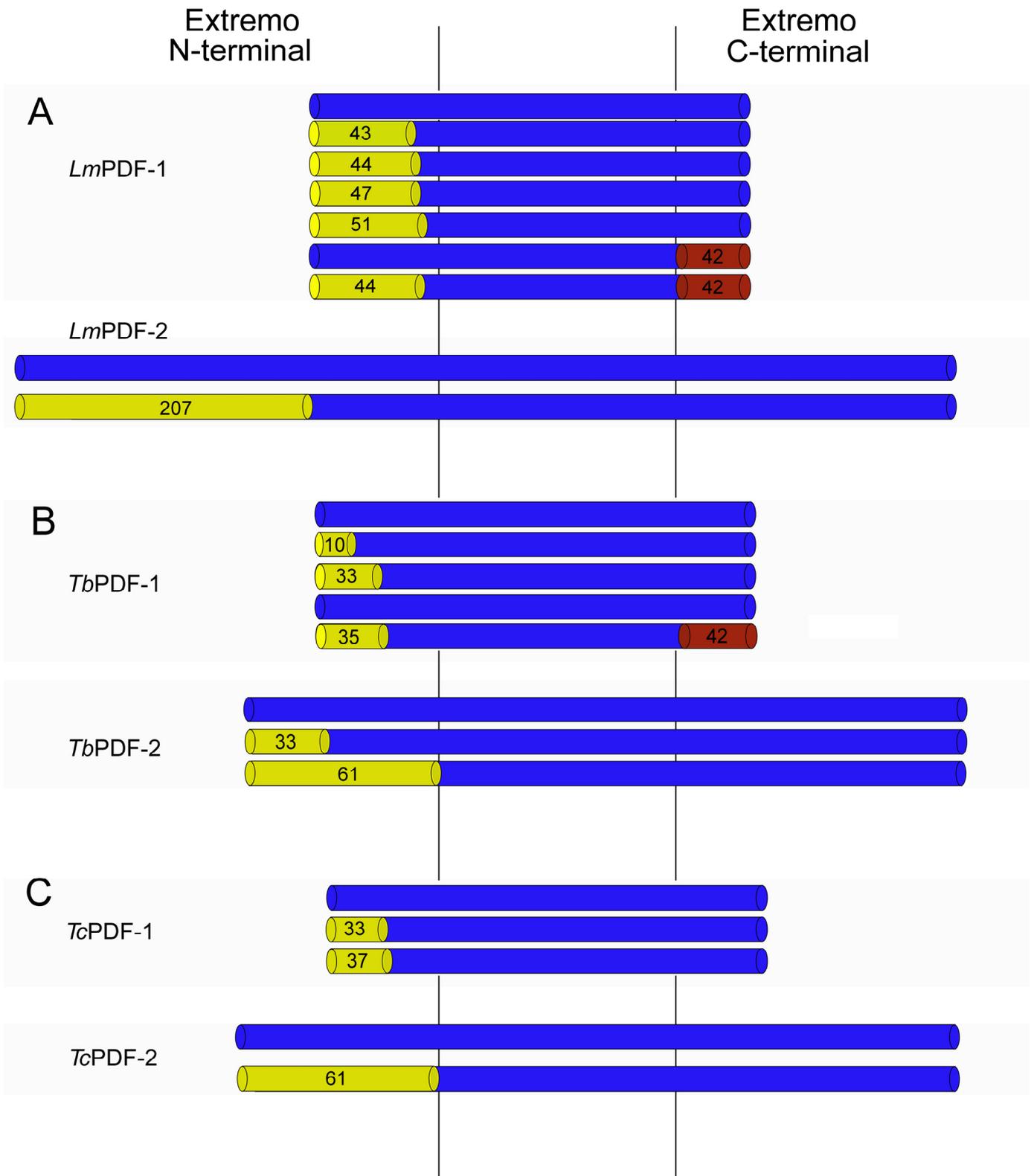


Figura E.1.4. Diagrama esquemático de los truncamientos diseñados para la obtención de proteína soluble en el caso de la PDF-1 y PDF-2 de: A) *Leishmania major*, B) *Trypanosoma brucei*, *Trypanosoma cruzi*.

Los truncamientos fueron diseñados considerando la posición de los dominios conservados y la posición de los tres primeros aminoácidos de la PDF bacteriana que son esenciales para la actividad (Meinzel et al. 1996). De esta manera se ha procedido a la eliminación de los 37 primeros aminoácidos de la PDF-1 de *T. cruzi* lo que dió lugar a una enzima soluble y activa. En el caso de la PDF-2 de *T. cruzi* fue necesario la eliminación de 61 aminoácidos del extremo amino para producir proteína soluble (figura E.I.4.).

E.III.1. Caracterización cinética de la PDF-1 de *Trypanosoma cruzi*

Las PDFs de eucariotas y procariotas tienen un papel fundamental en la célula escindiendo el grupo formilo presente en la metionina del polipéptido naciente, un requisito fundamental para el posterior reconocimiento de enzimas procesadoras como las aminopeptidasas, las cuales son incapaces de reconocer péptidos formilados, que además de ser tóxicos para el organismo, no alcanzan su madurez biológica final.

E.III.2. La PDF-1 de *Trypanosoma cruzi* es activa frente a un péptido formilado: el formil-metionil-alanil-serina (f-MAS) como sustrato

Una de las características más destacables de las PDF eucariotas es que presentan valores muy altos de K_m para el f-MAS en relación a su homólogo bacteriana. Este sustrato ha sido diseñado teniendo en cuenta un amplio espectro de péptidos bacterianos, ya que el ensayo enzimático original fue planteado para el estudio de la PDF de *E. coli* y está basado en el acoplamiento de la producción de formiato a la reacción de la formiato deshidrogenasa que reduce NAD^+ con el consecuente incremento de absorbancia.

Dependiendo de las condiciones de purificación y el cofactor metálico asociado, la K_m de la PDF de *E. coli* varía pero es de aproximadamente 4 mM para el f-MAS (Dardel et al. 1998; Meinzel and Blanquet 1995; Meinzel and Blanquet 1995). La PDF humana presenta una K_m para este sustrato de 11 mM.

En el caso de la PDF-1 de *T. cruzi* la K_m determinada fue de 22.4 mM para el sustrato f-MAS, siendo más alta que la observada para otras PDFs como la bacteriana y la PDF humana. El valor de K_{cat} obtenido para la PDF-1 de *T. cruzi* fue de $0,093 \text{ S}^{-1}$ y la

constante de especificidad (K_{cat}/K_m) es de $4.17 \text{ M}^{-1}\text{S}^{-1}$. Este último valor es más bajo que el de la PDF de *E. coli*, y la PDF de eucariotas como la de *P. falciparum*, pero comparable a la PDF de humanos y a la PDF-1 de *T. brucei* (Bouzaidi-Tiali et al. 2007)(tabla E.I.1.). De hecho, la PDF-1 de *T. cruzi* presenta una mayor actividad frente a este sustrato que la PDF humana.

La baja actividad de la enzima de *T. cruzi* puede ser debido a factores como la identidad del cofactor metálico presente en el sitio activo, ya que durante el proceso de expresión en el sistema bacteriano pueden incorporarse otros cationes divalentes de identidad desconocida que pueden afectar a la actividad. El cofactor metálico también puede intercambiarse o perderse durante el paso de purificación en la columna de afinidad a níquel.

La identidad del sustrato es determinante en la eficiencia catalítica de las PDFs.

El sustrato empleado en este estudio (f-MAS) está basado en proteínas bacterianas y difiere mucho de la secuencia amino terminal de proteínas codificadas por el genoma mitocondrial, los cuales deben ser los sustratos fisiológicos de las PDFs eucarióticas. En los estudios con la PDF humana empleando sustratos basados en proteínas codificadas por el genoma mitocondrial, la actividad catalítica observada fue más alta que la observada empleando el sustrato f-MAS (tabla E.I.1.)(Lee et al. 2004).

Enzima	Organismo	Sustrato	K_m (mM)	K_{cat} (S ⁻¹)	K_{cat}/K_m (M ⁻¹ /S ⁻¹)	Referencia
Co-TcPDF-1	<i>T. cruzi</i>	f-MAS	22,4	0,093	4,17	Rodrigues-Poveda, Tesis doctoral 2010
Zn-TbPDF-1	<i>T. brucei</i>	f-MX	1	0,008	8	Bouzaidi-Tiali y col. 2007
Co-HsPDF	<i>H. sapiens</i>	f-MAS	11	0,0081	0,74	Lee y col. 2004
Co-HsPDF	<i>H. sapiens</i>	f-MAHA	1,7	0,016	9,2	Lee y col. 2005
Co-HsPDF	<i>H. sapiens</i>	f-MTMH	0,45	0,0024	5,4	Lee y col. 2006
Ni-PfPDF	<i>P. falciparum</i>	f-ML-pNA	0,2	0,00274	13700	Bracchi-Ricard y col. 2001
Fe-EcPDF	<i>E. coli</i>	f-ML-pNA	0,02	70	$3,5 \times 10^6$	Rajagopalan y col 2000
Co-EcPDF	<i>E. coli</i>	f-ML-pNA	0,018	19,1	$1,1 \times 10^6$	Rajagopalan y col 2001
Ni-EcPDF	<i>E. coli</i>	f-MAS	3,9	210	54000	Ragusa y col 1998

X indica que el peptido esta compuesto de una mezcla equimolar de 19 aminoacidos inusuales.

Tabla E.I.1. Comparación de los parámetros cinéticos de la PDF de *T. cruzi*, *H. sapiens* y *E. coli* frente a diferentes sustratos.

En el presente trabajo no fue posible estudiar la actividad deformilasa de la PDF-1 de *T. cruzi* frente a sustratos diseñados en base a proteínas codificadas por el genoma mitocondrial, ya que en el caso de tripanosomátidos este tipo de sustrato presentan un alto grado de hidrofobicidad lo que dificulta su solubilización. En este estudio se intentó determinar la actividad de PDF-1 frente al sustrato Formil-metionil-leucil-fenilalanina (f-MLF), sin embargo, aun empleando concentraciones bajas de detergente no fue posible su solubilización.

A diferencia de plantas donde se han realizado estudios mas detallados de los procesos de modificaciones post-traduccionales en orgánulos, aún no existe evidencia de que en la mitocondria de tripanosomátidos la deformilación sea operativa. Sólo dos proteínas sintetizadas en la mitocondria han sido secuenciadas directamente, una es la citocromo b y la otra es la subunidad I de la citocromo oxidasa. Cada una de estas proteínas debe ser tratada con HCl previo a su secuenciación, debido a que su extremo amino está bloqueado, lo que sugiere que contienen una formil-metionina sin procesar. Se desconoce si este es el caso para el resto de las proteínas codificadas por el genoma organelar y quizás también es válido para la mitocondria de humanos (Serero et al. 2003).

Por otro lado, la PDF-1 de *T. cruzi* comparte algunas características cinéticas con la PDF bacteriana. Así presentan inhibición por sustrato. En el caso de la PDF de *E. coli* por encima de 4 mM hay una reducción importante de la actividad (Meinzel and Blanquet 1995) mientras que con la PDF-1 de *T. cruzi* el mismo fenómeno se observa a partir de 35 mM. Del mismo modo ambas enzimas parecen mas activas en presencia de KCl y presentan un máximo a 0.5M.

En general los valores de K_m altos observados para las PDFs eucariotas pueden deberse a una menor capacidad de discriminación de sustrato ya que hipotéticamente pueden reconocer y actuar sobre diferentes péptidos formilados en su primera metionina. Esta clase de enzimas probablemente han evolucionado “sacrificando” una mayor velocidad de catálisis por la capacidad de reconocer una mayor variedad de sustratos.

E.III.3. Requerimiento de iones divalentes

Todas las PDFs descritas hasta la fecha presentan una dependencia de cofactores metálicos divalentes, que parecen regular su actividad.

En el caso de la PDF de *E. coli*, el cofactor metálico nativo es el hierro, sin embargo esta forma es muy inestable debido a la sensibilidad al oxígeno ambiental. (Hu et al. 1998). Inicialmente la caracterización del gen de la deformilasa de *E. coli* (Meinzel and Blanquet 1993; Meinzel and Blanquet 1995) reveló la presencia de un motivo típico de unión a zinc, HEXXH (donde X puede ser cualquier aminoácido). Este motivo está estrictamente conservado en todas las PDFs secuenciadas hasta la fecha. La enzima purificada contenía aproximadamente un ión metálico por monómero.

Diversos estudios con proteínas obtenidas mediante cromatografía de filtración en gel, intercambio aniónico y cromatografía de interacción hidrofóbica parecían indicar que la PDF de *E. coli* pertenecía a la superfamilia de hidrolasas de zinc (Meinzel and Blanquet 1993; Meinzel and Blanquet 1995). Sin embargo, la mayoría de estas preparaciones exhibían una actividad hidrolítica baja frente al sustrato f-MAS. En estudios donde la enzima presentaba una mayor capacidad catalítica se determinó que la PDF purificada contenía zinc y cantidades variables de otros metales (Fe^{2+} , Co^{2+} o Cu^{2+}) postulando que otro metal además del zinc, podía ser el responsable de esta elevada actividad (Leopoldini et al. 2006).

En definitiva el reemplazamiento del ión Fe^{2+} por Ni^{2+} , Co^{2+} y Zn^{2+} (Chan et al. 1997; Becker et al. 1998) ha permitido obtener formas estables de la PDF bacteriana y el zinc constituye el ión menos eficiente (Meinzel and Blanquet 1995). Esto contrasta con la PDF de *Arabidopsis thaliana* la cual contiene zinc en su forma nativa, (Fieulaine et al. 2005) mientras que la identidad del catión metálico de la PDF de humanos no se conoce con exactitud, pero las preparaciones obtenidas sólo son activas en presencia de cobalto (Escobar-Alvarez et al. 2009). En el presente trabajo la enzima de *T. cruzi* se ha purificado tras inducir el sistema de expresión en un medio de cultivo suplementado con cloruro de cobalto. Posteriormente, para estudiar las preferencias de la PDF-1 de *T. cruzi*, en cuanto a la identidad de catión divalente, se realizaron ensayos en presencia de cantidades crecientes de sales de cobalto, cobre, magnesio, manganeso y níquel. Los resultados demuestran que a diferencia de la PDF bacteriana, el níquel inhibe la actividad deformilasa de la PDF-1 de *T. cruzi*. Este resultado contrasta también con la PDF de *P. falciparum* la cual es más activa con níquel como cofactor metálico (Bracchi-Ricard et al. 2001), mientras que el cobalto sólo a concentraciones altas disminuye ligeramente la actividad. En el caso del Mg^{2+} y Mn^{2+} no se observan efectos sobre las propiedades catalíticas de la PDF-1. Finalmente tras la incubación con Cu^{2+} se observó un incremento significativo de la actividad.

No parece claro cual puede ser la causa de los cambios observados en la actividad deformilasa bacteriana de los distintas formas de la enzima asociadas a diferentes cationes metálicos, ya que los cuatro complejos asociados bien sea con Fe^{2+} , Zn^{2+} , Co^{2+} y /o Ni^{2+} presentan la mismas características estructurales y parámetros termodinámicos comparativamente similares, por lo que se ha postulado que posiblemente las diferencias en la actividad de PDF no están determinadas estrictamente por la identidad del metal sino mas bien por factores asociados a las condiciones técnicas experimentales de la purificación de PDF de los diferentes estudios (Leopoldini et al. 2006).

Estudios de mutagénesis dirigida (Meinzel and Blanquet 1995) y cristalografía (Boyer 1997) junto con espectroscopía de resonancia magnética nuclear revelan que el ión metálico presenta una coordinación tetrahedral. En el caso de la PDF de *E.coli* los ligandos son el átomo de azufre de la cisteína 90, el átomo de nitrógeno de las histidinas 136 y 132 y el átomo de oxígeno de una molécula de agua. Por otra parte el glutamato 133 del motivo 3 (HEXXH) no se une al metal sino que participa en la catálisis. De hecho, mutaciones en este residuo dan lugar a una proteína catalíticamente inactiva (Leopoldini et al. 2006).

E.III.4. Sensibilidad a inhibidores de metaloproteasas

La actinonina ha sido reconocida desde 1960 como un agente antibacteriano moderado pero no fue hasta el año 2000 cuando se describió como un inhibidor de la PDF bacteriana, aunque nunca ha sido desarrollado como agente terapéutico debido a la ausencia de eficacia *in vivo*, posiblemente debido a su inestabilidad (Gordon et al. 1962; Broughton et al. 1975).

Ahora se sabe que la actinonina es un compuesto que contiene un grupo hidroxamato, el cual es esencial para su actividad antibacteriana y forma parte de la estructura de algunos inhibidores de metalohidrolasas (Broughton et al. 1975). Otros compuestos que contienen este grupo son inhibidores muy potentes de diversas metaloproteasas (Rasmussen and McCann 1997; Whittaker and Brown 1998; Toba et al. 1999). Aunque en la literatura se describen diferentes grupos quelantes, el hidroxamato permanece como uno de los más activos y muchos inhibidores de metaloproteasas actualmente en ensayos clínicos, son compuestos basados en este grupo funcional (Toba et al. 1999).

Otros inhibidores de la PDF que contienen grupos similares capaces de asociarse al cofactor metálico han sido reportados (Hao et al. 1999; Hu et al. 1998); (Meinzel et al. 1999; Durand et al. 1999). Estos inhibidores son menos activos que la actinonina (Hu et al. 1998; Meinzel et al. 1999; Durand et al. 1999).

La actividad de la actinonina frente a la PDF bacteriana fue un descubrimiento clave para el desarrollo de nuevos inhibidores más potentes y selectivos. La PDF bacteriana presenta un K_i de 0.3 μM para la actinonina (Chen et al. 2000), mientras que para la PDF de *P. falciparum* se ha determinado una IC_{50} de 2.5 μM (Bracchi-Ricard et al. 2001) y ha demostrado ser potente como agente antiproliferativo tanto frente a la cepa salvaje como en una cepa multiresistente, con valores de IC_{50} de 3 y 3.6 μM respectivamente (Wiesner et al. 2001). Para la PDF de *A. thaliana* se alcanza una completa inhibición con 20 μM . En el caso de la PDF humana, el IC_{50} frente a la actinonina es de 43 nM mientras que la actinonina y derivados han demostrado ser muy efectivos como agentes antitumorales tanto *in vitro* como *in vivo* (Coustou et al. 2003).

En esta trabajo de tesis se estudiaron los efectos de la actinonina frente a la PDF-1 de *T. cruzi*, así como también los posibles efectos antiproliferativos de la actinonina sobre la línea *Tb449* que corresponde a la forma procíclica y la línea *TbS16* que corresponde a la forma sanguínea de *T. brucei*. En el caso de la enzima PDF-1 de *T. cruzi*, concentraciones tan altas como 10 μM no parecen afectar a la actividad enzimática, mientras que en las formas en cultivo tanto en la procíclica como en la sanguínea, dosis de 100 μM no producen efectos visibles sobre la proliferación celular. En definitiva, la actinonina no es un inhibidor de la PDF de *Trypanosoma*, ni inhibe su crecimiento. Estas observaciones apuntan a que existen diferencias importantes entre la PDF humana y la de protozoarios que pueden ser explotables desde un punto de vista quimioterapéutico para el diseño de inhibidores más potentes y selectivos frente a estos agentes patógenos.

Teniendo en cuenta el hecho de que PDF-1 es una metaloproteasa en esta tesis se han probado algunos inhibidores genéricos de metaloproteasas. Como se ha mencionado, la dependencia sobre el cofactor metálico parece ser similar al resto de las PDFs descritas. Es de destacar que determinados inhibidores de metaloproteasas actúan como agentes quelantes, con lo que resulta también de interés estudiar el efecto de estos compuestos así como el ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), un conocido quelante de iones metálicos. Tanto el EDTA como la 1,10 fenantrolina, que preferencialmente captan iones níquel, producen un incremento importante en la actividad de PDF-1 de *T.*

cruzi, siendo más significativo en el caso de la fenantrolina. Esta observación en principio contradictoria ha sido previamente observada en *E. coli*. El efecto activador se basa en la quelación de iones metálicos presentes en las preparaciones de enzima purificada que actúan inhibiendo la actividad. Es de destacar que en nuestro caso la purificación se realiza en una columna de afinidad a níquel y es posible que la proteína retenga algo de este catión metálico durante su aislamiento. Por otra parte sabemos que el cobalto a concentraciones altas también afecta la actividad y este ión se encuentra en el medio de cultivo bacteriano durante la sobreexpresión de la PDF-1 de *T. cruzi*.

En definitiva, los resultados obtenidos con los diferentes agentes quelantes son algo contradictorios, pero parecen sugerir la presencia de iones metálicos que son deletéreos para la actividad y que son eliminados tras la incubación con estos compuestos.

En contraste con la PDF-1 de *T. cruzi*, todas las PDF bacterianas son sensibles a 1,10mM fenantrolina a concentraciones de 5 mM. Finalmente inhibidores de metaloproteasa como la bestatina, el cual es selectivo y no afecta a aminopeptidasas, el CL-82198 que es más selectivo frente a un tipo particular de metaloproteasa y el CP101537 otro inhibidor de metaloproteasas, que actualmente es un candidato para ensayos clínicos como antimicrobiano a concentraciones de hasta 100 μ M no tienen ningún efecto sobre la actividad enzimática de la PDF bacteriana ni sobre la PDF de *Trypanosoma*.

E.IV. Localización intracelular

Considerando que la síntesis de proteínas en orgánulos comienza con una metionina formulada y que esta modificación está ausente en la síntesis citosólica y por otra parte que la mitocondria contiene un genoma propio que codifica proteínas específicas, es de esperar que las PDFs eucarióticas en general se localicen en orgánulos.

De acuerdo con esta observación las PDFs en eucariotas estarían asociadas a la deformilación de proteínas que tiene lugar en la mitocondria, lo que ha sido recientemente confirmado tanto en plantas como en humanos (Bracchi-Ricard et al. 2001; Giglione et al. 2000; Serero et al. 2003; Fieulaine et al. 2005). Una excepción es *Plasmodium* donde la PDF se localiza en el apicoplasto (Bracchi-Ricard et al. 2001) y

A. thaliana que se localiza tanto en mitocondria como en cloroplastos (Fieulaine et al. 2005).

Los resultados obtenidos en este estudio a partir de datos de inmunofluorescencia con el anticuerpo frente a *TcPDF-1* y el anticuerpo frente a *TcPDF-2* en la forma procíclica de *T. brucei*, revelaron una clara localización mitocondrial. Esta observación está de acuerdo con la idea de que estas proteínas están asociadas al procesamiento post-traducciona l de proteínas codificadas por el kinetoplasto y que forman parte de los diversos complejos involucrados en la fosforilación oxidativa, con lo que la PDF tendría un papel fundamental en el mantenimiento de la función mitocondrial.

E.V. PDF-1 y PDF-2 son necesarias para la proliferación celular en la forma procíclica de *Trypanosoma brucei*

Con el fin de profundizar en el papel de las PDFs en tripanosomátidos y determinar las consecuencias de la depleción en los niveles de estas proteínas sobre la viabilidad celular, se han generado líneas de *T. brucei* donde se han modulado los niveles de expresión de PDF-1 y PDF-2 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 tales como 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, sino 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 por Ngo et al. en 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 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 RNAm diana mediante las cadenas complementarias de los diferentes siRNAs desencadenando un proceso de degradación de dicho RNAm, impidiendo por tanto la traducción a proteína (Hannon 2002).

Uno de los problemas principales de esta técnica es que en muchos casos no se puede alcanzar una degradación del 100 % del RNAm, 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 de la proliferación 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 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 and 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 las PDFs que han sido descritas como proteínas esenciales en todos los organismos estudiados hasta la fecha.

Para el análisis de la función del gen *PDF-1* y *PDF-2* en *T. brucei* se utilizó la estrategia de estructura tallo-lazo o “stuffer” y se estudió el efecto en las dos formas en cultivo, sanguíneas y procíclicas de *T. brucei*. Cuando el silenciamiento se llevó a cabo en la forma procíclica, la inducción del fenómeno produjo una significativa inhibición de la proliferación, mostrando una correlación proporcional entre los niveles de RNAm tanto para *PDF-1* como *PDF-2* y la disminución de la proliferación. Los resultados obtenidos con los estudios de RNAi en la forma procíclica estarían de acuerdo con el

hecho de que tanto PDF-1 como PDF-2 son proteínas esenciales para la viabilidad celular.

E.V.1. La interferencia de la expresión de PDF-1 y PDF-2 produce alteraciones en el potencial de membrana mitocondrial en la forma procíclica de *Trypanosoma brucei*

La forma procíclica de *T. brucei* se caracteriza por presentar una mitocondria muy desarrollada, larga y ramificada, con múltiples crestas, enzimas del ciclo de Krebs, y niveles abundantes del complejo F1Fo-ATP sintetasa. Posee también una cadena respiratoria completa que oxida los equivalentes reducidos generados por el metabolismo de aminoácidos y la vía glicolítica (Besteiro et al. 2005). Contienen 4 complejos que donan electrones al pool de ubiquinona, el complejo I compuesto por NADH:ubiquinona oxidoreductasas y una enzima insensible a rotenona, (Fang et al. 2001; Fang and Beattie 2003), el complejo II compuesto por una succinato deshidrogenasa y glicerol 3-fosfato deshidrogenasa y los complejos III y IV que son similares a los de la cadena respiratoria clásica (van Hellemond et al. 2005).

El metabolismo mitocondrial de esta forma del ciclo de vida depende de la degradación de piruvato a acetato y de la degradación de aminoácidos a succinato o acetato. Ambas vías catalíticas producen ATP por fosforilación a nivel de sustrato.

Sin embargo, estas vías también producen grandes cantidades de NADH, el cual debe ser reoxidado por la NADH:fumarato reductasa o por la NADH:ubiquinona reductasa y la subsecuente actividad de la cadena respiratoria, la cual es esencial en este estadio del ciclo de vida (van Weelden et al. 2003; Coustou et al. 2003).

En humanos al igual que en tripanosomátidos, el genoma mitocondrial es pequeño y codifica solo 13 proteínas, así que las más de 1000 proteínas que constituyen la mitocondria son sintetizadas en los ribosomas citosólicos y son conducidas a la mitocondria posttraduccionalmente (Hoogenraad et al. 2002).

La información de localización mitocondrial es codificada en residuos hidrofóbicos y básicos presentes a menudo en el N-terminal en forma de una hélice anfipática básica referida como una presecuencia de 30-50 residuos de largo y que son proteolíticamente escindidas por peptidasas una vez que alcanzan su destino final dentro de la mitocondria.

En humanos todos los tRNA son codificados en la mitocondria mientras que en *Trypanosoma spp* son codificados en el núcleo y deben ser importados desde el citosol al igual que gran parte de la maquinaria de traducción. Del mismo modo, a diferencia del la mitocondria humana, los genes mitocondriales en tripanosomátidos requieren un procesamiento extensivo conocido como edición de RNA y la mayor parte de la maquinaria involucrada en este proceso es codificada en el núcleo.

En todos los sistemas *in vitro* el importe de proteínas y tRNA requiere ATP externo y probablemente interno así como también del gradiente electroquímico de protones generado por la cadena respiratoria.

El genoma mitocondrial de *T. brucei* codifica 13 proteínas de identidad conocida: el citocromo b del complejo bc1-(CYB), las subunidades I-III de la citocromo c oxidasa (COI-III), seis subunidades de la dinucleótido adenina nicotinamida reducida NADH deshidrogenasa (ND1,4,7-9), una proteína ribosomal, la subunidad 6 del complejo F1Fo-ATPasa (A6) así como 2 RNA ribosomales, además de 5 marcos abiertos de lectura que codifican proteínas de identidad desconocida, pero que se presume que son componentes de la NADH dehidrogenasa (figura E.I.5.). Homólogos de plantas de estas proteínas han demostrado requerir procesamiento post-traducciona a diferentes niveles, desde la sola escisión del grupo formilo, hasta un procesamiento extensivo que incluye la deformilación y la escisión de aminoácidos del extremo N-terminal (Giglione and Meinnel 2001).

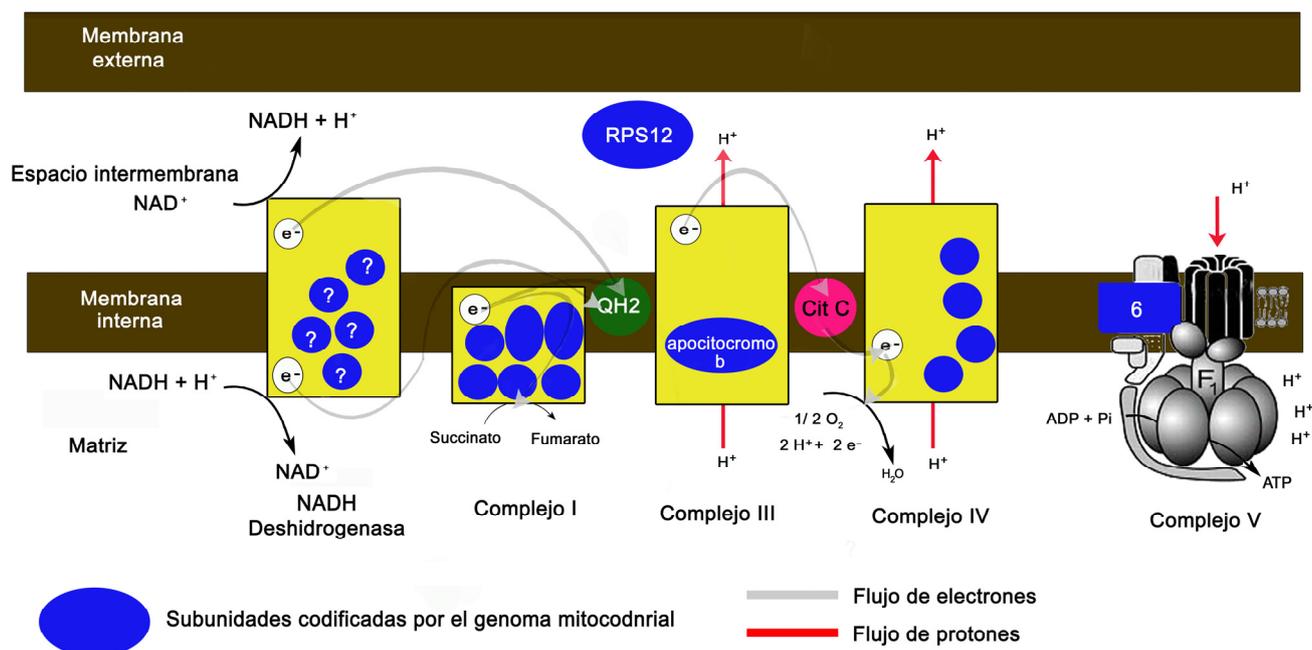


Figura E.I.5. Representación esquemática del número y ubicación de las subunidades y componentes de la cadena respiratoria codificadas por el DNA mitocondrial. El estado del sistema que se muestra en la figura es solo ilustrativo ya que estas condiciones cambian drásticamente en la forma sanguínea y están sujetos a variaciones que dependen del tipo de medio de cultivo y de la cepa en la forma procíclica de *Trypanosoma brucei*.

Todas las proteínas codificadas en el kinetoplasto deben ser sintetizadas con un grupo formilo en su primera metionina y por lo tanto son sustratos potenciales tanto de PDF-1 como de PDF-2 con lo cual requerirían la actividad deformilasa para su posterior maduración biológica.

Es de esperar por tanto que un bloqueo en la actividad de PDF debido al silenciamiento de su expresión, de lugar a un cese en el procesamiento de proteínas codificadas en el orgánulo involucradas en la cadena respiratoria y, por lo tanto, podría alterar el potencial electroquímico el cual es esencial para el importe de casi la totalidad de la maquinaria traduccional y metabólica, la cual a su vez está involucrada en el mantenimiento de la integridad funcional y estructural de la mitocondria. Con estas consideraciones en mente, en este trabajo se han estudiado las consecuencias que tendría la depleción de los niveles de PDF-1 y PDF-2 sobre la actividad de la cadena respiratoria de la forma procíclica de *T. brucei* mediante estudios con la sonda

mitotracker que depende de un potencial de membrana estable para asociarse a la mitocondria y emitir fluorescencia, cuya magnitud es proporcional al gradiente electroquímico generado por la mitocondria. La depleción de ambas PDFs produce una drástica alteración en el potencial de membrana mitocondrial siendo mas notable en el caso de PDF-1, lo que estaría indicando que tanto PDF-1 como PDF-2 tienen un papel en la funcionalidad de proteínas codificadas por el kinetoplasto que forman parte de la cadena respiratoria y que tienen un papel importante en el mantenimiento funcional de la mitocondria. Por otra parte conviene volver a resaltar que otra de las proteínas codificadas por el kinetoplasto es la subunidad 6 que forma parte del complejo de la ATP sintetasa. En la membrana mitocondrial interna el complejo F₁F_o-ATP sintetasa produce ATP empleando el gradiente electroquímico de protones ($\Delta\psi$) generado por la cadena respiratoria.

Históricamente se han reconocido dos partes distintivas de este complejo enzimático: 1) un componente soluble en agua conocido como F₁ compuesto por las subunidades α , β , γ , δ y ϵ y, 2) un componente F_o el cual está embebido en la membrana mitocondrial interna y conforma el centro o el núcleo del canal de protones y consiste en un anillo de subunidades c (10 en levaduras y una subunidad a Atp6) (Boyer 1997); (Stock et al. 1999; Bianchet et al. 1998; Abrahams et al. 1994) (figura E.I.6.). El movimiento de protones a través de este canal coincide con la rotación de la subunidad c del anillo, lo cual resulta en cambios conformacionales que favorecen la síntesis de ATP en F₁ (Rak et al. 2007). La síntesis de ATP sólo es posible cuando el F₁ está unido a F_o (Velours and Arselin 2000). La ausencia de subunidades e y/o g resulta en una fuerte alteración de la morfología de las crestas indicando que la ATP sintetasa controla de algún modo la biogénesis de la membrana mitocondrial interna (Paumard et al. 2002)

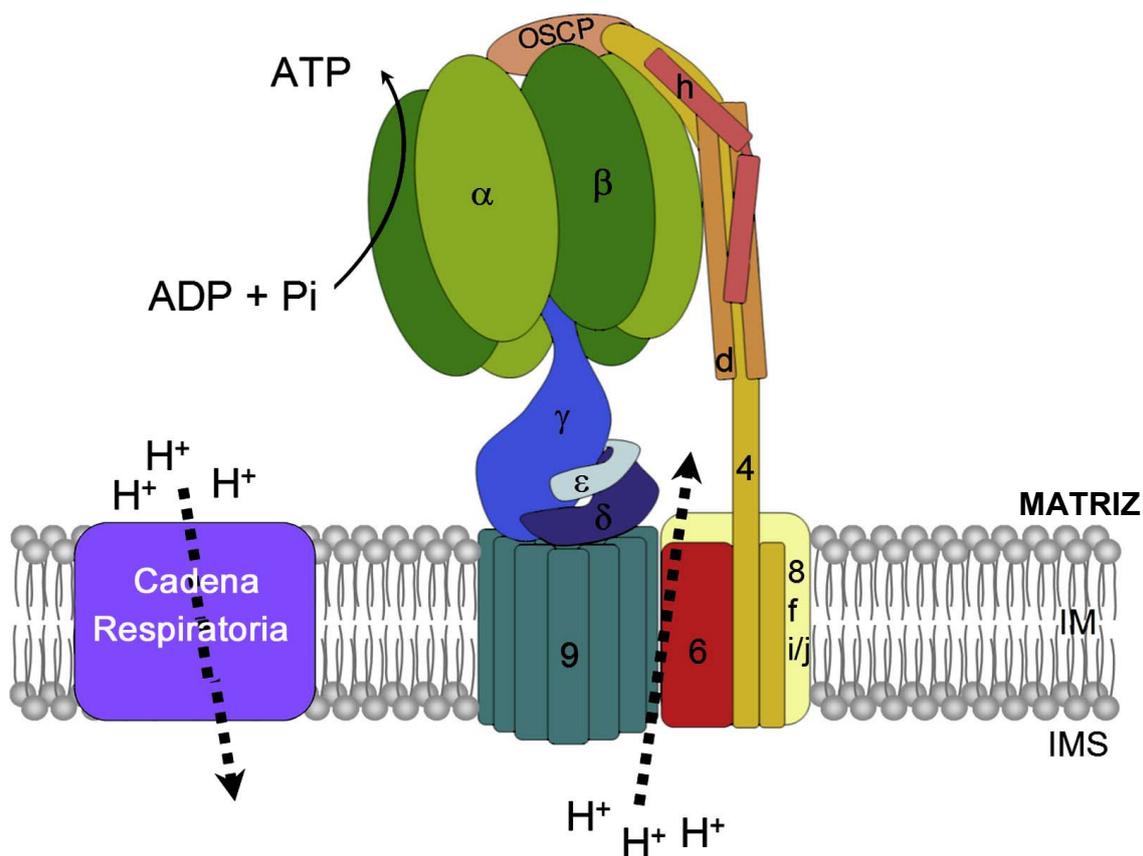


Figura E.I.6. Organización de las subunidades de la ATP sintetasa mitocondrial. El componente F1 está compuesto por las subunidades α , β y las tres subunidades centrales γ , δ y ϵ . El componente Fo contienen la subunidad 9, 6, 8, F e i/j. El tallo periférico está compuesto por las subunidades 4, d, h y OSCP. El rotor está formado por el tallo central y la subunidad 9 en forma de anillo.

El complejo FoF1-ATP sintetasa en *T. brucei* está compuesto de 22 proteínas 8 de las cuales están relacionadas con las subunidades α , β , γ , δ y ϵ del componente F1 y **b** y **c** de Fo junto con OSCP. Las otras 14 proteínas no tienen homólogos reconocibles en otros organismos y parecen ser específicas de *Trypanosoma spp* (Zikova et al. 2009).

Se ha sugerido que el complejo en *T. brucei* existe como un dímero y el ensamblaje del complejo podría ser esencial para la biogénesis de las crestas tal y como se ha demostrado para mitocondrias de mamífero y levadura (Arselin et al. 2004; Minauro-Sanmiguel et al. 2005). Estudios de RNAi de la subunidad α han demostrado que la FoF1-ATP sintetasa es esencial para la proliferación de la forma procíclica de *Trypanosoma brucei* y su depleción da lugar a una pérdida del complejo y liberación del subcomplejo F1 demostrando que estas subunidades son esenciales para la integridad del complejo (Hashimi et al.).

Hay que tener en cuenta que en células donde se han deplecionado los niveles de PDF-1 y PDF-2 podrían producirse alteraciones en la actividad del complejo F1-Fo ATPasa. Esta situación podría dar lugar a una hipersensibilidad a inhibidores de la ATP sintetasa mitocondrial como la oligomicina, la cual reconoce específicamente la porción Fo de este complejo con la consecuente inhibición de la síntesis de ATP y alteración en la expresión de algunas de las subunidades.

Los resultados obtenidos en este estudio indican que la línea donde se ha inducido el silenciamiento de PDF-1 presenta hipersensibilidad a oligomicina en relación a la línea celular control, mientras que la línea celular donde se ha silenciado la expresión de PDF-2 presenta una sensibilidad similar a la línea sin inducir. Este resultado sugiere que posiblemente PDF-1 pero no PDF-2 participe en el procesamiento post-traducciona l a través de la defosforilación de la subunidad 6 del complejo de la ATP sintetasa. Otros estudios que apoyan esta observación han sido realizados recientemente por Bouzaidi-Tiali y colaboradores donde se determinó la síntesis de ATP tanto a través de la vía de la fosforilación a nivel de sustrato como a través de la fosforilación oxidativa, en líneas celulares de la forma procíclica de *T. brucei* donde también se ha silenciado la expresión de PDF-1 y PDF-2. Estos autores demostraron que la síntesis de ATP a nivel de sustrato no estaba afectada en ninguna de las dos líneas celulares, lo cual concuerda con estudios recientes donde se sugiere que la succinato deshidrogenasa y la glicerol 3-fosfato deshidrogenada no funcionan como sitios de entrada para electrones en la cadena respiratoria de la forma procíclica durante condiciones de cultivo estándar (van Weelden et al. 2005; Coustou et al. 2005). Por el contrario, el silenciamiento de la PDF-1 dió lugar a un bloqueo en la síntesis de ATP mediada por fosforilación oxidativa, mientras que la depleción de PDF-2 no tiene efecto sobre este proceso (Bouzaidi-Tiali et al. 2007).

En definitiva, estas observaciones llevan a plantear que la generación de un potencial de membrana mitocondrial además de ser esencial para el importe de iones y metabolitos a la mitocondria es fundamental para la síntesis de ATP en esta forma del ciclo de vida de *T. brucei*.

Mientras que en algunos trabajos el requerimiento de un complejo F1Fo-ATP sintetasa funcional en la forma procíclica ha sido debatido, ya que la importancia de la generación de ATP por fosforilación oxidativa en esta fase del ciclo de vida sigue siendo motivo de contradicciones y controversia, (Bochud-Allemann and Schneider 2002; Coustou et al. 2003) estudios recientes parecen indicar que las discrepancias en

estas observaciones se deben a las distintas cepas utilizadas en los diversos estudios (Zikova et al. 2009). Así la cepa EATRO1125 de la forma procíclica de *T. brucei* parece ser 1000 veces menos sensible a oligomicina en presencia de glucosa que en su ausencia (Lamour et al. 2005). Además el silenciamiento de la subunidad β de la FoF1-ATP sintetasa conduce a muerte celular en medio sin glucosa pero no en medio rico en glucosa (Coustou et al. 2008).

En contraste la cepa 29-13 de la forma procíclica donde se ha silenciado cualquiera de las tres subunidades no es capaz de proliferar en medio rico en glucosa y la presencia de glucosa en el medio no tiene efecto en la sensibilidad a oligomicina (Zikova et al. 2009).

Probablemente algunas cepas han perdido una parte de la flexibilidad metabólica característica de la forma procíclica de *T. brucei*, lo que explica los resultados contradictorios. En definitiva, los estudios recientes de Zikova y colaboradores parecen ratificar la importancia de la síntesis de ATP en esta forma del ciclo de vida de *T. brucei*, demostrando que la mitocondria aislada de células en las cuales se ha inducido la interferencia por RNAi de una de las subunidades de la ATP sintetasa, han perdido la capacidad de producir ATP vía fosforilación oxidativa lo que sugiere que el fenotipo severo de proliferación observado es causado por la inhibición de la fosforilación oxidativa y la consecuente pérdida de ATP (Zikova et al. 2009).

E.VI. Efectos de la interferencia genética de PDF-1 y PDF-2 sobre la morfología mitocondrial y el metabolismo lipídico en la forma procíclica de *Trypanosoma brucei*

Uno de los efectos inmediatos del silenciamiento de la expresión de PDFs en la forma procíclica de *T. brucei* ha sido la perturbación en el potencial de membrana mitocondrial. Estudios de microscopía electrónica han mostrado que este fenómeno está acompañado de drásticas alteraciones de la morfología mitocondrial, caracterizadas por una pérdida de la apariencia electrondensa característica de la mitocondria de células control, así como la aparición de invaginaciones de la membrana interna y plegamientos hacia la matriz mitocondrial, en algunos casos formando estructuras típicas de eventos de autofagia.

El potencial de membrana mitocondrial mantenido por la cadena respiratoria, cumple un papel fundamental en el metabolismo de *T. brucei*, generando un gradiente

electroquímico que conduce el importe de iones y metabolitos involucrados en las distintas rutas anabólicas y catabólicas que operan en la mitocondria y que son responsables de su integridad funcional y estructural. Estudios en levaduras demuestran que alteraciones en el ensamblaje del complejo de la ATP sintetasa están asociados a la pérdida de morfología mitocondrial. La ausencia de subunidades e y/o g dan lugar a una fuerte alteración de la morfología de las crestas indicando que la ATP sintetasa controla de algún modo la biogénesis de la membrana mitocondrial interna (Paumard et al. 2002).

La mitocondria en general cumple una serie de funciones críticas en el mantenimiento del suministro de energía celular, termorregulación y síntesis de moléculas esenciales tales como fosfolípidos, grupos hemo, apoptosis y regula múltiples vías de señalización. Alteraciones en la función mitocondrial son responsables de una amplia gama de enfermedades humanas adquiridas o heredadas. Estas condiciones se manifiestan por si mismo en patologías asociadas con tejidos estrictamente dependientes de una función mitocondrial apropiada.

En nuestro estudio, otra de las alteraciones observadas a nivel morfológico al inducir la interferencia de la expresión de PDF-1 y de PDF-2 fue la presencia de un elevado número de vesículas lipídicas. La naturaleza hidrofóbica de estas vesículas fue confirmada gracias a la tinción con rojo Nilo y sugiere la existencia de modificaciones significativas en la homeostasis lipídica. Diversos trabajos establecen una asociación entre el metabolismo lipídico y alteraciones de la morfología y función de la mitocondria. Así, estudios con inhibidores conocidos de la biosíntesis de esteroides (Lazardí et al. 1991; Lorente et al. 2004; Magaraci et al. 2003; Palmie-Peixoto et al. 2006; Rodrigues et al. 2002; Rodrigues et al. 2005; Cammerer et al. 2007; Fernandes Rodrigues et al. 2008; Vannier-Santos et al. 1995; Vivas et al. 1996) así como análisis de RNAi de enzimas involucradas en diferentes etapas de la ruta (Perez-Moreno et al. 2010), están asociados a una alteración de la estructura mitocondrial y acumulación de vesículas lipídicas de un modo similar a los efectos observados en este trabajo de tesis.

Las alteraciones observadas tras el tratamiento con inhibidores de la biosíntesis de esteroides parecen estar asociadas con cambios en el potencial de membrana, probablemente debido a cambios en la composición de la membrana, lo que da lugar a la incapacidad de la membrana mitocondrial interna de generar o sostener el gradiente electroquímico de protones conducido por la respiración. Es probable que la disfunción en la cadena respiratoria y/o una severa alteración de las propiedades físicas de la

membrana interna sea debido a una alteración en la composición lipídica. (Cammerer et al. 2007). Estudios bioquímicos demuestran que la membrana mitocondrial de tripanosomátidos contiene cantidades importantes de esteroides endógenos y exógenos (Rodrigues et al. 2001) así que alteraciones en el metabolismo lipídico pueden conducir a alteraciones en la estructura mitocondrial.

Así, la mitocondria contiene enzimas involucradas en las etapas tempranas de la biosíntesis de esteroides (Carrero-Lerida et al. 2009; Peña-Díaz et al. 2004) las cuales suministran sustratos esenciales como el mevalonato, el cual es transportado al citosol donde participa en la síntesis de isoprenoides y esteroides.

En definitiva, teniendo en cuenta estas observaciones, es posible que las alteraciones en la función y metabolismo mitocondrial observadas al depleccionar los niveles de PDF-1 y PDF-2 tengan una incidencia indirecta sobre rutas metabólicas mitocondriales que están involucradas en la homeostasis lipídica y en la integridad funcional y estructural de la mitocondria. Vesículas lipídicas semejantes a las observadas en este trabajo han sido caracterizadas en levaduras donde aparentemente cumplen papeles de almacenamiento de triacilglicérols y ésteres de colesterol (Wagner et al. 2009), los cuales son movilizados cuando se requieren intermediarios o sustratos para el metabolismo celular. La aparición de vesículas lipídicas podría ser un fenómeno asociado a la muerte celular derivado de la interferencia de la expresión de PDF-1 y de PDF-2 o un mecanismo de producción o acumulación de sustratos en condiciones de alteraciones en el metabolismo mitocondrial. En general el metabolismo de lípidos, especialmente la esfingomielina, los fosfoinosítidos y la fosfatidilcolina están asociados, bajo ciertas condiciones, a la producción de ceramida y diacilglicérol que actúan como segundos mensajeros regulando la velocidad de proliferación y la muerte celular (Kolesnick and Kronke 1998). Estudios recientes basados en análisis por espectroscopia de resonancia magnética nuclear (NMR) en células tumorales y en líneas celulares donde se ha inducido apoptosis, han demostrado la aparición de estructuras lipídicas que en base al tipo de señal que generan mediante este tipo de análisis se han denominado lípidos móviles y que contienen cantidades importantes de ácidos grasos, triacilglicérols, y esteroides esterificados, lo que ha sugerido que alteraciones en el metabolismo de lípidos neutros podrían estar asociadas a una fase bioquímicamente activa de muerte celular programada (Di Vito et al. 2001; Opstad et al. 2009). Estudios en la forma sanguínea de *T. brucei* con dihidroxiacetona (DHA), un azúcar de tres carbonos que es considerado como una fuente de energía para diferentes células desde

bacterias a mamíferos, induce profundas alteraciones a nivel del ciclo y parece inducir muerte celular. Sus efectos antiproliferativos estuvieron acompañados de alteraciones a nivel de la morfología mitocondrial, así como de la acumulación de cuerpos multivesiculares y vacuolas autofágicas en el citoplasma (Uzcategui et al. 2007).

La acumulación de vesículas lipídicas también podría tener su origen en ácidos grasos que no logran entrar a la mitocondria para su posterior oxidación con la consecuente acumulación citosólica. En muchos organismos la oxidación de ácidos grasos es una fuente importante de ATP. Sin embargo, parece que este no es el caso en *T. brucei* (Tielens 1994) a pesar de que homólogos de genes involucrados en enzimas de la β -oxidación del acil-CoA están presentes en su genoma (Berriman et al. 2005). En células animales la matriz mitocondrial es el sitio más importante para la β -oxidación de ácidos grasos, mientras que en células vegetales este proceso ocurre principalmente en los peroxisomas y glioxisomas. Los parásitos tripanosomátidos contienen glicosomas, unos orgánulos de origen peroxisomal que contiene las siete primeras enzimas de la glucólisis. Análisis genómicos plantean que la β -oxidación puede ocurrir tanto en la mitocondria como en los glicosomas (Berriman et al. 2005) aunque, sin embargo, estudios recientes concluyen que la participación de los glicosomas en este proceso es muy baja. Aunque existen pocos estudios sobre la β -oxidación de ácidos grasos en tripanosomátidos los resultados indican que este proceso es operativo pero a niveles mínimos (van Hellemond and Tielens 2006).

Sin embargo los estudios de contenido de ácidos grasos totales en las células donde se han deplecionado los niveles de PDF-1 y PDF-2 indican que el contenido total de ácidos grasos es menor en estas líneas celulares en relación a la cepa parental, siendo mas evidente en el caso de la depleción de PDF-1. Es probable que el daño mitocodnrial tenga repercusiones en el suministro de sustratos precursores para la biosíntesis de ácidos grasos. La mitocondria tiene un papel fundamental en la producción de acetato que es un precursor esencial para la biosíntesis de ácidos grasos en la forma procíclica de *T. brucei* (Riviere et al. 2009).

Parte de la maquinaria metabólica de síntesis de ácidos grasos también está presente en la mitocondria de tripanosomátidos (Lee et al. 2006). Estudios en levaduras demuestran que la síntesis de ácidos grasos mitocondrial es fundamental para el mantenimiento de una cadena respiratoria competente (Hiltunen et al. 2005).

Estudios de análisis de composición lipídica de parásitos donde se ha inducido la interferencia de la expresión de PDF-1 indican que la ruta de biosíntesis de ergosterol, el esteroles mayoritario en esta forma del ciclo de vida de *T. brucei* (Gros et al. 2006; Lepesheva et al. 2006), está bloqueada en algún punto de la ruta. Es bien conocido que bajo ciertas condiciones, los parásitos tripanosomátidos compensan la falta de esteroides endógenos incorporando colesterol exógeno presente en el medio de cultivo (Coppens and Courtoy 2000; Rodrigues et al. 2002; Urbina et al. 1995; Vivas et al. 1996).

Sin embargo, el colesterol, al igual que en levaduras, hongos y plantas no puede satisfacer totalmente los requerimientos fisiológicos en estos organismos (Bloch 1983; Urbina et al. 1995). El bloqueo de la ruta conduce a la depleción de esteroides endógenos esenciales para el metabolismo celular e inhibidores de la ruta tienen actividad antiproliferativa.

Para profundizar en las alteraciones del metabolismo de esteroides como consecuencia de alteraciones en el proceso de deformilación, en este trabajo se utilizó una sonda fluorescente específica para colesterol conocida como filipina que reconoce grupos funcionales presentes en las moléculas de esteroides y que puede ser visualizadas por microscopía de fluorescencia (Robinson and Karnovsky 1980).

La tinción con filipina mostró que las células donde se ha silenciado la expresión de PDF-1 y PDF-2 presentan un patrón de incorporación de la sonda muy distinto al observado en células control, donde la fluorescencia se distribuye de manera homogénea y continua a lo largo de la membrana plasmática, mientras que en las células inducidas se visualizan agrupaciones acumuladas e interespaciadas a nivel de todo el contorno celular y de la membrana flagelar.

Recientemente se ha demostrado que *T. brucei* contiene dominios ricos en esteroides y esfingolípidos en la membrana flagelar que corresponden a balsas lipídicas que podrían tener una importante función en la localización de proteínas flagelares (Tyler et al. 2009)

Estudios en levaduras han demostrado que el potencial de membrana mitocondrial regula la distribución de dominios de membranas. Levaduras mutantes en funciones mitocondriales asociadas a la generación del potencial transmembrana, además de exhibir un fenotipo de crecimiento afectado, presentan una segregación y distribución alterada de estos dominios (Grossmann et al. 2007).

En resumen el conjunto de resultados obtenidos sugiere que existe una relación directa entre el potencial de membrana mitocondrial y la regulación de la distribución de dominios lipídicos presentes en la membrana plasmática. La perturbación de la función mitocondrial en parásitos donde se ha silenciado la expresión de PDF-1 y PDF-2 genera defectos en el metabolismo de esteroides y la morfología mitocondrial la acumulación de vesículas lipídicas y alteraciones en la distribución de esteroides en la membrana plasmática

E.VII. Efecto de la depleción de PDF-1 y PDF-2 en la forma sanguínea de *Trypanosoma brucei*

En el caso de la forma sanguínea, que constituye la forma clínicamente relevante del parásito, la aparente disminución de los niveles de PDF-1 y PDF-2 por RNAi, no dió lugar a valores significativos de inhibición de la proliferación. Mientras que el RNAm de tanto la PDF-1 como la PDF-2 se detecta a niveles significativos y disminuye tras la inducción del RNAi es concebible que la reducción de los niveles no sean suficientes para causar un fenotipo observable sobre el crecimiento.

Con el fin de definir el papel de las PDFs en la forma sanguínea y el potencial terapéutico de inhibidores de estas enzimas en *T. brucei* hubo que recurrir a una estrategia alternativa que permitiese reducir de manera efectiva los niveles de PDF-1. Esta estrategia consistió en el reemplazo secuencial de los dos alelos correspondientes del gen *PDF-1* y la incorporación de una copia ectópica de PDF-1 inducible por doxiciclina, de manera que se pudiera obtener un “*knock-out*” condicional y estudiar de esta manera el papel de la PDF-1 en la proliferación y viabilidad celular en esta forma de vida.

Tras múltiples intentos, no fue posible obtener clones con el doble reemplazo alélico sin copia ectópica, lo cual pudiera ser indicativo del posible carácter esencial de PDF-1 en formas sanguíneas. Sí se pudo eliminar las dos copias y obtener el doble “*knock-out*” condicional en presencia de copia ectópica aunque todos los clones analizados presentaban un cierto nivel basal de expresión en ausencia de doxiciclina y alteraciones en el crecimiento. En cualquier caso la inhibición de la expresión de la copia ectópica de PDF-1 tras la eliminación de doxiciclina tampoco dió lugar a diferencias notables en la proliferación en relación a la línea sin inducir, ya que cabía

esperar que de ser esencial, la disminución de los niveles de PDF-1 daría lugar a deficiencias en el crecimiento.

Es posible que niveles mínimos de PDF sean suficientes para garantizar la supervivencia del parásito. De hecho como ya se ha mencionado la PDF-1 se expresa a niveles prácticamente indetectables por *Western blot*. Por otra parte es de destacar que en estudios de *Western blot* ha sido muy difícil detectar niveles significativos de PDF-1 y PDF-2 de forma reproducible.

Por otra parte, no se puede descartar que en *T. brucei* la sobreexpresión de ciertas proteínas de manera ectópica no sea totalmente efectiva, especialmente con proteínas mitocondriales que se caracterizan por su alta hidrofobicidad. Finalmente, es posible que a pesar de no poder obtener el doble reemplazamiento alélico en ausencia de copia ectópica, la deformilación de proteínas no es un proceso esencial en sanguíneos.

Es destacable, sin embargo, que la línea celular donde se han reemplazado de manera condicional ambos alelos de PDF-1 presenta una alteración significativa del potencial de membrana mitocondrial y exhibe hipersensibilidad a oligomicin, un inhibidor del complejo F1Fo-ATP sintetasa mitocondrial.

Este resultado sugiere que existen proteínas que requieren deformilación en formas sanguíneas. En este sentido la única subunidad codificada en el DNA mitocondrial es la ATP6 que forma parte del componente Fo del complejo ATP sintetasa y que parece ser esencial en este estadio del ciclo de vida de *T. brucei* (Schnauffer et al. 2005). Es concebible que defectos en su deformilación por parte de la PDF-1 alteraría el procesamiento de esta subunidad con la consecuente alteración en el ensamblaje del complejo final.

La forma sanguínea de *T. brucei* se caracteriza por presentar un metabolismo mitocondrial donde gran parte de las reacciones clásicas están ausentes. La mitocondria presenta una forma simple, sin crestas, ni complejos respiratorios y esto motivó a considerarlo por mucho tiempo como un organúlo remanente inactivo (Schnauffer et al. 2005).

Sin embargo, la demostración de que la replicación del DNA mitocondrial y la edición de RNA eran procesos esenciales en esta etapa del ciclo de vida de *T. brucei* cambió la percepción de una mitocondria vestigial y sugirió la operatividad de procesos sin identificar que eran importantes para la supervivencia celular (Schnauffer et al. 2005; Timms et al. 2002).

La mitocondria en este estadio del ciclo de vida contiene una ATPasa sensible a oligomicina (Williams and Frank 1990) aunque a un nivel de expresión mucho mas bajo que en la forma procíclica (Williams 1994). La función celular de la ATPasa sugiere que trabaja de forma reversa a la función clásica de este complejo en células eucariotas, generando una fuerza protón-motora a expensas del ATP producido en la glucólisis. Este papel es consistente con el hallazgo de que la inhibición por oligomicina elimina el potencial de membrana e inhibe el consumo de oxígeno y producción de piruvato (Nolan and Voorheis 1992; Nolan and Voorheis 2000). La capacidad de hidrólisis de ATP a expensas de la energía de un gradiente electroquímico por parte de este complejo ha sido bien documentada en procariontes (Futai and Kanazawa 1983) pero solo ha sido demostrado para eucariotas en casos muy particulares asociado a condiciones de hipoxia o anoxia (St-Pierre et al. 2000).

Para ciertas levaduras creciendo en condiciones aeróbicas, hay evidencia de que el complejo funciona como una bomba de protones para mantener un potencial de membrana mitocondrial (Clark-Walker 2003; Chen and Clark-Walker 1999). El requerimiento del mantenimiento de un potencial de membrana mitocondrial refleja la necesidad de importar numerosas proteínas mitocondriales esenciales para el orgánulo (Neupert 1997).

El complejo de la ATPasa mitocondrial en la forma sanguínea ha demostrado ser esencial, cumpliendo un papel reverso al descrito en la forma procíclica principalmente generando un gradiente electroquímico el cual se requiere de forma absoluta para el importe de proteínas codificadas en el núcleo así como también para otros procesos de transporte.

Además la mitocondria de la forma sanguínea esta asociada a una función en la respiración mediada por una oxidasa alternativa y esta enzima también ha demostrado ser esencial en esta etapa del ciclo de vida (Helfert et al. 2001).

Finalmente el colapso del potencial de membrana mitocondrial es un evento clave en la apoptosis y aunque *T. brucei* carece de los componentes clásicos de la vía apoptótica (Esseiva et al. 2004) parece tener un tipo de muerte celular programada que puede estar activado tras la inactivación del complejo de la ATP sintetasa (Welburn et al. 1997).

E.VII.1. Papel hipotético adicional de las PDFs de tripanosomátidos y de eucariotas en general

Un papel adicional que las PDFs cumplen en el metabolismo celular, es la participación en el recambio del grupo formilo. El grupo formilo de la metionina de proteínas nacientes debe ser liberado para permitir el posterior reconocimiento por parte de MAPs involucradas en el procesamiento final de la proteína. Por consiguiente la actividad concertada de ambas enzimas genera dos productos: el formiato y la metionina. En cloroplastos la disponibilidad de estos dos metabolitos es esencial, ya que contribuyen al recambio de formiato y metionina necesarios para la síntesis continuada de proteínas y que estos orgánulos carecen de la ruta de biosíntesis de este aminoácido (Giglione and Meinnel 2001). De forma similar, el recambio de formiato en la mitocondria requiere la actividad PDF. Se ha demostrado que en cloroplastos la detoxificación de formiato es importante ya que su acumulación conduce a la inhibición de la actividad de uno de los fotosistemas *in vitro* (Giglione and Meinnel 2001) y que existe una formiato deshidrogenasa que está involucrada en la oxidación de formiato en la mitocondria generando CO₂ y NADH, por lo que el formiato puede ser reciclado para su participación en otros procesos metabólicos como producción de 10-formil-tetrahidrofolato que constituye una de las forma interconvertibles del tetrahidrofolato (THF).

El THF y sus derivados participan en la interconversión, transporte y suministro de grupos monocarbonados (C1) en diferentes estados de oxidación que van desde el grupo metilo al formilo. Estos grupos son utilizados en diversos procesos biosintéticos esenciales, como la biosíntesis de purinas y timidilato y para la regeneración de metionina a partir de homocisteína en células humanas (Maden 2000).

Los parásitos protozoarios en general y los tripanosomátidos son incapaces de sintetizar purinas *de novo*, sin embargo, las enzimas involucradas en la síntesis de 10-formil tetrahidrofolato son esenciales para la viabilidad celular en *Leishmania spp* y el único papel conocido de este metabolito es la de suministrar grupos formilo para la formilación mitocondrial de metionina (Murta et al. 2009). Es posible que la regeneración organelar de tetrahidrofolato y homocisteína, a partir de metionina y formiato puedan ser procesos importantes para regular el estado redox del orgánulo. Adicionalmente es posible que el 10-formil tetrahidrofolato esté involucrado en vías metabólicas que aún están por identificar (Murta et al. 2009).

Existen algunos estudios que sugieren que la formilación por parte de la enzima tRNA^{fMet} formil metionina transferasa (MTF) no es necesaria para la viabilidad en bacterias y mitocondria de levaduras (Blanquet et al. 2000) lo que indica que podría ser también un proceso opcional en organúlos de plantas y animales. En *T. brucei*, estudios de Tan et al. han demostrado que la enzima MTF está presente en la mitocondria y es funcional en la formilación del tRNA^{Met-e} elongador importado desde el citoplasma y que se emplea para la iniciación de la síntesis de proteínas organelares (Tan et al. 2000).

Estudios realizados en esta tesis demuestran que la inhibición de la expresión de la MTF en *Trypanosoma brucei* no produce efectos observables a nivel de proliferación celular. Estos resultados coinciden con los obtenidos por Charriere et al. quienes obtuvieron el mismo resultado y plantean que la ausencia de efectos pueda ser debido a que niveles residuales de la enzima permitan una actividad formilasa basal que sea suficiente como para satisfacer necesidades metabólicas. Al combinar la interferencia de MTF con la del factor IF2, el cual por si sólo genera efectos antiproliferativos moderados, se produce una significativa inhibición de la proliferación, evidenciando la importancia de la MTF para la síntesis organelar de proteínas (Charriere et al. 2005).

Se ha demostrado en *S. cerevisiae* que la sobreexpresión de la MTF puede ser nociva para el crecimiento a menos de que se complemente con la actividad deformilasa, postulando que uno de los efectos de la depleción de PDF es la acumulación de proteínas formiladas que pueden resultar tóxicas para el organismo. Teniendo en cuenta este conjunto de observaciones, se planteó que quizás la formilación es un proceso prescindible mientras que la acumulación de proteínas formiladas es citotóxico. Si esta hipótesis es cierta, la depleción de la *TbMTF* podría aliviar el fenotipo de inhibición del crecimiento que genera la interferencia de PDF-1.

El análisis de la doble interferencia muestra una pequeña pero consistente recuperación de la línea donde se ha inducido el doble RNAi MTF/PDF-1 en comparación con la línea defectiva únicamente en la expresión de PDF-1. Estos resultados sugieren que la acumulación de proteínas formiladas puede resultar tóxica *per se*, y que una disminución de los niveles de formilación reduce el nivel de proteínas con la metionina formilada, haciendo menos deletéreo una depleción de PDF-1. Adicionalmente no hay que olvidar que existe una serie de proteínas codificadas en el kinetoplasto de naturaleza desconocida que podrían tener un papel fundamental en el

metabolismo mitocondrial. En relación con la traducción mitocondrial de proteínas hay que recordar que *Trypanosoma spp* emplea el fenómeno de edición de RNA para producir RNAs funcionales codificados en el kinetoplasto. Este proceso involucra la inserción y delección precisa de uridinas que son conducidas por DNA moldes conocidos como RNA guías (RNAg) también codificados en los minicírculos del kinetoplasto (Stuart et al. 2005). Estudios recientes han demostrado que puede tener lugar la utilización de RNAs guías diferentes lo cual puede generar un fenómeno novedoso conocido como “edición de RNA alternativo” (Ochsenreiter and Hajduk 2006) que estaría generando una gama aún más diversa de proteínas con actividades desconocidas que podrían desempeñar un papel esencial en el metabolismo mitocondrial. Estas proteínas deben ser sintetizadas con un grupo formilo en su primera metionina y por lo tanto requerirían de la actividad deformilasa para su posterior madurez biológica.

Finalmente, existe un mecanismo por el que las PDFs eucariotas en general podrían estar procesando proteínas codificadas en el núcleo. Así, se ha demostrado que la traducción citosólica de proteínas mitocondriales codificadas en el núcleo y su posterior importe a la mitocondria son mecanismos estrechamente acoplados en un proceso conocido como importe co-traduccional (Ahmed and Fisher 2009; Lithgow 2000). Además de la visión post-traduccional del importe mitocondrial, los primeros estudios en este campo aportaron indicios de la existencia de un mecanismo de importe de proteínas co-traduccional en la mitocondria. Trabajos más recientes han comenzado a postular que el mecanismo de importe co-traduccional es iniciado por el transporte del complejo de traducción o de un RNAm cotraduccionalmente competente a la superficie de la mitocondria. La localización intracelular del RNAm en la superficie mitocondrial ha surgido como la aportación más reciente al entendimiento de la biogénesis mitocondrial y está mediado por elementos señalizadores dentro de la molécula en asociación con proteínas de unión a RNAm (Ahmed and Fisher 2009; Lithgow 2000)(figura E.I.7.).

Aunque se desconoce si el importe co-traduccional es operativo en tripanosomátidos, más del 95% del proteoma mitocondrial en todos los eucariotas es codificado en el núcleo, así que esta posibilidad ampliaría enormemente el espectro posible de sustratos de la PDF de los teóricamente impuestos por aquellos sustratos codificados en el genoma organelar y daría una importancia fundamental a las PDFs en el procesamiento y maduración de proteínas importantes para diversas funciones mitocondriales.

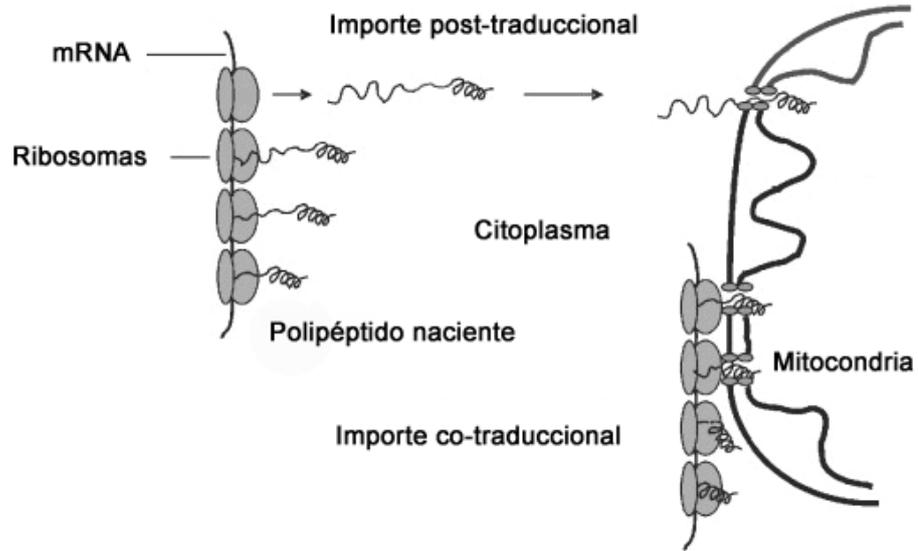


Figura E.I.7. Representación esquemática del modelo postulado para el importe co- y post-traducciona de proteínas mitocondriales codificadas en el núcleo.

CONCLUSIONES

F. CONCLUSIONES

1. Tanto PDF-1 como PDF-2 son esenciales para la supervivencia celular de la forma procíclica de *Trypanosoma brucei*.
2. La proteína recombinante PDF-1 de *Trypanosoma cruzi* a la cual se le ha eliminado 37 aminoácidos de su extremo amino terminal y ha sido purificada a homogeneidad mediante cromatografía de afinidad a níquel, es activa y demuestra actividad deformilasa frente al péptido formilado f-MAS.
3. Los parámetros cinéticos obtenidos frente a f-MAS como sustrato son del mismo orden que para otras PDF eucariotas aunque difieren significativamente de la PDF bacteriana. Esta observación junto con el hecho de la actinonina, un inhibidor clásico de las PDFs bacterianas y eucariotas, no inhibe la actividad deformilasa de la PDF-1 recombinante de *T. cruzi*, sugiere diferencias importantes entre las PDF humanas, bacterianas y de tripanosomátidos que pueden ser explotadas desde un punto de vista quimioterapéutico.
4. Aunque los tres motivos característicos de los péptidos deformilasas de tripanosomátidos están presentes tanto en las PDF-1 y como en la PDF-2, existen diferencias significativas entre ambas proteínas a nivel de secuencia lo que puede indicar que están asociadas al procesamiento de sustratos diferentes.
5. En *Trypanosoma brucei*, al igual que en otros organismos eucariotas como plantas y humanos, tanto la PDF-1 como la PDF-2 se encuentran asociadas a la mitocondria. La localización mitocondrial de las PDFs sugiere que estas enzimas están asociadas a la modificación post-traducciona de proteínas codificadas por el genoma organelar o sintetizadas en este orgánulo.
6. La función mitocondrial en *Trypanosoma brucei* regula procesos bioquímicos esenciales para la supervivencia celular tales como el metabolismo de lípidos. La alteración observada en este proceso puede contribuir a los efectos antiproliferativos de la depleción en los niveles de PDF-1 y PDF-2 en *T. brucei*.
7. La hipersensibilidad a oligomicina en células donde se han deplecionado los niveles de PDF-1 indica que la proteína ATP6, que es la única proteína conocida codificada en el kinetoplasto que se expresa en la forma sanguínea, puede requerir

deformilación y al bloquear este proceso, la síntesis de ATP puede verse afectada con la consecuente reducción en la proliferación celular.

8. Los estudios de RNAi de PDF-1 y PDF-2 en la forma sanguínea de *Trypanosoma brucei* indican que niveles bajos de PDF-1 y PDF-2 son suficientes para garantizar la supervivencia celular. Por otra parte, los estudios de reemplazamiento alélico sugieren una disminución significativa de PDF-1 compromete la supervivencia celular.
9. Los estudios de reemplazamiento alélico de PDF-1 en formas sanguíneas donde no se puede obtener un doble reemplazamiento en ausencia de la copia ectópica sugieren que esta enzima tiene un papel importante en el procesamiento de proteínas mitocondriales en esta forma de vida del parásito.
10. Los resultados de los experimentos de doble interferencia de la PDF-1 y MTF indican que una parte de los efectos antiproliferativos de la reducción de los niveles de PDF-1 se deben a la acumulación de péptidos formulados que pueden resultar tóxicos para estos organismos.

G. BIBLIOGRAFÍA

- Abrahams, J. P., Leslie, A. G., Lutter, R., and Walker, J. E. (1994). "Structure at 2.8 Å resolution of F1-ATPase from bovine heart mitochondria." *Nature*, 370(6491), 621-8.
- Adams, J.M. (1968) "On the release of the formyl group from nascent protein." *J Mol Biol*, 33(3), 571-89.
- Adams, J. M., and Capecchi, M. R. (1966). "N-formylmethionyl-sRNA as the initiator of protein synthesis." *Proc Natl Acad Sci U S A*, 55(1), 147-55.
- Ahmed, A. U., and Fisher, P. R. (2009). "Import of nuclear-encoded mitochondrial proteins: a cotranslational perspective." *Int Rev Cell Mol Biol*, 273, 49-68.
- Aman, R. A., Kenyon, G. L., and Wang, C. C. (1985). "Cross-linking of the enzymes in the glycosome of *Trypanosoma brucei*." *J Biol Chem*, 260(11), 6966-73.
- Arfin, S. M., and Bradshaw, R. A. (1988). "Cotranslational processing and protein turnover in eukaryotic cells." *Biochemistry*, 27(21), 7979-84.
- Arfin, S. M., Kendall, R. L., Hall, L., Weaver, L. H., Stewart, A. E., Matthews, B. W., and Bradshaw, R. A. (1995). "Eukaryotic methionyl aminopeptidases: two classes of cobalt-dependent enzymes." *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92(17), 7714-8.
- Arselin, G., Vaillier, J., Salin, B., Schaeffer, J., Giraud, M. F., Dautant, A., Brethes, D., and Velours, J. (2004). "The modulation in subunits e and g amounts of yeast ATP synthase modifies mitochondrial cristae morphology." *J Biol Chem*, 279(39), 40392-9.
- Aubart, K., and Zalacain, M. (2006). "Peptide deformylase inhibitors." *Prog Med Chem*, 44, 109-43.
- Ball, L. A., and Kaesberg, P. (1973). "Cleavage of the N-terminal formylmethionine residue from a bacteriophage coat protein in vitro." *J Mol Biol*, 79(3), 531-7.
- Banda, A., Villegas, P., El-Attrache, J., and Estevez, C. (2001). "Molecular characterization of seven field isolates of infectious bursal disease virus obtained from commercial broiler chickens." *Avian Dis*, 45(3), 620-30.
- Bangs, J. D., Brouch, E. M., Ransom, D. M., and Roggy, J. L. (1996). "A soluble secretory reporter system in *Trypanosoma brucei*. Studies on endoplasmic reticulum targeting." *J Biol Chem*, 271(31), 18387-93.
- Becker, A., Schlichting, I., Kabsch, W., Schultz, S., and Wagner, A. F. (1998b). "Structure of peptide deformylase and identification of the substrate binding site." *J Biol Chem*, 273(19), 11413-6.
- Bellofatto, V., and Cross, G. A. (1989). "Expression of a bacterial gene in a trypanosomatid protozoan." *Science*, 244(4909), 1167-9
- Berriman, M., Ghedin, E., Hertz-Fowler, C., Blandin, G., Renauld, H., Bartholomeu, D. C., Lennard, N. J., Caler, E., Hamlin, N. E., Haas, B., Bohme, U., Hannick, L., Aslett, M. A., Shallom, J., Marcello, L., Hou, L., Wickstead, B., Alsmark, U. C., Arrowsmith, C., Atkin, R. J., Barron, A. J., Bringaud, F., Brooks, K., Carrington, M., Cherevach, I., Chillingworth, T. J., Churcher, C., Clark, L. N., Corton, C. H., Cronin, A., Davies, R. M., Doggett, J., Djikeng, A., Feldblyum,

- T., Field, M. C., Fraser, A., Goodhead, I., Hance, Z., Harper, D., Harris, B. R., Hauser, H., Hostetler, J., Ivens, A., Jagels, K., Johnson, D., Johnson, J., Jones, K., Kerhornou, A. X., Koo, H., Larke, N., Landfear, S., Larkin, C., Leech, V., Line, A., Lord, A., Macleod, A., Mooney, P. J., Moule, S., Martin, D. M., Morgan, G. W., Mungall, K., Norbertczak, H., Ormond, D., Pai, G., Peacock, C. S., Peterson, J., Quail, M. A., Rabbinowitsch, E., Rajandream, M. A., Reitter, C., Salzberg, S. L., Sanders, M., Schobel, S., Sharp, S., Simmonds, M., Simpson, A. J., Tallon, L., Turner, C. M., Tait, A., Tivey, A. R., Van Aken, S., Walker, D., Wanless, D., Wang, S., White, B., White, O., Whitehead, S., Woodward, J., Wortman, J., Adams, M. D., Embley, T. M., Gull, K., Ullu, E., Barry, J. D., Fairlamb, A. H., Opperdoes, F., Barrell, B. G., Donelson, J. E., Hall, N., Fraser, C. M., et al. (2005). "The genome of the African trypanosome *Trypanosoma brucei*." *Science*, 309(5733), 416-22.
- Besteiro, S., Biran, M., Biteau, N., Coustou, V., Baltz, T., Canioni, P., and Bringaud, F. (2002). "Succinate secreted by *Trypanosoma brucei* is produced by a novel and unique glycosomal enzyme, NADH-dependent fumarate reductase." *J Biol Chem*, 277(41), 38001-12.
- Besteiro, S., Barrett, M. P., Riviere, L., and Bringaud, F. (2005). "Energy generation in insect stages of *Trypanosoma brucei*: metabolism in flux." *Trends Parasitol*, 21(4), 185-91.
- Bianchet, M. A., Hullihen, J., Pedersen, P. L., and Amzel, L. M. (1998). "The 2.8-Å structure of rat liver F1-ATPase: configuration of a critical intermediate in ATP synthesis/hydrolysis." *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95(19), 11065-70.
- 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(1), 99-112.
- Bienen, E. J., Saric, M., Pollakis, G., Grady, R. W., and Clarkson, A. B., Jr. (1991). "Mitochondrial development in *Trypanosoma brucei brucei* transitional bloodstream forms." *Mol Biochem Parasitol*, 45(2), 185-92.
- Blanquet, S., Mechulam, Y., and Schmitt, E. (2000). "The many routes of bacterial transfer RNAs after aminoacylation." *Curr Opin Struct Biol*, 10(1), 95-101.
- Bloch, K. E. (1983). "Sterol structure and membrane function." *CRC Crit Rev Biochem*, 14(1), 47-92.
- Boelens, R., and Gualerzi, C. O. (2002). "Structure and function of bacterial initiation factors." *Curr Protein Pept Sci*, 3(1), 107-19.
- Bochud-Allemand, N., and Schneider, A. (2002). "Mitochondrial substrate level phosphorylation is essential for growth of procyclic *Trypanosoma brucei*." *J Biol Chem*, 277(36), 32849-54.
- Boularot, A., Giglione, C., Artaud, I., and Meinnel, T. (2004). "Structure-activity relationship analysis and therapeutic potential of peptide deformylase inhibitors." *Curr Opin Investig Drugs*, 5(8), 809-22.
- Bouzaidi-Tiali, N., Giglione, C., Bulliard, Y., Pusnik, M., Meinnel, T., and Schneider, A. (2007). "Type 3 peptide deformylases are required for oxidative phosphorylation in *Trypanosoma brucei*." *Mol Microbiol*, 65(5), 1218-28.
- Boyer, P. D. (1997). "The ATP synthase--a splendid molecular machine." *Annu Rev Biochem*, 66, 717-49.
- Bracchi-Ricard, V., Nguyen, K. T., Zhou, Y., Rajagopalan, P. T., Chakrabarti, D., and Pei, D. (2001). "Characterization of an eukaryotic peptide deformylase from *Plasmodium falciparum*." *Arch Biochem Biophys*, 396(2), 162-70.

- Bradshaw, R. A., Brickey, W. W., and Walker, K. W. (1998). "N-terminal processing: the methionine aminopeptidase and N alpha-acetyl transferase families." *Trends Biochem Sci*, 23(7), 263-7.
- Bradshaw, R. A., and Yi, E. (2002). "Methionine aminopeptidases and angiogenesis." *Essays Biochem*, 38, 65-78.
- Braga, M. V., Urbina, J. A., and de Souza, W. (2004). "Effects of squalene synthase inhibitors on the growth and ultrastructure of *Trypanosoma cruzi*." *Int J Antimicrob Agents*, 24(1), 72-8.
- Breitschopf, K., Bengal, E., Ziv, T., Admon, A., and Ciechanover, A. (1998). "A novel site for ubiquitination: the N-terminal residue, and not internal lysines of MyoD, is essential for conjugation and degradation of the protein." *Embo J*, 17(20), 5964-73.
- Broughton, B. J., Chaplen, P., Freeman, W. A., Warren, P. J., Wooldridge, K. R., and Wright, D. E. (1975). "Studies concerning the antibiotic actinonin. Part VIII. Structure-activity relationships in the actinonin series." *J Chem Soc Perkin 1*(9), 857-60.
- Brown, B. S., Chi, T. B., and Williams, N. (2001). "The *Trypanosoma brucei* mitochondrial ATP synthase is developmentally regulated at the level of transcript stability." *Mol Biochem Parasitol*, 115(2), 177-87.
- Brown, S. V., Hosking, P., Li, J., and Williams, N. (2006). "ATP synthase is responsible for maintaining mitochondrial membrane potential in bloodstream form *Trypanosoma brucei*." *Eukaryot Cell*, 5(1), 45-53.
- Bullerwell, C. E., and Gray, M. W. (2004). "Evolution of the mitochondrial genome: protist connections to animals, fungi and plants." *Curr Opin Microbiol*, 7(5), 528-34.
- 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
- Cammerer, S. B., Jimenez, C., Jones, S., Gros, L., Lorente, S. O., Rodrigues, C., Rodrigues, J. C., Caldera, A., Ruiz Perez, L. M., da Souza, W., Kaiser, M., Brun, R., Urbina, J. A., Gonzalez Pacanowska, D., and Gilbert, I. H. (2007). "Quinuclidine derivatives as potential antiparasitics." *Antimicrob Agents Chemother*, 51(11), 4049-61.
- Carrero-Lerida, J., Perez-Moreno, G., Castillo-Acosta, V. M., Ruiz-Perez, L. M., and Gonzalez-Pacanowska, D. (2009). "Intracellular location of the early steps of the isoprenoid biosynthetic pathway in the trypanosomatids *Leishmania major* and *Trypanosoma brucei*." *Int J Parasitol*, 39(3), 307-14.
- Cazzulo, J. J. (1992). "Aerobic fermentation of glucose by trypanosomatids." *Faseb J*, 6(13), 3153-61.
- Chan, M. K., Gong, W., Rajagopalan, P. T., Hao, B., Tsai, C. M., and Pei, D. (1997). "Crystal structure of the *Escherichia coli* peptide deformylase." *Biochemistry*, 36(45), 13904-9.
- Chan, M. K., Gong, W., Rajagopalan, P. T., Hao, B., Tsai, C. M., and Pei, D. (1997). "Crystal structure of the *Escherichia coli* peptide deformylase." *Biochemistry*, 36(45), 13904-9.
- Chang, S. Y., McGary, E. C., and Chang, S. (1989). "Methionine aminopeptidase gene of *Escherichia coli* is essential for cell growth." *J Bacteriol*, 171(7), 4071-2.
- Charriere, F., Tan, T. H., and Schneider, A. (2005). "Mitochondrial initiation factor 2 of *Trypanosoma brucei* binds imported formylated elongator-type tRNA(Met)." *J Biol Chem*, 280(16), 15659-65.

- Chaudhuri, M., Ajayi, W., and Hill, G. C. (1998). "Biochemical and molecular properties of the *Trypanosoma brucei* alternative oxidase." *Mol Biochem Parasitol*, 95(1), 53-68.
- Chen, X. J., and Clark-Walker, G. D. (1999). "Alpha and beta subunits of F1-ATPase are required for survival of petite mutants in *Saccharomyces cerevisiae*." *Mol Gen Genet*, 262(4-5), 898-908.
- Chen, D. Z., Patel, D. V., Hackbarth, C. J., Wang, W., Dreyer, G., Young, D. C., Margolis, P. S., Wu, C., Ni, Z. J., Trias, J., White, R. J., and Yuan, Z. (2000). "Actinonin, a naturally occurring antibacterial agent, is a potent deformylase inhibitor." *Biochemistry*, 39(6), 1256-62.
- Clarkson, A. B., Jr., Bienen, E. J., Pollakis, G., and Grady, R. W. (1989). "Respiration of bloodstream forms of the parasite *Trypanosoma brucei brucei* is dependent on a plant-like alternative oxidase." *J Biol Chem*, 264(30), 17770-6.
- Clark-Walker, G. D. (2003). "Kinetic properties of F1-ATPase influence the ability of yeasts to grow in anoxia or absence of mtDNA." *Mitochondrion*, 2(4), 257-65.
- 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.
- Coppens, I., and Courtoy, P. J. (2000). "The adaptative mechanisms of *Trypanosoma brucei* for sterol homeostasis in its different life-cycle environments." *Annu Rev Microbiol*, 54, 129-56.
- Coustou, V., Besteiro, S., Biran, M., Diolez, P., Bouchaud, V., Voisin, P., Michels, P. A., Canioni, P., Baltz, T., and Bringaud, F. (2003). "ATP generation in the *Trypanosoma brucei* procyclic form: cytosolic substrate level is essential, but not oxidative phosphorylation." *J Biol Chem*, 278(49), 49625-35.
- Coustou, V., Besteiro, S., Riviere, L., Biran, M., Biteau, N., Franconi, J. M., Boshart, M., Baltz, T., and Bringaud, F. (2005). "A mitochondrial NADH-dependent fumarate reductase involved in the production of succinate excreted by procyclic *Trypanosoma brucei*." *J Biol Chem*, 280(17), 16559-70.
- Coustou, V., Biran, M., Breton, M., Guegan, F., Riviere, L., Plazolles, N., Nolan, D., Barrett, M. P., Franconi, J. M., and Bringaud, F. (2008). "Glucose-induced remodeling of intermediary and energy metabolism in procyclic *Trypanosoma brucei*." *J Biol Chem*, 283(24), 16342-54.
- Coustou, V., Besteiro, S., Biran, M., Diolez, P., Bouchaud, V., Voisin, P., Michels, P. A., Canioni, P., Baltz, T., and Bringaud, F. (2003). "ATP generation in the *Trypanosoma brucei* procyclic form: cytosolic substrate level is essential, but not oxidative phosphorylation." *J Biol Chem*, 278(49), 49625-35.
- Cynamon, M. H., Alvarez-Freites, E., and Yeo, A. E. (2004). "BB-3497, a peptide deformylase inhibitor, is active against *Mycobacterium tuberculosis*." *J Antimicrob Chemother*, 53(2), 403-5.
- Dirk, L. M., Williams, M. A., and Houtz, R. L. (2001). "Eukaryotic peptide deformylases. Nuclear-encoded and chloroplast-targeted enzymes in *Arabidopsis*." *Plant Physiol*, 127(1), 97-107.
- Di Vito, M., Lenti, L., Knijn, A., Iorio, E., D'Agostino, F., Molinari, A., Calcabrini, A., Stringaro, A., Meschini, S., Arancia, G., Bozzi, A., Strom, R., and Podo, F. (2001). "1H NMR-visible mobile lipid domains correlate with cytoplasmic lipid bodies in apoptotic T-lymphoblastoid cells." *Biochim Biophys Acta*, 1530(1), 47-66.
- D'Souza V, M., and Holz, R. C. (1999). "The methionyl aminopeptidase from *Escherichia coli* can function as an iron(II) enzyme." *Biochemistry*, 38(34), 11079-85.

- Dardel, F., Ragusa, S., Lazennec, C., Blanquet, S., and Meinnel, T. (1998). "Solution structure of nickel-peptide deformylase." *J Mol Biol*, 280(3), 501-13.
- Durand, D. J., Gordon Green, B., O'Connell, J. F., and Grant, S. K. (1999). "Peptide aldehyde inhibitors of bacterial peptide deformylases." *Arch Biochem Biophys*, 367(2), 297-302.
- Durieux, P. O., Schutz, P., Brun, R., and Kohler, P. (1991). "Alterations in Krebs cycle enzyme activities and carbohydrate catabolism in two strains of *Trypanosoma brucei* during in vitro differentiation of their bloodstream to procyclic stages." *Mol Biochem Parasitol*, 45(1), 19-27.
- 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(25), 15094-103.
- Escobar-Alvarez, S., Goldgur, Y., Yang, G., Ouerfelli, O., Li, Y., and Scheinberg, D. A. (2009). "Structure and activity of human mitochondrial peptide deformylase, a novel cancer target." *J Mol Biol*, 387(5), 1211-28.
- Esseiva, A. C., Chanez, A. L., Bochud-Allemann, N., Martinou, J. C., Hemphill, A., and Schneider, A. (2004). "Temporal dissection of Bax-induced events leading to fission of the single mitochondrion in *Trypanosoma brucei*." *EMBO Rep*, 5(3), 268-73.
- Estevez, A. M., and Simpson, L. (1999). "Uridine insertion/deletion RNA editing in trypanosome mitochondria--a review." *Gene*, 240(2), 247-60.
- Fang, J., and Beattie, D. S. (2003). "Identification of a gene encoding a 54 kDa alternative NADH dehydrogenase in *Trypanosoma brucei*." *Mol Biochem Parasitol*, 127(1), 73-7.
- Fang, J., Wang, Y., and Beattie, D. S. (2001). "Isolation and characterization of complex I, rotenone-sensitive NADH: ubiquinone oxidoreductase, from the procyclic forms of *Trypanosoma brucei*." *Eur J Biochem*, 268(10), 3075-82.
- Feagin, J. E. (2000). "Mitochondrial genome diversity in parasites." *Int J Parasitol*, 30(4), 371-90.
- Fernandes Rodrigues, J. C., Concepcion, J. L., Rodrigues, C., Caldera, A., Urbina, J. A., and de Souza, W. (2008). "In vitro activities of ER-119884 and E5700, two potent squalene synthase inhibitors, against *Leishmania amazonensis*: antiproliferative, biochemical, and ultrastructural effects." *Antimicrob Agents Chemother*, 52(11), 4098-114.
- Fieulaine, S., Juillan-Binard, C., Serero, A., Dardel, F., Giglione, C., Meinnel, T., and Ferrer, J. L. (2005). "The crystal structure of mitochondrial (Type 1A) peptide deformylase provides clear guidelines for the design of inhibitors specific for the bacterial forms." *J Biol Chem*, 280(51), 42315-24.
- Flynn, J. M., Neher, S. B., Kim, Y. I., Sauer, R. T., and Baker, T. A. (2003). "Proteomic discovery of cellular substrates of the ClpXP protease reveals five classes of ClpX-recognition signals." *Mol Cell*, 11(3), 671-83.
- Fouts, D. L., and Wolstenholme, D. R. (1979). "Evidence for a partial RNA transcript of the small circular component of kinetoplast DNA of *Crithidia acanthocephali*." *Nucleic Acids Res*, 6(12), 3785-804.
- Futai, M., and Kanazawa, H. (1983). "Structure and function of proton-translocating adenosine triphosphatase (F₀F₁): biochemical and molecular biological approaches." *Microbiol Rev*, 47(3), 285-312.
- Gerdes, S. Y., Scholle, M. D., Campbell, J. W., Balazsi, G., Ravasz, E., Daugherty, M. D., Somera, A. L., Kyrpides, N. C., Anderson, I., Gelfand, M. S., Bhattacharya, A., Kapatral, V., D'Souza, M., Baev, M. V., Grechkin, Y., Mseeh, F., Fonstein, M. Y., Overbeek, R., Barabasi, A. L., Oltvai, Z. N., and Osterman, A. L. (2003).

- "Experimental determination and system level analysis of essential genes in *Escherichia coli* MG1655." *J Bacteriol*, 185(19), 5673-84.
- Giege, R., Sissler, M., and Florentz, C. (1998). "Universal rules and idiosyncratic features in tRNA identity." *Nucleic Acids Res*, 26(22), 5017-35.
- Giglione, C., Pierre, M., and Meinnel, T. (2000). "Peptide deformylase as a target for new generation, broad spectrum antimicrobial agents." *Mol Microbiol*, 36(6), 1197-205.
- Giglione, C., and Meinnel, T. (2001). "Peptide deformylase as an emerging target for antiparasitic agents." *Expert Opin Ther Targets*, 5(1), 41-57.
- Giglione, C., Pierre, M., and Meinnel, T. (2000). "Peptide deformylase as a target for new generation, broad spectrum antimicrobial agents." *Mol Microbiol*, 36(6), 1197-205.
- Giglione, C., Vallon, O., and Meinnel, T. (2003). "Control of protein life-span by N-terminal methionine excision." *Embo J*, 22(1), 13-23.
- Gordon, J. J., Kelly, B. K., and Miller, G. A. (1962). "Actinonin: an antibiotic substance produced by an actinomycete." *Nature*, 195, 701-2.
- Granthon, A. C., Braga, M. V., Rodrigues, J. C., Cammerer, S., Lorente, S. O., Gilbert, I. H., Urbina, J. A., and de Souza, W. (2007). "Alterations on the growth and ultrastructure of *Leishmania chagasi* induced by squalene synthase inhibitors." *Vet Parasitol*, 146(1-2), 25-34.
- Greenspan, P., Mayer, E. P., and Fowler, S. D. (1985). "Nile red: a selective fluorescent stain for intracellular lipid droplets." *J Cell Biol*, 100(3), 965-73.
- 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(8), 2595-601.
- Grossmann, G., Opekarova, M., Malinsky, J., Weig-Meckl, I., and Tanner, W. (2007). "Membrane potential governs lateral segregation of plasma membrane proteins and lipids in yeast." *Embo J*, 26(1), 1-8.
- Guilloteau, J. P., Mathieu, M., Giglione, C., Blanc, V., Dupuy, A., Chevrier, M., Gil, P., Famechon, A., Meinnel, T., and Mikol, V. (2002). "The crystal structures of four peptide deformylases bound to the antibiotic actinonin reveal two distinct types: a platform for the structure-based design of antibacterial agents." *J Mol Biol*, 320(5), 951-62.
- Haile, S., Estevez, A. M., and Clayton, C. (2003). "A role for the exosome in the in vivo degradation of unstable mRNAs." *Rna*, 9(12), 1491-501.
- Hao, B., Gong, W., Rajagopalan, P. T., Zhou, Y., Pei, D., and Chan, M. K. (1999). "Structural basis for the design of antibiotics targeting peptide deformylase." *Biochemistry*, 38(15), 4712-9.
- Han, B. W., Lee, J. Y., Yang, J. K., Lee, B. I., and Suh, S. W. (2001). "Crystallization and preliminary X-ray crystallographic analysis of deoxyuridine triphosphate nucleotidohydrolase from *Saccharomyces cerevisiae*." *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, 57(Pt 8), 1147-9.
- Hannaert, V., Bringaud, F., Opperdoes, F. R., and Michels, P. A. (2003). "Evolution of energy metabolism and its compartmentation in Kinetoplastida." *Kinetoplastid Biol Dis*, 2(1), 11.
- Hannon, G. J. (2002). "RNA interference." *Nature*, 418(6894), 244-51.
- Hashimi, H., Benkovicova, V., Cermakova, P., Lai, D. H., Horvath, A., and Lukes, J. (2009). "The assembly of F(1)F(O)-ATP synthase is disrupted upon interference of RNA editing in *Trypanosoma brucei*." *Int J Parasitol*, 40(1), 45-54.

- Hao, B., Gong, W., Rajagopalan, P. T., Zhou, Y., Pei, D., and Chan, M. K. (1999). "Structural basis for the design of antibiotics targeting peptide deformylase." *Biochemistry*, 38(15), 4712-9.
- Helfert, S., Estevez, A. M., Bakker, B., Michels, P., and Clayton, C. (2001). "Roles of triosephosphate isomerase and aerobic metabolism in *Trypanosoma brucei*." *Biochem J*, 357(Pt 1), 117-25.
- Hiltunen, J. K., Okubo, F., Kursu, V. A., Autio, K. J., and Kastaniotis, A. J. (2005). "Mitochondrial fatty acid synthesis and maintenance of respiratory competent mitochondria in yeast." *Biochem Soc Trans*, 33(Pt 5), 1162-5.
- Hellemond, J. J., Bakker, B. M., and Tielens, A. G. (2005). "Energy metabolism and its compartmentation in *Trypanosoma brucei*." *Adv Microb Physiol*, 50, 199-226.
- Hoogenraad, N. J., Ward, L. A., and Ryan, M. T. (2002). "Import and assembly of proteins into mitochondria of mammalian cells." *Biochim Biophys Acta*, 1592(1), 97-105.
- Horvath, A., Kingan, T. G., and Maslov, D. A. (2000). "Detection of the mitochondrially encoded cytochrome c oxidase subunit I in the trypanosomatid protozoan *Leishmania tarentolae*. Evidence for translation of unedited mRNA in the kinetoplast." *J Biol Chem*, 275(22), 17160-5.
- Hu, Y. J., Rajagopalan, P. T., and Pei, D. (1998). "H-phosphonate derivatives as novel peptide deformylase inhibitors." *Bioorg Med Chem Lett*, 8(18), 2479-82.
- Hutchison, C. A., Peterson, S. N., Gill, S. R., Cline, R. T., White, O., Fraser, C. M., Smith, H. O., and Venter, J. C. (1999). "Global transposon mutagenesis and a minimal *Mycoplasma* genome." *Science*, 286(5447), 2165-9.
- Kobayashi, K., Ehrlich, S. D., Albertini, A., Amati, G., Andersen, K. K., Arnaud, M., Asai, K., Ashikaga, S., Aymerich, S., Bessieres, P., Boland, F., Brignell, S. C., Bron, S., Bunai, K., Chapuis, J., Christiansen, L. C., Danchin, A., Debarbouille, M., Dervyn, E., Deuerling, E., Devine, K., Devine, S. K., Dreesen, O., Errington, J., Fillinger, S., Foster, S. J., Fujita, Y., Galizzi, A., Gardan, R., Eschevins, C., Fukushima, T., Haga, K., Harwood, C. R., Hecker, M., Hosoya, D., Hullo, M. F., Kakeshita, H., Karamata, D., Kasahara, Y., Kawamura, F., Koga, K., Koski, P., Kuwana, R., Imamura, D., Ishimaru, M., Ishikawa, S., Ishio, I., Le Coq, D., Masson, A., Mauel, C., Meima, R., Mellado, R. P., Moir, A., Moriya, S., Nagakawa, E., Nanamiya, H., Nakai, S., Nygaard, P., Ogura, M., Ohanan, T., O'Reilly, M., O'Rourke, M., Pragai, Z., Pooley, H. M., Rapoport, G., Rawlins, J. P., Rivas, L. A., Rivolta, C., Sadaie, A., Sadaie, Y., Sarvas, M., Sato, T., Saxild, H. H., Scanlan, E., Schumann, W., Seegers, J. F., Sekiguchi, J., Sekowska, A., Seror, S. J., Simon, M., Stragier, P., Studer, R., Takamatsu, H., Tanaka, T., Takeuchi, M., Thomaidis, H. B., Vagner, V., van Dijl, J. M., Watabe, K., Wipat, A., Yamamoto, H., Yamamoto, M., Yamamoto, Y., Yamane, K., Yata, K., Yoshida, K., Yoshikawa, H., Zuber, U., and Ogasawara, N. (2003). "Essential *Bacillus subtilis* genes." *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100(8), 4678-83.
- Kolesnick, R. N., and Kronke, M. (1998). "Regulation of ceramide production and apoptosis." *Annu Rev Physiol*, 60, 643-65.
- Kreusch, A., Spraggon, G., Lee, C. C., Klock, H., McMullan, D., Ng, K., Shin, T., Vincent, J., Warner, I., Ericson, C., and Lesley, S. A. (2003). "Structure analysis of peptide deformylases from *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Thermotoga maritima* and *Pseudomonas aeruginosa*: snapshots of the oxygen sensitivity of peptide deformylase." *J Mol Biol*, 330(2), 309-21.

- 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(1), 67-76.
- Laemmli, U. K. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." *Nature*, 227(5259), 680-5.
- Lamour, N., Riviere, L., Coustou, V., Coombs, G. H., Barrett, M. P., and Bringaud, F. (2005). "Proline metabolism in procyclic *Trypanosoma brucei* is down-regulated in the presence of glucose." *J Biol Chem*, 280(12), 11902-10.
- Lardy, H. A. (1980). "Antibiotic inhibitors of mitochondrial energy transfer." *Pharmacol Ther*, 11(3), 649-60.
- 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 X Mab2112 expression is required for gastrulation and subsequent neural development." *Biochem Biophys Res Commun*, 280(5), 1378-84.
- Lazardi, K., Urbina, J. A., and de Souza, W. (1991). "Ultrastructural alterations induced by ICI 195,739, a bis-triazole derivative with strong antiproliferative action against *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi*." *Antimicrob Agents Chemother*, 35(4), 736-40.
- Lazennec, C., and Meinnel, T. (1997). "Formate dehydrogenase-coupled spectrophotometric assay of peptide deformylase." *Anal Biochem*, 244(1), 180-2.
- Lee, C. P., Seong, B. L., and RajBhandary, U. L. (1991). "Structural and sequence elements important for recognition of *Escherichia coli* formylmethionine tRNA by methionyl-tRNA transformylase are clustered in the acceptor stem." *J Biol Chem*, 266(27), 18012-7.
- Lee, P., Beem, E., and Segal, M. S. (2002). "Marker for real-time analysis of caspase activity in intact cells." *Biotechniques*, 33(6), 1284-7, 1289-91.
- Lee, M. D., She, Y., Soskis, M. J., Borella, C. P., Gardner, J. R., Hayes, P. A., Dy, B. M., Heaney, M. L., Philips, M. R., Bornmann, W. G., Sirotnak, F. M., and Scheinberg, D. A. (2004). "Human mitochondrial peptide deformylase, a new anticancer target of actinonin-based antibiotics." *J Clin Invest*, 114(8), 1107-16.
- Lee, S. H., Stephens, J. L., Paul, K. S., and Englund, P. T. (2006). "Fatty acid synthesis by elongases in trypanosomes." *Cell*, 126(4), 691-9.
- Leeds, J. A., and Dean, C. R. (2006). "Peptide deformylase as an antibacterial target: a critical assessment." *Curr Opin Pharmacol*, 6(5), 445-52.
- Lepesheva, G. I., Zaitseva, N. G., Nes, W. D., Zhou, W., Arase, M., Liu, J., Hill, G. C., and Waterman, M. R. (2006). "CYP51 from *Trypanosoma cruzi*: a phyla-specific residue in the B' helix defines substrate preferences of sterol 14 α -demethylase." *J Biol Chem*, 281(6), 3577-85.
- 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(3), E67.
- Lithgow, T. (2000). "Targeting of proteins to mitochondria." *FEBS Lett*, 476(1-2), 22-6.
- 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(8), 363-9.
- Livingston, D. M., and Leder, P. (1969). "Deformylation and protein biosynthesis." *Biochemistry*, 8(1), 435-43.
- Lorente, S. O., Rodrigues, J. C., Jimenez Jimenez, C., Joyce-Menekse, M., Rodrigues, C., Croft, S. L., Yardley, V., de Luca-Fradley, K., Ruiz-Perez, L. M., Urbina, J., de Souza, W., Gonzalez Pacanowska, D., and Gilbert, I. H. (2004). "Novel azasterols as potential agents for treatment of leishmaniasis and trypanosomiasis." *Antimicrob Agents Chemother*, 48(8), 2937-50.

- Maden, B. E. (2000). "Tetrahydrofolate and tetrahydromethanopterin compared: functionally distinct carriers in C1 metabolism." *Biochem J*, 350 Pt 3, 609-29.
- Magaraci, F., Jimenez, C. J., Rodrigues, C., Rodrigues, J. C., Braga, M. V., Yardley, V., de Luca-Fradley, K., Croft, S. L., de Souza, W., Ruiz-Perez, L. M., Urbina, J., Gonzalez Pacanowska, D., and Gilbert, I. H. (2003). "Azasterols as inhibitors of sterol 24-methyltransferase in *Leishmania* species and *Trypanosoma cruzi*." *J Med Chem*, 46(22), 4714-27.
- Margolis, P., Hackbarth, C., Lopez, S., Maniar, M., Wang, W., Yuan, Z., White, R., and Trias, J. (2001). "Resistance of *Streptococcus pneumoniae* to deformylase inhibitors is due to mutations in *defB*." *Antimicrob Agents Chemother*, 45(9), 2432-5.
- Mazel, D., Coic, E., Blanchard, S., Saurin, W., and Marliere, P. (1997). "A survey of polypeptide deformylase function throughout the eubacterial lineage." *J Mol Biol*, 266(5), 939-49.
- Mazel, D., Pochet, S., and Marliere, P. (1994). "Genetic characterization of polypeptide deformylase, a distinctive enzyme of eubacterial translation." *Embo J*, 13(4), 914-23.
- Meinzel, T., and Blanquet, S. (1993). "Evidence that peptide deformylase and methionyl-tRNA(fMet) formyltransferase are encoded within the same operon in *Escherichia coli*." *J Bacteriol*, 175(23), 7737-40.
- Meinzel, T., and Blanquet, S. (1994). "Characterization of the *Thermus thermophilus* locus encoding peptide deformylase and methionyl-tRNA(fMet) formyltransferase." *J Bacteriol*, 176(23), 7387-90.
- Meinzel, T., and Blanquet, S. (1995). "Enzymatic properties of *Escherichia coli* peptide deformylase." *J Bacteriol*, 177(7), 1883-7.
- Meinzel, T., Blanquet, S., and Dardel, F. (1996). "A new subclass of the zinc metalloproteases superfamily revealed by the solution structure of peptide deformylase." *J Mol Biol*, 262(3), 375-86.
- Meinzel, T., Patiny, L., Ragusa, S., and Blanquet, S. (1999). "Design and synthesis of substrate analogue inhibitors of peptide deformylase." *Biochemistry*, 38(14), 4287-95.
- Mercer, E. I. (1993). "Inhibitors of sterol biosynthesis and their applications." *Prog Lipid Res*, 32(4), 357-416.
- 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(19), 5194-201.
- Miller, C. G., Kukral, A. M., Miller, J. L., and Movva, N. R. (1989). "pepM is an essential gene in *Salmonella typhimurium*." *J Bacteriol*, 171(9), 5215-7.
- Minauro-Sanmiguel, F., Wilkens, S., and Garcia, J. J. (2005). "Structure of dimeric mitochondrial ATP synthase: novel F0 bridging features and the structural basis of mitochondrial cristae biogenesis." *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102(35), 12356-8.
- 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(6), 689-99.
- Motyka, S. A., and Englund, P. T. (2004). "RNA interference for analysis of gene function in trypanosomatids." *Curr Opin Microbiol*, 7(4), 362-8.
- Mucha, A., Drag, M., Dalton, J. P., and Kafarski, P. "Metallo-aminopeptidase inhibitors." *Biochimie*.

- Murta, S. M., Vickers, T. J., Scott, D. A., and Beverley, S. M. (2009). "Methylene tetrahydrofolate dehydrogenase/cyclohydrolase and the synthesis of 10-CHO-THF are essential in *Leishmania major*." *Mol Microbiol*, 71(6), 1386-401.
- Neupert, W. (1997). "Protein import into mitochondria." *Annu Rev Biochem*, 66, 863-917.
- 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(25), 14687-92.
- Nguyen, K. T., Hu, X., Colton, C., Chakrabarti, R., Zhu, M. X., and Pei, D. (2003). "Characterization of a human peptide deformylase: implications for antibacterial drug design." *Biochemistry*, 42(33), 9952-8.
- Nolan, D. P., and Voorheis, H. P. (1992). "The mitochondrion in bloodstream forms of *Trypanosoma brucei* is energized by the electrogenic pumping of protons catalysed by the F1F0-ATPase." *Eur J Biochem*, 209(1), 207-16.
- Nolan, D. P., and Voorheis, H. P. (2000). "Hydrogen ion gradients across the mitochondrial, endosomal and plasma membranes in bloodstream forms of *trypanosoma brucei* solving the three-compartment problem." *Eur J Biochem*, 267(15), 4601-14.
- Normanly, J., and Abelson, J. (1989). "tRNA identity." *Annu Rev Biochem*, 58, 1029-49.
- Ochsenreiter, T., and Hajduk, S. L. (2006). "Alternative editing of cytochrome c oxidase III mRNA in trypanosome mitochondria generates protein diversity." *EMBO Rep*, 7(11), 1128-33.
- Opperdoes, F. R. (1987). "Compartmentation of carbohydrate metabolism in trypanosomes." *Annu Rev Microbiol*, 41, 127-51.
- Opperdoes, F. R., Borst, P., Bakker, S., and Leene, W. (1977). "Localization of glycerol-3-phosphate oxidase in the mitochondrion and particulate NAD⁺-linked glycerol-3-phosphate dehydrogenase in the microbodies of the bloodstream form to *Trypanosoma brucei*." *Eur J Biochem*, 76(1), 29-39.
- Opstad, K. S., Bell, B. A., Griffiths, J. R., and Howe, F. A. (2009). "Taurine: a potential marker of apoptosis in gliomas." *Br J Cancer*, 100(5), 789-94.
- Palmie-Peixoto, I. V., Rocha, M. R., Urbina, J. A., de Souza, W., Einicker-Lamas, M., and Motta, M. C. (2006). "Effects of sterol biosynthesis inhibitors on endosymbiont-bearing trypanosomatids." *FEMS Microbiol Lett*, 255(1), 33-42.
- Park, J. K., Moon, J. H., Kim, J. H., and Kim, E. E. (2005). "Crystallization and preliminary X-ray crystallographic analysis of peptide deformylase (PDF) from *Bacillus cereus* in ligand-free and actinonin-bound forms." *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun*, 61(Pt 1), 150-2.
- Parsons, M., Furuya, T., Pal, S., and Kessler, P. (2001). "Biogenesis and function of peroxisomes and glycosomes." *Mol Biochem Parasitol*, 115(1), 19-28.
- Paumard, P., Vaillier, J., Couлары, B., Schaeffer, J., Soubannier, V., Mueller, D. M., Brethes, D., di Rago, J. P., and Velours, J. (2002). "The ATP synthase is involved in generating mitochondrial cristae morphology." *Embo J*, 21(3), 221-30.
- Pena-Diaz, J., Montalvetti, A., Flores, C. L., Constan, A., Hurtado-Guerrero, R., De Souza, W., Gancedo, C., Ruiz-Perez, L. M., and Gonzalez-Pacanowska, D. (2004). "Mitochondrial localization of the mevalonate pathway enzyme 3-Hydroxy-3-methyl-glutaryl-CoA reductase in the Trypanosomatidae." *Mol Biol Cell*, 15(3), 1356-63.
- Phillips, T. A., VanBogelen, R. A., and Neidhardt, F. C. (1984). "lon gene product of *Escherichia coli* is a heat-shock protein." *J Bacteriol*, 159(1), 283-7.

- Pine, M. J. (1969). "Kinetics of maturation of the amino termini of the cell proteins of *Escherichia coli*." *Biochim Biophys Acta*, 174(1), 359-72.
- Pizzo, P., and Pozzan, T. (2007). "Mitochondria-endoplasmic reticulum choreography: structure and signaling dynamics." *Trends Cell Biol*, 17(10), 511-7.
- Polevoda, B., and Sherman, F. (2007). "Methylation of proteins involved in translation." *Mol Microbiol*, 65(3), 590-606.
- Ragusa S, Blanquet S, Meinnel T. (1998) Control of peptide deformylase activity by metal cations. *J Mol Biol*. 280(3):515-23.
- Rajagopalan PT, Datta A, Pei D. (1997) Purification, characterization, and inhibition of peptide deformylase from *Escherichia coli*. *Biochemistry*. 36(45):13910-8.
- Rajagopalan, P. T., Grimme, S., and Pei, D. (2000). "Characterization of cobalt(II)-substituted peptide deformylase: function of the metal ion and the catalytic residue Glu-133." *Biochemistry*, 39(4), 779-90.
- RajBhandary, U. L. (1994). "Initiator transfer RNAs." *J Bacteriol*, 176(3), 547-52.
- Rak, M., Tetaud, E., Godard, F., Sagot, I., Salin, B., Duvezin-Caubet, S., Slonimski, P. P., Rytka, J., and di Rago, J. P. (2007). "Yeast cells lacking the mitochondrial gene encoding the ATP synthase subunit 6 exhibit a selective loss of complex IV and unusual mitochondrial morphology." *J Biol Chem*, 282(15), 10853-64.
- Ramesh, V., Kohrer, C., and RajBhandary, U. L. (2002). "Expression of *Escherichia coli* methionyl-tRNA formyltransferase in *Saccharomyces cerevisiae* leads to formylation of the cytoplasmic initiator tRNA and possibly to initiation of protein synthesis with formylmethionine." *Mol Cell Biol*, 22(15), 5434-42.
- Rasmussen, H. S., and McCann, P. P. (1997). "Matrix metalloproteinase inhibition as a novel anticancer strategy: a review with special focus on batimastat and marimastat." *Pharmacol Ther*, 75(1), 69-75.
- Riviere, L., Moreau, P., Allmann, S., Hahn, M., Biran, M., Plazolles, N., Franconi, J. M., Boshart, M., and Bringaud, F. (2009). "Acetate produced in the mitochondrion is the essential precursor for lipid biosynthesis in procyclic trypanosomes." *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106(31), 12694-9.
- Robinson, J. M., and Karnovsky, M. J. (1980). "Evaluation of the polyene antibiotic filipin as a cytochemical probe for membrane cholesterol." *J Histochem Cytochem*, 28(2), 161-8.
- Rodrigues, C. O., Catisti, R., Uyemura, S. A., Vercesi, A. E., Lira, R., Rodriguez, C., Urbina, J. A., and Docampo, R. (2001). "The sterol composition of *Trypanosoma cruzi* changes after growth in different culture media and results in different sensitivity to digitonin-permeabilization." *J Eukaryot Microbiol*, 48(5), 588-94.
- Rodrigues, J. C., Attias, M., Rodriguez, C., Urbina, J. A., and Souza, W. (2002). "Ultrastructural and biochemical alterations induced by 22,26-azasterol, a delta(24(25))-sterol methyltransferase inhibitor, on promastigote and amastigote forms of *Leishmania amazonensis*." *Antimicrob Agents Chemother*, 46(2), 487-99.
- Rodrigues, J. C., Urbina, J. A., and de Souza, W. (2005). "Antiproliferative and ultrastructural effects of BPQ-OH, a specific inhibitor of squalene synthase, on *Leishmania amazonensis*." *Exp Parasitol*, 111(4), 230-8.
- Rohrer, S. P., Michelotti, E. F., Torri, A. F., and Hajduk, S. L. (1987). "Transcription of kinetoplast DNA minicircles." *Cell*, 49(5), 625-32.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning: A laboratory Manual*.

- Schnauffer, A., Domingo, G. J., and Stuart, K. (2002). "Natural and induced dyskinetoplastic trypanosomatids: how to live without mitochondrial DNA." *Int J Parasitol*, 32(9), 1071-84.
- Schnauffer, A., Clark-Walker, G. D., Steinberg, A. G., and Stuart, K. (2005). "The F1-ATP synthase complex in bloodstream stage trypanosomes has an unusual and essential function." *Embo J*, 24(23), 4029-40.
- Schneider, A., Bursac, D., and Lithgow, T. (2008). "The direct route: a simplified pathway for protein import into the mitochondrion of trypanosomes." *Trends Cell Biol*, 18(1), 12-8.
- Scornik, O. A., and Botbol, V. (2001). "Bestatin as an experimental tool in mammals." *Curr Drug Metab*, 2(1), 67-85.
- Sela, D., Milman, N., Kapeller, I., Zick, A., Bezalel, R., Yaffe, N., and Shlomai, J. (2008). "Unique characteristics of the kinetoplast DNA replication machinery provide potential drug targets in trypanosomatids." *Adv Exp Med Biol*, 625, 9-21.
- Serero, A., Giglione, C., and Meinnel, T. (2001). "Distinctive features of the two classes of eukaryotic peptide deformylases." *J Mol Biol*, 314(4), 695-708.
- Serero, A., Giglione, C., Sardini, A., Martinez-Sanz, J., and Meinnel, T. (2003). "An unusual peptide deformylase features in the human mitochondrial N-terminal methionine excision pathway." *J Biol Chem*, 278(52), 52953-63.
- Shapiro, T. A., and Englund, P. T. (1995). "The structure and replication of kinetoplast DNA." *Annu Rev Microbiol*, 49, 117-43.
- Shapiro, T. A., Klein, V. A., and Englund, P. T. (1999). "Isolation of kinetoplast DNA." *Methods Mol Biol*, 94, 61-7.
- Sheng, J., Kumagai, A., Dunphy, W. G., and Varshavsky, A. (2002). "Dissection of c-MOS degron." *Embo J*, 21(22), 6061-71.
- Sherman, F., Stewart, J. W., and Tsunasawa, S. (1985). "Methionine or not methionine at the beginning of a protein." *Bioessays*, 3(1), 27-31.
- 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(7), 1069-76.
- Shlomai, J., and Zadok, A. (1984). "Kinetoplast DNA minicircles of trypanosomatids encode for a protein product." *Nucleic Acids Res*, 12(21), 8017-28.
- Singh, N., and Rastogi, A. K. (1999). "Kinetoplast DNA minicircles of *Leishmania donovani* express a protein product." *Biochim Biophys Acta*, 1444(2), 263-8.
- Small, I., Wintz, H., Akashi, K., and Mireau, H. (1998). "Two birds with one stone: genes that encode products targeted to two or more compartments." *Plant Mol Biol*, 38(1-2), 265-77.
- Smith, K. J., Petit, C. M., Aubart, K., Smyth, M., McManus, E., Jones, J., Fosberry, A., Lewis, C., Lonetto, M., and Christensen, S. B. (2003). "Structural variation and inhibitor binding in polypeptide deformylase from four different bacterial species." *Protein Sci*, 12(2), 349-60.
- Solbiati, J., Chapman-Smith, A., Miller, J. L., Miller, C. G., and Cronan, J. E., Jr. (1999). "Processing of the N termini of nascent polypeptide chains requires deformylation prior to methionine removal." *J Mol Biol*, 290(3), 607-14.
- Steffens, G., and Buse, G. (1976). "[Studies on cytochrome c oxidase, I. Purification and characterization of bovine myocardial enzyme and identification of peptide chains in the complex]." *Hoppe Seylers Z Physiol Chem*, 357(8), 1125-37.
- St-Pierre, J., Brand, M. D., and Boutilier, R. G. (2000). "Mitochondria as ATP consumers: cellular treason in anoxia." *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97(15), 8670-4.

- Stock, D., Leslie, A. G., and Walker, J. E. (1999). "Molecular architecture of the rotary motor in ATP synthase." *Science*, 286(5445), 1700-5.
- Stuart, K. D., Schnauffer, A., Ernst, N. L., and Panigrahi, A. K. (2005). "Complex management: RNA editing in trypanosomes." *Trends Biochem Sci*, 30(2), 97-105.
- Stuart, K., Brun, R., Croft, S., Fairlamb, A., Gurtler, R. E., McKerrow, J., Reed, S., and Tarleton, R. (2008). "Kinetoplastids: related protozoan pathogens, different diseases." *J Clin Invest*, 118(4), 1301-10.
- Studier, F. W. (1991). "Use of bacteriophage T7 lysozyme to improve an inducible T7 expression system." *J Mol Biol*, 219(1), 37-44.
- Takeuchi, N., Vial, L., Panvert, M., Schmitt, E., Watanabe, K., Mechulam, Y., and Blanquet, S. (2001). "Recognition of tRNAs by Methionyl-tRNA transformylase from mammalian mitochondria." *J Biol Chem*, 276(23), 20064-8.
- Tan, T. H., Bochud-Allemann, N., Horn, E. K., and Schneider, A. (2002a). "Eukaryotic-type elongator tRNAMet of Trypanosoma brucei becomes formylated after import into mitochondria." *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99(3), 1152-7.
- Tan, T. H., Pach, R., Crausaz, A., Ivens, A., and Schneider, A. (2002b). "tRNAs in Trypanosoma brucei: genomic organization, expression, and mitochondrial import." *Mol Cell Biol*, 22(11), 3707-17.
- Tielens, A. G., Rotte, C., van Hellemond, J. J., and Martin, W. (2002). "Mitochondria as we don't know them." *Trends Biochem Sci*, 27(11), 564-72.
- Tielens, A. G., and Van Hellemond, J. J. (1998). "The electron transport chain in anaerobically functioning eukaryotes." *Biochim Biophys Acta*, 1365(1-2), 71-8.
- Tielens, A. G. (1994). "Energy generation in parasitic helminths." *Parasitol Today*, 10(9), 346-52.
- Timms, M. W., van Deursen, F. J., Hendriks, E. F., and Matthews, K. R. (2002). "Mitochondrial development during life cycle differentiation of African trypanosomes: evidence for a kinetoplast-dependent differentiation control point." *Mol Biol Cell*, 13(10), 3747-59.
- Toba, S., Damodaran, K. V., and Merz, K. M., Jr. (1999). "Binding preferences of hydroxamate inhibitors of the matrix metalloproteinase human fibroblast collagenase." *J Med Chem*, 42(7), 1225-34.
- Tsunasawa, S., Izu, Y., Miyagi, M., and Kato, I. (1997). "Methionine aminopeptidase from the hyperthermophilic Archaeon Pyrococcus furiosus: molecular cloning and overexpression in Escherichia coli of the gene, and characteristics of the enzyme." *J Biochem*, 122(4), 843-50.
- Tyler, K. M., Fridberg, A., Toriello, K. M., Olson, C. L., Cieslak, J. A., Hazlett, T. L., and Engman, D. M. (2009). "Flagellar membrane localization via association with lipid rafts." *J Cell Sci*, 122(Pt 6), 859-66.
- Urbina, J. A., Vivas, J., Visbal, G., and Contreras, L. M. (1995). "Modification of the sterol composition of Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi epimastigotes by delta 24(25)-sterol methyl transferase inhibitors and their combinations with ketoconazole." *Mol Biochem Parasitol*, 73(1-2), 199-210.
- Uzategui, N. L., Denninger, V., Merkel, P., Schoenfeld, C., Figarella, K., and Duszenko, M. (2007). "Dihydroxyacetone induced autophagy in African trypanosomes." *Autophagy*, 3(6), 626-9.
- Vallee, B. L., and Auld, D. S. (1990). "Zinc coordination, function, and structure of zinc enzymes and other proteins." *Biochemistry*, 29(24), 5647-59.
- Vance, J. E. (1990). "Phospholipid synthesis in a membrane fraction associated with mitochondria." *J Biol Chem*, 265(13), 7248-56.

- Vannier-Santos, M. A., Urbina, J. A., Martiny, A., Neves, A., and de Souza, W. (1995). "Alterations induced by the antifungal compounds ketoconazole and terbinafine in *Leishmania*." *J Eukaryot Microbiol*, 42(4), 337-46.
- van Hellemond, J. J., Opperdoes, F. R., and Tielens, A. G. (2005). "The extraordinary mitochondrion and unusual citric acid cycle in *Trypanosoma brucei*." *Biochem Soc Trans*, 33(Pt 5), 967-71.
- van Hellemond, J. J., and Tielens, A. G. (2006). "Adaptations in the lipid metabolism of the protozoan parasite *Trypanosoma brucei*." *FEBS Lett*, 580(23), 5552-8.
- van Weelden, S. W., Fast, B., Vogt, A., van der Meer, P., Saas, J., van Hellemond, J. J., Tielens, A. G., and Boshart, M. (2003). "Procyclic *Trypanosoma brucei* do not use Krebs cycle activity for energy generation." *J Biol Chem*, 278(15), 12854-63.
- van Weelden, S. W., van Hellemond, J. J., Opperdoes, F. R., and Tielens, A. G. (2005). "New functions for parts of the Krebs cycle in procyclic *Trypanosoma brucei*, a cycle not operating as a cycle." *J Biol Chem*, 280(13), 12451-60.
- Varshavsky, A. (1996). "The N-end rule: functions, mysteries, uses." *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93(22), 12142-9.
- Velours, J., and Arselin, G. (2000). "The *Saccharomyces cerevisiae* ATP synthase." *J Bioenerg Biomembr*, 32(4), 383-90.
- Vetro, J. A., and Chang, Y. H. (2002). "Yeast methionine aminopeptidase type 1 is ribosome-associated and requires its N-terminal zinc finger domain for normal function in vivo." *J Cell Biochem*, 85(4), 678-88.
- Visser, N., Opperdoes, F. R., and Borst, P. (1981). "Subcellular compartmentation of glycolytic intermediates in *Trypanosoma brucei*." *Eur J Biochem*, 118(3), 521-6.
- Vivas, J., Urbina, J. A., and de Souza, W. (1996). "Ultrastructural alterations in *Trypanosoma* (*Schizotrypanum*) *cruzi* induced by Delta(24(25)) sterol methyl transferase inhibitors and their combinations with ketoconazole." *Int J Antimicrob Agents*, 7(4), 235-240.
- van den Hoff, M. J., Moorman, A. F., and Lamers, W. H. (1992). "Electroporation in 'intracellular' buffer increases cell survival." *Nucleic Acids Res*, 20(11), 2902.
- von Heijne, G. (1989). "Control of topology and mode of assembly of a polytopic membrane protein by positively charged residues." *Nature*, 341(6241), 456-8.
- 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(5588), 1833-7.
- Wagner, A., Grillitsch, K., Leitner, E., and Daum, G. (2009). "Mobilization of steryl esters from lipid particles of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*." *Biochim Biophys Acta*, 1791(2), 118-24.
- Walker, J. E., Lutter, R., Dupuis, A., and Runswick, M. J. (1991). "Identification of the subunits of F1F0-ATPase from bovine heart mitochondria." *Biochemistry*, 30(22), 5369-78.
- Waller, J. P. (1963). "The N-Terminal Residues of the Proteins from Cell-Free Extracts of *E. Coli*." *J Mol Biol*, 7, 483-96.
- Welburn, S. C., Barcinski, M. A., and Williams, G. T. (1997). "Programmed cell death in trypanosomatids." *Parasitol Today*, 13(1), 22-6.
- Whittaker, M., and Brown, P. (1998). "Recent advances in matrix metalloproteinase inhibitor research and development." *Curr Opin Drug Discov Devel*, 1(2), 157-64.
- Wiesner, J., Sanderbrand, S., Altincicek, B., Beck, E., and Jomaa, H. (2001). "Seeking new targets for antiparasitic agents." *Trends Parasitol*, 17(1), 7-8.

- Williams, N., and Frank, P. H. (1990). "The mitochondrial ATP synthase of *Trypanosoma brucei*: isolation and characterization of the intact F1 moiety." *Mol Biochem Parasitol*, 43(1), 125-32.
- Williams, N. (1994). "The mitochondrial ATP synthase of *Trypanosoma brucei*: structure and regulation." *J Bioenerg Biomembr*, 26(2), 173-8.
- 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(1), 89-101.
- Worley, C. K., Ling, R., and Callis, J. (1998). "Engineering in vivo instability of firefly luciferase and *Escherichia coli* beta-glucuronidase in higher plants using recognition elements from the ubiquitin pathway." *Plant Mol Biol*, 37(2), 337-47.
- Yang, G., Kirkpatrick, R. B., Ho, T., Zhang, G. F., Liang, P. H., Johanson, K. O., Casper, D. J., Doyle, M. L., Marino, J. P., Jr., Thompson, S. K., Chen, W., Tew, D. G., and Meek, T. D. (2001). "Steady-state kinetic characterization of substrates and metal-ion specificities of the full-length and N-terminally truncated recombinant human methionine aminopeptidases (type 2)." *Biochemistry*, 40(35), 10645-54.
- Yuan, Z., Trias, J., and White, R. J. (2001). "Deformylase as a novel antibacterial target." *Drug Discov Today*, 6(18), 954-961.
- Yuan, Z., and White, R. J. (2006). "The evolution of peptide deformylase as a target: contribution of biochemistry, genetics and genomics." *Biochem Pharmacol*, 71(7), 1042-7.
- Zhou, Z., Song, X., and Gong, W. (2005). "Novel conformational states of peptide deformylase from pathogenic bacterium *Leptospira interrogans*: implications for population shift." *J Biol Chem*, 280(51), 42391-6.
- Zikova, A., Schnauffer, A., Dalley, R. A., Panigrahi, A. K., and Stuart, K. D. (2009). "The F(0)F(1)-ATP synthase complex contains novel subunits and is essential for procyclic *Trypanosoma brucei*." *PLoS Pathog*, 5(5), e1000436.
- Zilberman, D., Cao, X., and Jacobsen, S. E. (2003). "ARGONAUTE4 control of locus-specific siRNA accumulation and DNA and histone methylation." *Science*, 299(5607), 716-9.

