



Instituto de Parasitología y Biomedicina López-Neyra
Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC)
Granada

**DESCIFRANDO EL PAPEL DE LA ENDONUCLEASA V
EN EL METABOLISMO DE ÁCIDOS NUCLEICOS DE
*Trypanosoma Brucei***

Daniel García Caballero
Tesis Doctoral
Septiembre 2017

**DESCIFRANDO EL PAPEL DE LA ENDONUCLEASA V
EN EL METABOLISMO DE ÁCIDOS NUCLEICOS DE
*Trypanosoma Brucei***

Memoria presentada por el Licenciado
Daniel García Caballero para optar
al grado de Doctor en
Bioquímica y Biología Molecular

Granada, Septiembre de 2017

Daniel García Caballero

Editor: Universidad de Granada. Tesis Doctorales
Autor: Daniel García Caballero
ISBN: 978-84-9163-679-3
URI:<http://hdl.handle.net/10481/48825>

El doctorando Daniel García Caballero y los directores de la tesis Dolores González Pacanowska y Antonio E. Vidal Romero, garantizamos, al firmar esta tesis doctoral, que el trabajo ha sido realizado por el doctorando bajo la dirección de los directores de la tesis y hasta donde nuestro conocimiento alcanza, en la realización del trabajo, se han respetado los derechos de otros autores a ser citados, cuando se han utilizado sus resultados o publicaciones.

Granada, 28 de septiembre de 2017

Directores de la tesis:

Fdo.: Dolores González Pacanowska

Fdo.: Antonio E. Vidal Romero

Doctorando:

Fdo.: Daniel García Caballero

Agradecimientos

Mi más sincero agradecimiento a Lola por haberme dado la oportunidad de realizar esta tesis en su laboratorio. Por sus conocimientos y experiencia, que me han convertido en mejor científico, y por sus consejos, que me han hecho mejor persona. Por su paciencia, comprensión y cariño. A Antonio, por su estupenda labor como director de esta tesis, por permitirme aprender tanto de él cada día, y por transmitirme su entusiasmo por la ciencia. A Luis Miguel, por su entera disposición siempre que lo he necesitado.

Mi agradecimiento también a todos los que han sido mis compañeros de laboratorio durante estos años, por su apoyo y por darme tantos buenos momentos. En especial a Guiomar, por su contribución en este trabajo. A Víctor, por ayudarme a dar los primeros pasos. A Aurora, por su gran labor como técnico y su infinita paciencia. Y a María, Miriam, Ana y Blanca, por alegrarme las tardes y ofrecerme su amistad.

A María Ángeles, por su cariño y su paciencia durante tantos años. Por su apoyo en los momentos más difíciles y por animarme a no rendirme.

A mi familia, por estar siempre conmigo y por su apoyo incondicional. Y en especial a mis padres, porque sin su gran esfuerzo nada de esto sería posible.

ÍNDICE

A. INTRODUCCIÓN.....	3
A.1. LA TRIPANOSOMIASIS AFRICANA.....	3
A.1.1. Epidemiología	3
A.1.2. La enfermedad y su tratamiento	4
A.2. CARACTERÍSTICAS DE <i>T. brucei</i>	6
A.2.1. Peculiaridades morfológicas y bioquímicas	6
A.2.2. Ciclo de vida.....	8
A.2.3. Ciclo celular	9
A.3. LA DESAMINACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS Y SU METABOLISMO	11
A.3.1. Causas y consecuencias biológicas de la presencia de inosina en DNA y RNA	12
A.3.1.1. Desaminación <i>in situ</i> de adenina.....	12
A.3.1.2. Incorporación de inosina durante la replicación y la transcripción.....	14
A.3.1.3. Edición de adenina en RNA	15
A.3.2. Mecanismos de eliminación de inosina del DNA	17
A.4. ENDONUCLEASA V	19
A.4.1. Especificidad de sustrato	19
A.4.2. Estructura y mecanismo catalítico de la endonucleasa V.....	20
A.4.3. Función celular de la Endonucleasa V: papel en el metabolismo de DNA y de RNA.....	25
B. OBJETIVOS.....	29
C. MATERIALES Y MÉTODOS.....	33
C.1. MATERIALES	33
C.1.1. Líneas celulares de <i>Trypanosoma brucei</i>	33
C.1.2. Cepas de <i>Escherichia coli</i>	34
C.1.3. Medios de cultivo	34
C.1.4. Tampones y soluciones	35
C.1.5. Compuestos	36
C.1.6. Oligonucleótidos utilizados en PCR.....	36
C.1.7. Sustratos utilizados para caracterizar la actividad de <i>TbEndoV</i>	38
C.1.8. Vectores.....	38
C.1.9. Software.....	39

C.1.9.1. Programas informáticos.....	39
C.1.9.2. Bases de datos	40
C.1.10. Análisis estadístico	40
C.2. MÉTODOS	41
C.2.1. Cultivo y manipulación de parásitos	41
C.2.1.1. Cultivo de <i>Trypanosoma brucei</i>	41
C.2.1.2. Obtención de extractos totales de parásitos.....	41
C.2.1.3. Criopreservación y descongelación.....	42
C.2.1.4. Transfección estable por electroporación.....	42
C.2.1.5. Ensayos de proliferación celular y sensibilidad a compuestos genotóxicos	44
C.2.1.6. Determinación del espectro y la tasa de mutación por el test de fluctuación de Luria-Delbrück	44
C.2.2. Técnicas para el estudio de la proteína.....	45
C.2.2.1. Obtención de la proteína purificada	45
C.2.2.2. Expresión de His- <i>TbEndoV</i> y MBP- <i>TbEndoV</i>	46
C.2.2.3. Purificación de la proteína recombinante MBP- <i>TbEndoV</i> mediante cromatografía de afinidad.....	46
C.2.2.4. Purificación de la proteína recombinante His- <i>TbEndoV</i> mediante cromatografía de afinidad.....	47
C.2.2.5. Purificación de la proteína recombinante His- <i>TbEndoV</i> mediante cromatografía de intercambio aniónico.....	47
C.2.2.6. Ensayos de actividad de <i>TbEndoV</i>	48
C.2.3. Técnicas inmunológicas	48
C.2.3.1. Obtención de anticuerpo anti- <i>TbEndoV</i>	48
C.2.3.2. Purificación del anticuerpo anti- <i>TbEndoV</i>	49
C.2.3.3. Western blot	50
C.2.3.4. Microscopia de fluorescencia.....	51
C.2.3.5. Estudios de estrés nutricional	51
C.2.3.6. Análisis de la localización de <i>TbEndoV</i> durante condiciones de estrés nutricional.....	52
C.2.3.7. Análisis del ciclo celular mediante citometría de flujo (FACS) y tinción con DAPI.....	53
C.2.4. Técnicas para el estudio de <i>TbEndoV</i> en células de <i>T. brucei</i>	54
C.2.4.1. Construcción de plásmidos.....	54
C.2.4.2. Infección de ratones C57BL/6 con cepas de <i>T. brucei</i>	55

D. RESULTADOS.....	59
D.1. CARACTERIZACIÓN ENZIMÁTICA DE LA ENDONUCLEASA V DE <i>Trypanosoma brucei</i> (<i>TbEndoV</i>)	59
D.1.1. Identificación de un ortólogo de endonucleasa V en el genoma de <i>T. brucei</i>	59
D.1.2. Expresión de <i>TbEndoV</i> en el sistema heterólogo <i>Escherichia coli</i>	61
D.1.3. Generación de un mutante catalítico D95A mediante mutagénesis dirigida.....	62
D.1.4. Purificación de <i>TbEndoV</i> recombinante	62
D.1.5. Identificación de <i>TbEndoV</i> mediante Huella de Masas Peptídicas.....	64
D.1.6. Obtención de anticuerpos policlonales frente a <i>TbEndoV</i>	64
D.1.7. <i>TbEndoV</i> es una ribonucleasa con actividad sobre hipoxantina	65
D.1.8. Condiciones óptimas de reacción de <i>TbEndoV</i>	68
D.1.9. Análisis de los determinantes de sustrato para la actividad endonucleasa de <i>TbEndoV</i>	69
D.1.10. <i>TbEndoV</i> actúa sobre inosina en sustratos tRNA	71
D.2. PAPEL BIOLÓGICO DE <i>TbEndoV</i>	73
D.2.1. Generación de líneas deficientes en EndoV	73
D.2.2. Generación de líneas transgénicas que sobreexpresan <i>TbEndoV</i>	77
D.2.3. Efecto de la depleción o eliminación de <i>TbEndoV</i> sobre la tasa de proliferación de <i>T. brucei</i>	79
D.2.4. La depleción de <i>TbEndoV</i> en formas procíclicas de <i>T. brucei</i> causa alteraciones importantes en el ciclo celular.....	80
D.2.5. Análisis del impacto de <i>TbEndoV</i> sobre la infectividad y virulencia en un modelo animal	82
D.2.6. Papel de <i>TbEndoV</i> en la protección frente a agentes genotóxicos.....	83
D.2.6.1. Papel de EndoV en la reparación de uracilo en el DNA genómico de <i>T.</i> <i>brucei</i>	84
D.2.6.2. Consecuencias del estrés nitrosativo en <i>T. brucei</i> . Papel de UNG y EndoV	86
D.3. ANÁLISIS DE LA DISTRIBUCIÓN INTRACELULAR DE <i>TbEndoV</i>	91
D.3.1. Localización subcelular	91
D.3.2. <i>TbEndoV</i> se relocaliza en gránulos de estrés tras la depleción de nutrientes colocalizando con la proteína <i>TbDhh1</i>	93
E. DISCUSIÓN.....	101
E.1. <i>TbEndoV</i> ES UNA ENDORIBONUCLEASA CON ACTIVIDAD SOBRE INOSINA	102
E.2. IDENTIFICACIÓN DE LA ENDONUCLEASA V COMO UNA PROTEÍNA DE RESPUESTA A ESTRÉS	104

E.3. SUSTRATOS POTENCIALES DE LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE LA ENDONUCLEASA V EN <i>T. brucei</i>	107
E.4. ENDOV E INTEGRIDAD GENÓMICA	110
E.5. RELEVANCIA DE <i>TbEndoV</i> EN LA VIABILIDAD DE <i>T. brucei</i> <i>IN VITRO</i> Y EN MODELOS DE INFECCIÓN ANIMAL	112
F. CONCLUSIONES.....	117
G. BIBLIOGRAFÍA.....	123

ABREVIATURAS

A

A. Adenina.

ADAR. Adenosina desaminasas que actúan sobre RNA.

ADAT. Adenosina desaminasas que actúan sobre tRNA

AP. Abásico.

B

BER. Reparación por escisión de bases o *base excision repair*.

BLE. Bleomicina.

BSA. Albúmina sérica bovina.

BSD. Blastocidina.

C

C. Citosina.

cDNA. DNA complementario.

D

(d)ATP. (Desoxi)adenosina-5'-trifosfato.

(d)CTP. (Desoxi)citidina-5'-trifosfato.

(d)GTP. (Desoxi)guanosina-5'-trifosfato.

(d)IMP. (Desoxi)inosina-5'-monofosfato.

(d)ITP. (Desoxi)inosina-5'-trifosfato.

(d)TTP. (Desoxi)timidina-5'-trifosfato.

(d)UTP. (Desoxi)uridina-5'-trifosfato.

(d)XTP. (Desoxi)xantosina-5'-trifosfato

DAPI. Diclorohidrato de 4',6-diamidino-2-fenilindol.

DETA/NO. Donador de óxido nítrico o *diethylenetriamine*.

DNA. Ácido desoxirribonucleico.

DNasa. Desoxirribonucleasa.

DO. Densidad óptica.

E

EndoV. Endonucleasa V.

F

FACS. Clasificación de células activadas por fluorescencia o *fluorescence-activated cell sorting*.

FPLC. Cromatografía rápida líquida de proteínas.

G

G. Guanina.

H

HAT. Tripanosomiasis Africana Humana o *Human African Trypanosomiasis*.

hEndoV. Endonucleasa V humana.

HEPES. Ácido N-(2-Hidroxietil)-piperazina-N-(*-etanosulfónico*).

HPLC. Cromatografía líquida de alto rendimiento.

HSV-TK. Timidina quinasa del virus Herpes Simplex.

Hx. Hipoxantina.

HYG. Higromicina.

I

I. Inosina.

IgG. Inmunoglobulina G.

iNOS. Sintasa de óxido nítrico inducible o *inducible nitric oxide synthase*.

IPTG. Isopropil- β -D-tiogalactopiranosido.

ITPA. Inosina trifosfato pirofosfatasa.

K

kDa. Kilodalton.

M

m³C. 3-metilcitosina.

m³U. 3-metiluracilo.

MALDI TOF. *Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight*.

MBP. Proteína de unión a maltosa o *maltose binding protein*.

MEM. Medio mínimo esencial.

mEndoV. Endonucleasa V de ratón.

mRNA. Ácido ribonucleico mensajero.

MTX. Metotrexato.

N

NO. Óxido nítrico o *nitric oxide*.

O

OMS. Organización Mundial de la Salud

ORF. Marco abierto de lectura o *open Reading frame*.

P

PBS. Tampón fosfato salino o *Phosphate-buffered saline*.

PCR. Reacción en cadena de la DNA polimerasa.

PDB. *Protein Data Bank*.

PMF. Huella de masas peptídicas o *Peptide mass fingerprinting*.

PUR. Puromicina.

R

rDNA. DNA ribosomal.

RNA. Ácido ribonucleico.

RNAi. RNA de interferencia.

RNasa. Ribonucleasa.

RNS. Especies de nitrógeno reactivo o *nitrogen reactive species*.

ROS. Especies de oxígeno reactivo o *reactive oxygen species*.

RT. Temperatura ambiente o *room temperature*.

S

SB. Bisulfito de sodio o *sodium bisulfite*.

SBF. Suero bovino fetal.

SD. Desviación estándar o *standard deviation*.

SDS. Dodecil sulfato sódico.

SDS-PAGE. Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato sódico.

SG. Granulo de estrés o *stress granule*.

SIF. *Stumpy-induction factor*.

T

T. Timina.

TbEndoV. Endonucleasa V de *Trypanosoma brucei*.

Tris. Tris(hidroximetil)-amino metano.

tRNA. Ácido ribonucleico transferente.

U

U. Uracilo.

UNG. Uracil-DNA glicosilasa.

UTR. Región no traducida o *untranslated region*.

V

VSG. Glicoproteína variante de superficie o *variant surface glycoprotein*.

INTRODUCCIÓN

A. INTRODUCCIÓN

A.1. LA TRIPANOSOMIASIS AFRICANA

A.1.1. Epidemiología

Las enfermedades olvidadas o desatendidas son aquellas que no figuran entre las prioridades de salud pública, debido a la baja influencia política, médica y social de los que las padecen. Pese a afectar en su conjunto a más de mil millones de personas según la Organización Mundial de la Salud (OMS), los recursos destinados a su control y erradicación son escasos o inexistentes. Entre las más conocidas se encuentran el dengue, la enfermedad de Chagas o la leishmaniasis. La tripanosomiasis africana, comúnmente conocida como “enfermedad del sueño” en humanos y “nagana” en animales, también pertenece a este grupo de enfermedades. Esta enfermedad parasitaria es causada por un protozoo perteneciente al género *Trypanosoma*, especie *brucei*.

La distribución de la tripanosomiasis está condicionada por la presencia de su vector de transmisión, la mosca tse-tsé (género *Glossina*), cuya presencia se restringe a países del África subsahariana. Pese a que todas las especies del género *Glossina* son potenciales transmisores de la tripanosomiasis, en la naturaleza sólo las especies *G. fuscipes*, *G. palpalis* y *G. morsitans* transmiten la enfermedad. Este insecto hematófago vive en zonas húmedas, cálidas y resguardadas por la vegetación, y por ello la mayor parte de las infecciones ocurren durante labores desarrolladas junto a ríos o lagos, tales como cazar, pescar o lavar la ropa (Simarro et al. 2012). Tan sólo el 1 % de las moscas portan el parásito totalmente desarrollado para la infección, sin embargo una única picadura es suficiente para transmitir la enfermedad.

La enfermedad del sueño ha sido endémica en zonas de África desde la aparición del ser humano, aunque no siempre ha tenido la misma incidencia. Una gran epidemia a principios del siglo pasado llevó a la adopción de medidas de control que redujeron el número de nuevos casos reportados por debajo de los 4000 en la década de los sesenta.

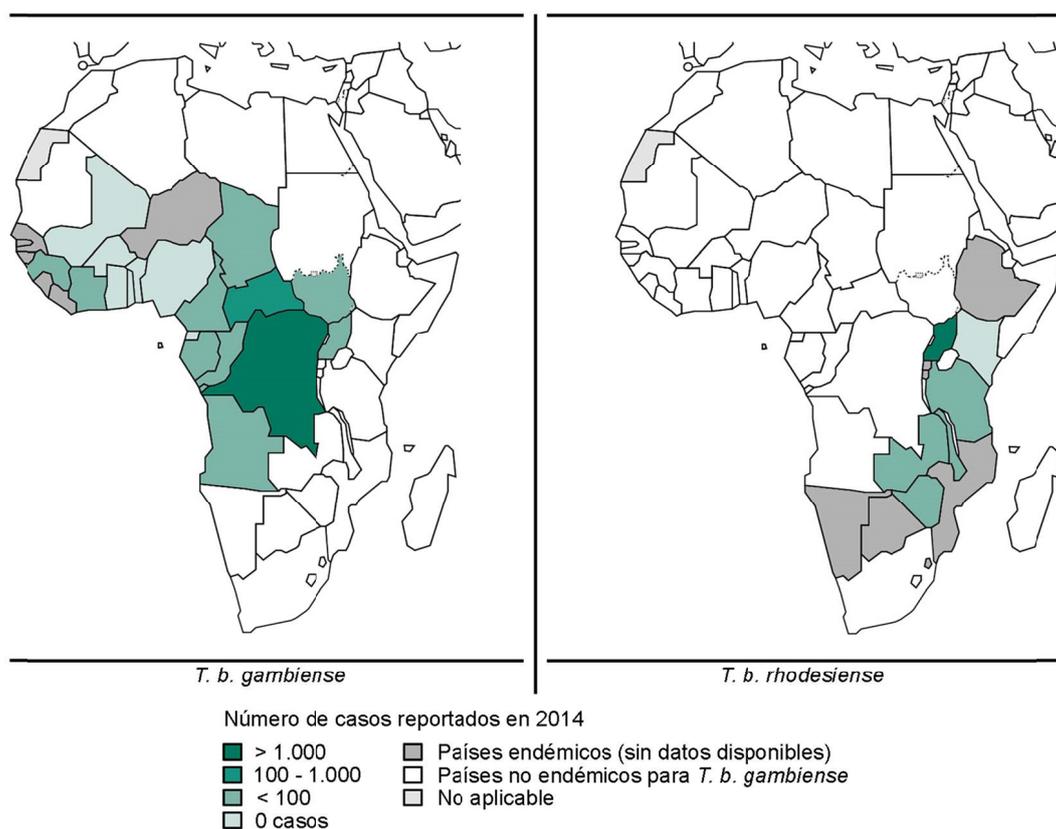


Figura A1. Distribución de la tripanosomiasis africana según los datos recopilados por la Organización Mundial de la Salud (OMS) hasta el año 2014. La tripanosomiasis africana en el hombre es causada por dos subespecies: *T. b. gambiense*, que se distribuye por países del África occidental y central (mapa de la izquierda); *T. b. rhodesiense*, responsable de la enfermedad en países del oriente y el sur de África (mapa de la derecha).

Sin embargo, los cambios socio-políticos acontecidos más tarde tuvieron como consecuencia la relajación de dichas medidas y los casos reportados volvieron a subir, alcanzando de nuevo el nivel de epidemia durante la década de los noventa. Fue entonces cuando la OMS estableció una serie de programas para el control de la enfermedad en coordinación con los países afectados y diversas entidades de carácter privado. Gracias a ello, el número de casos reportados ha bajado considerablemente, reduciéndose a menos de tres mil durante el año 2015 (Hide 1999; Franco et al. 2014).

A.1.2. La enfermedad y su tratamiento

Hay tres subespecies de *T. brucei*: *brucei*, *gambiense* y *rhodesiense*. *T. b. brucei* es responsable de la tripanosomiasis en animales y, pese a no ser infectivo para

humanos, tiene una gran influencia en la sociedad provocando cuantiosas pérdidas en el sector ganadero. *T. b. rhodesiense* y *T. b. gambiense* producen la tripanosomiasis africana humana (HAT, *Human African Trypanosomiasis*). La subespecie *T. b. gambiense* es responsable del 98% de los casos de HAT registrados en las últimas décadas, se extiende por el centro y oeste de África, y produce la forma crónica de la enfermedad. Por su parte, la subespecie *T. b. rhodesiense* produce la forma aguda de la enfermedad, caracterizada por una rápida progresión y su aparición en forma de epidemias. Se extiende por el sur y este de África, y es responsable del 2% de casos de HAT restantes (Brun et al. 2010). La enfermedad se desarrolla en dos etapas: una primera fase hemolinfática, y posteriormente una fase meningoencefálica. Durante la primera, el parásito se reproduce en tejidos subcutáneos, sangre y linfa. La segunda fase comienza cuando el parásito atraviesa la barrera hematoencefálica y llega al sistema nervioso, produciendo los síntomas característicos de la enfermedad: cambios de comportamiento, confusión, alteraciones sensoriales y trastornos del ciclo de sueño. Si no se trata, el paciente entra en estado de coma, sufre un fallo multiorgánico y finalmente muere. Ambas subespecies provocan los mismos signos y síntomas, pero mientras que la forma aguda se desarrolla en un periodo de aproximadamente seis meses, la forma crónica puede tardar hasta tres años en provocar la muerte del paciente (Checchi et al. 2008).

Desde 1990 no se han registrado nuevos fármacos para combatir la tripanosomiasis, el número de tratamientos existentes contra la enfermedad es muy reducido, y todos ellos provocan graves efectos secundarios. Para el tratamiento de la fase hemolinfática se administra pentamidina y suramina, efectivos contra *T. b. gambiense* y *T. b. rhodesiense* respectivamente. Para la fase meningoencefálica se utilizan el melarsoprol, cuyos efectos secundarios provocan la muerte en el 3-10 % de los pacientes, y la eflornitina, menos tóxica que el melarsoprol pero sólo eficaz contra *T. b. gambiense* (Brun et al. 2010). Las medidas aplicadas para reducir el número de casos consisten en la monitorización y tratamiento de nuevos afectados, evitando que actúen como reservorios, y en la utilización de diversas técnicas para eliminar el vector

de transmisión, tales como trampas o insecticidas. A pesar del éxito de estas medidas, la erradicación de la enfermedad no se prevé factible sin el desarrollo de nuevos fármacos que sean seguros, eficaces y de bajo coste.

A.2. CARACTERÍSTICAS DE *T. brucei*

T. brucei es un parásito protozooario extracelular perteneciente a la clase Kinetoplastea, orden Trypanosomatida, familia Trypanosomatidae, género *Trypanosoma*, especie *brucei*.

A.2.1. Peculiaridades morfológicas y bioquímicas

El kinetoplasto. La presencia de esta estructura tan característica da nombre a la clase entera. El kinetoplasto es una red densa de DNA localizada en la única mitocondria que posee cada célula, y compuesta por miles de anillos de DNA interconectados entre sí, denominados maxicírculos y minicírculos según su tamaño (Jensen and Englund 2012). Los maxicírculos tienen entre 20 y 40 kb, y su número varía entre 25 y 50 por célula. Los minicírculos son de menor tamaño, de 0,5 a 10 kb, y llegan a encontrarse entre 5000 y 10000 por célula. Los maxicírculos codifican genes típicos de la mitocondria como RNAs ribosomales y elementos de la cadena respiratoria. Por su parte, los minicírculos codifican las guías necesarias para la edición de los RNA mensajeros codificados por los maxicírculos (Shlomai 2004). Dicha edición se lleva a cabo mediante la inserción y delección de uridina para modificar la secuencia de amino ácidos o crear un marco de lectura válido para la traducción (Read et al. 2016).

Transcripción policistrónica. La transcripción en tripanosomátidos es policistrónica, lo que significa que grandes regiones del genoma que contienen genes no relacionados entre sí son transcritos al mismo tiempo. Dichos transcritos son procesados a nivel post-transcripcional para dar lugar a los mensajeros monocistrónicos que serán traducidos a proteínas (De Gaudenzi et al. 2011).

Variación antigénica. Las Glicoproteínas Variantes de Superficie (VSG, *Variant Surface Glycoprotein*) son proteínas de membrana que recubren la superficie del parásito casi en su totalidad, y juegan un papel fundamental durante la infección del huésped mamífero. Las VSGs constituyen el 20 % de la proteína total de membrana de *T. brucei*, son codificadas por hasta 2000 genes y cada parásito es sólo capaz de expresar una al mismo tiempo. Cuando el huésped desarrolla anticuerpos contra el parásito, la población es eliminada casi en su totalidad. Sin embargo, uno de cada cien mil parásitos es capaz de cambiar la VSG que expresa mediante procesos de recombinación y exclusión alélica, escapando al sistema inmune del huésped y reconstituyendo la infección (Horn 2014).

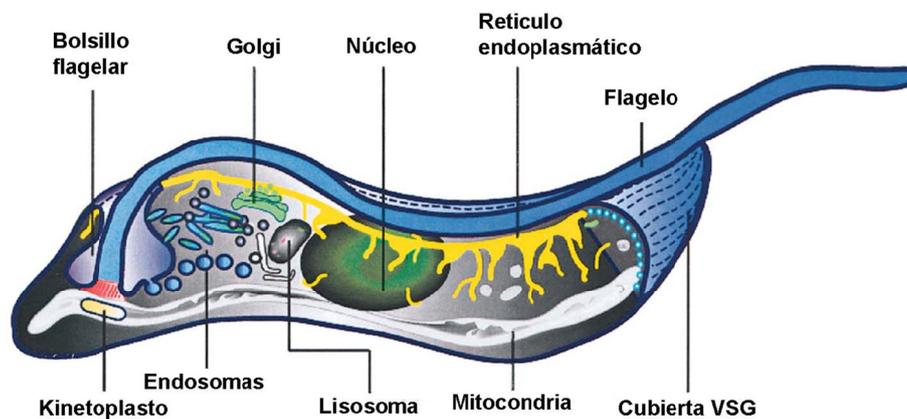


Figura A2. Esquema de las principales estructuras celulares de *T. brucei*, adaptado de (Grunfelder et al. 2003).

Otras peculiaridades propias de este organismo son la presencia de peroxisomas adaptados, que reciben el nombre de glicosomas y concentran las siete primeras enzimas de la glicolisis; la existencia de un flagelo único; una red de microtúbulos subpeliculares que forman el citoesqueleto y mantienen la morfología celular; y la presencia de un bolsillo flagelar a través del cual se dan los procesos de endocitosis y exocitosis (Achcar et al. 2014).

A.2.2. Ciclo de vida

T. brucei posee un ciclo de vida digenético durante el cual alterna entre dos formas: una forma sanguínea, adaptada a la vida dentro del huésped mamífero, y una forma procíclica, preparada para sobrevivir en el insecto vector. Dentro de cada una de las formas existen distintos estadios que se suceden a lo largo del ciclo. Cuando una mosca tse-tsé portadora de tripanosomas se alimenta de un huésped mamífero, junto con la saliva le inyecta tripomastigotes metacíclicos. Estos parásitos pasan de los tejidos subcutáneos a la sangre y la linfa, y se constituyen en tripomastigotes sanguíneos “alargados” (forma *slender*). Esta es la forma sanguínea proliferativa caracterizada por una fuerte expresión de VSG, cuyo cambio le permite escapar a la inmunidad adquirida del huésped. Además, tienen la mitocondria reprimida, y principalmente obtiene energía a través de la glucólisis llevada a cabo en los glicosomas (Bringaud et al. 2006). Conforme la parasitemia aumenta se acumula un factor parasitario (SIF, *stumpy-induction factor*) que promueve la transformación de tripomastigotes sanguíneos “alargados” a tripomastigotes sanguíneos “rechonchos” (forma *stumpy*) (Rico et al. 2013). La forma “rechoncha” es no proliferativa y su función es preadaptarse al entorno del insecto, además de frenar la parasitemia para evitar la muerte prematura del huésped (Matthews and Gull 1994; Vassella et al. 1997). Cuando el vector se alimenta de un mamífero con tripanosomiasis, algunos parásitos en la forma “rechoncha” pasan al intestino de la mosca, donde se diferencian a tripomastigotes procíclicos, que es la forma procíclica proliferativa. Estos están adaptados a las condiciones dentro del insecto, tienen la mitocondria activada (Bringaud et al. 2006), y dejan de expresar VSGs para empezar a expresar prociclina, la proteína que recubre la membrana de la forma procíclica (Acosta-Serrano et al. 2001). Tras multiplicarse en el intestino del vector los tripomastigotes procíclicos migran a las glándulas salivares, donde se diferencian a epimastigotes y siguen multiplicándose (Van Den Abbeele et al. 1999). Finalmente, los parásitos maduran a la forma metacíclica, que expresa de nuevo VSGs y es totalmente infectivo para el huésped mamífero, cerrándose el ciclo (Fenn and Matthews 2007).

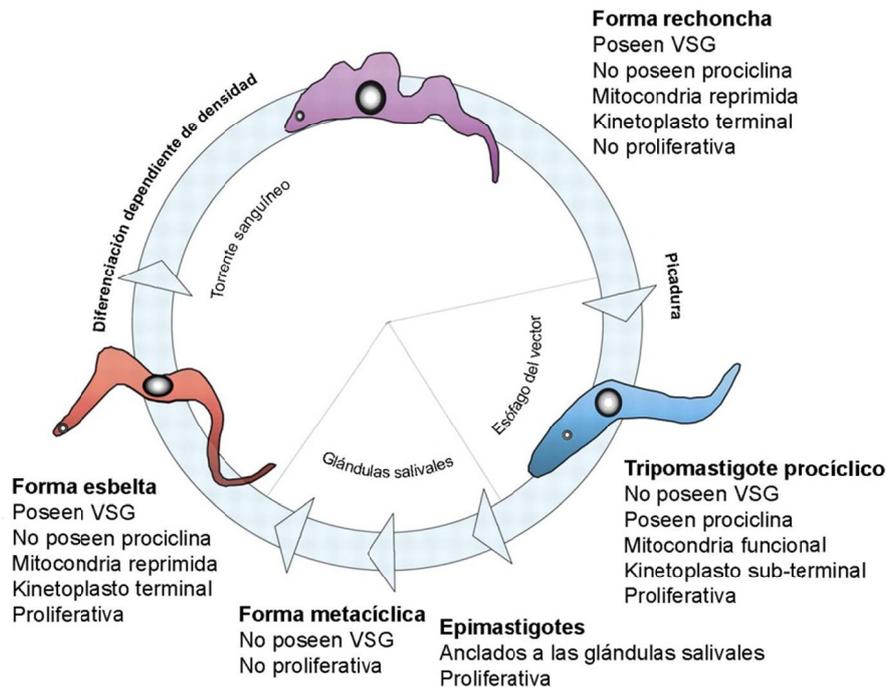


Figura A3. Esquema de las diferentes fases del ciclo de vida de *T. brucei*, adaptado de (Matthews 2005). En el torrente sanguíneo la forma sanguínea alargada (proliferativa) se diferencia a la forma sanguínea rechoncha (no proliferativa). Esta forma no proliferativa se encuentra pre-adaptada a la vida dentro del insecto vector. Cuando una mosca tse-tsé se alimenta de un mamífero infectado ingiere algunos parásitos de la forma rechoncha. En el intestino de la mosca estos parásitos se diferencian a tripomastigotes procíclicos (forma proliferativa). Una pequeña cantidad de tripomastigotes procíclicos migran a las glándulas salivales del insecto, donde primero se diferencian a epimastigotes y finalmente a la forma metacíclica. Esta última forma se encuentra pre-adaptada al huésped mamífero, y es la encargada de establecer la infección en un nuevo huésped.

A.2.3. Ciclo celular

El ciclo celular de *T. brucei* se compone de las cuatro fases que encontramos en la mayoría de eucariotas (G1, S, G2 y M), aunque sus características celulares le llevan a tener una serie de peculiaridades únicas de este organismo. En primer lugar, encontramos gran cantidad de orgánulos que se encuentran en una sola copia, tales como la mitocondria, el cuerpo basal, el flagelo o el aparato de Golgi. Dichos orgánulos tienen que dividirse y distribuirse correctamente antes de la citocinesis. En segundo lugar, existen dos puntos de información genética que tienen que duplicarse: el núcleo y

el kinetoplasto (Hammarton 2007). Durante la fase G1 se da la duplicación del cuerpo basal y se inicia el crecimiento de un nuevo flagelo, seguido de la duplicación del aparato de Golgi. La fase S del kinetoplasto comienza un poco antes que la del DNA nuclear, y al ser más corta, la división del kinetoplasto se completa antes de entrar en mitosis, dando lugar a células con 1 núcleo y 2 kinetoplastos (1N2K) (Woodward and Gull 1990). La división del kinetoplasto esta mediada por la segregación del cuerpo basal, al cual se encuentra fuertemente unido.

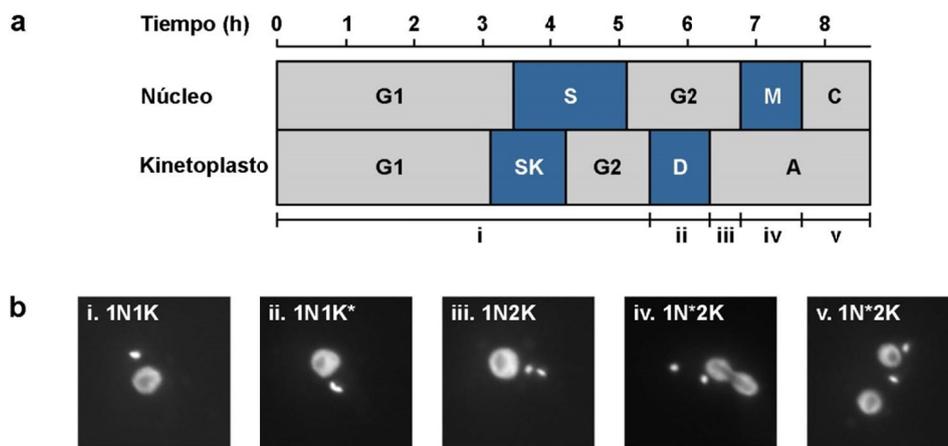


Figura A4. Diagrama del ciclo celular de *T. brucei*. (a) El ciclo de división de núcleo y kinetoplasto siguen pautas diferentes a lo largo del ciclo celular. La replicación del kinetoplasto (SK) se inicia antes y tiene menor duración que la nuclear (S). En consecuencia, la segregación de los kinetoplastos ocurre durante la fase G2 nuclear. A continuación se produce la mitosis nuclear (M), que tras concluir da paso a la citocinesis (C). La fase A del kinetoplasto corresponde al momento durante el cual los cuerpos basales cambian de posición dentro del parásito. (b) Tinción con DAPI del núcleo y el kinetoplasto de células procíclicas de *T. brucei* para ilustrar los diferentes estadios por los que pasa el parásito durante el ciclo celular. En cada imagen se marca el número de núcleos (N, núcleo normal; N*, núcleo en división) y kinetoplastos (K, kinetoplasto normal; K*, kinetoplasto en división) que posee la célula en ese momento del ciclo.

La mitosis en *T. brucei* es cerrada, de modo que la envoltura nuclear no se disgrega durante el proceso, y tanto el cinetocoro como los microtúbulos se forman dentro de ella (Zhou et al. 2014). El genoma de *T. brucei* posee 22 megacromosomas (mayores de 1 Mbp) y un número indeterminado de cromosomas intermedios (200 - 500 kbp) y minicromosomas (50 - 150 kbp) que suman en torno a 120 cromosomas. Sin

embargo el número de microtúbulos polo a polo que se forma parece demasiado pequeño para permitir interacciones microtúbulo-cinetocoro individuales para segregarse tal número de cromosomas. Se ha propuesto un modelo de “apilado lateral” mediante el cual los cromosomas más pequeños migran de manera lateral a lo largo de los microtúbulos interaccionando con ellos directamente, mientras que los más grandes interaccionan de forma normal mediante el cinetocoro (Ogbadoyi et al. 2000). Por último, la célula resultante, que contiene 2 núcleos y 2 kinetoplastos (2N2K), sufre la citocinesis. Durante esta etapa surge el surco de división a lo largo del eje longitudinal de la célula, y la mitocondria se divide en dos. La separación de las dos células hijas ocurre unidireccionalmente desde la parte anterior a la posterior del surco de división y pasando entre los dos flagelos para dar lugar a dos células hijas con la misma dotación orgánica y genética (1N1K) (Zhou et al. 2014).

A.3. LA DESAMINACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS Y SU METABOLISMO

Todos los seres vivos se ven expuestos a factores ambientales y endógenos que provocan daños en el DNA, deteriorando y modificando la información almacenada. *T. brucei*, como parásito obligado, se ve especialmente expuesto a situaciones de estrés oxidativo y nitrosativo que comprometen la integridad genómica y, en última instancia, su supervivencia. La infección por *T. brucei* provoca una reacción inmune en el huésped mamífero que comienza con la activación de la respuesta inmune innata. Durante esta fase, los macrófagos del huésped producen grandes cantidades de la óxido nítrico sintasa inducible (iNOS, *inducible nitric oxide synthase*), una enzima que les permite secretar óxido nítrico (NO) al medio (Mabbott et al. 1998). El NO y sus derivados resultan citotóxicos (Nguyen et al. 1992; Sawa and Ohshima 2006), y tienen como objetivo evitar la proliferación del parásito. Entre los diversos daños que producen cabe destacar la desaminación de bases en DNA. Dicha desaminación se produce principalmente sobre citosina y adenina, que pasan a formar uracilo e hipoxantina,

respectivamente. Conocer los mecanismos que utiliza el parásito contra este tipo de daños es fundamental a la hora de establecer estrategias que nos permitan eliminar al patógeno.

La reparación de uracilo e inosina (nucleósido de hipoxantina) depende principalmente de la ruta de reparación por escisión de bases (BER, *base excision repair*), que será descrita en detalle más adelante. Esta ruta es iniciada por glicosilasas específicas que reconocen la lesión y escinden la base desaminada mediante la rotura del enlace N-glucosídico. En *T. brucei* existe una única enzima con actividad uracil-DNA glicosilasa (UNG). Estudios realizados en nuestro laboratorio demuestran que la depleción de esta enzima provoca un incremento de la tasa de mutación espontánea, con predominio de las transiciones G:C>A:T (Castillo-Acosta et al. 2012). Por otro lado, en la mayor parte de organismos una enzima del tipo alquiladenina-DNA glicosilasa es la encargada de iniciar BER para reparar la inosina (Brooks et al. 2013). No obstante, hasta la fecha no se ha descrito ninguna enzima con esta actividad en *T. brucei*. En procariotas, la endonucleasa V (EndoV) conforma una ruta de reparación alternativa capaz de eliminar uracilo e inosina del DNA. En eucariotas, sin embargo, parece actuar sobre inosina preferentemente en RNA. Se postula, por tanto, como una enzima involucrada en el metabolismo de bases desaminadas en ácidos nucleicos que podría tener un papel relevante en la supervivencia de *T. brucei*.

A.3.1. Causas y consecuencias biológicas de la presencia de inosina en DNA y RNA

A.3.1.1. Desaminación *in situ* de adenina

Tres de las bases nitrogenadas que componen los ácidos nucleicos (citosina, adenina y guanina) poseen un grupo amino exocíclico, y son susceptibles de sufrir desaminación. La desaminación de adenina es un proceso relativamente frecuente que puede darse de forma espontánea o inducida por agentes químicos. En células de mamíferos se calcula que entre 4 y 6 adeninas sufren desaminación cada día. En

condiciones fisiológicas el grupo amino de la adenina puede sufrir hidrólisis espontánea, o puede ser oxidado por agentes intrínsecos del metabolismo celular, tales como las especies reactivas de oxígeno, provocando la aparición de inosina en cantidades limitadas (Karran and Lindahl 1980; Lindahl 1993).

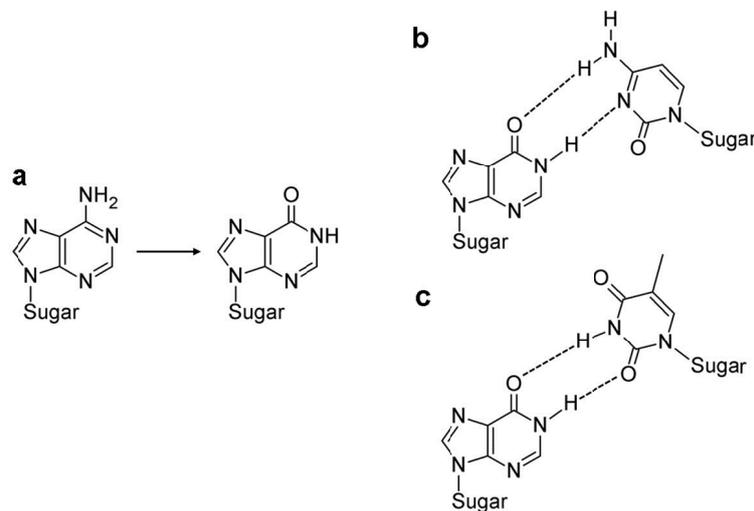


Figura A5. Desaminación de la adenina. (a) La adenina se constituye en inosina al perder el grupo amino exocíclico. (b) Cuando es incorporada durante la replicación, la inosina aparea preferentemente con citosina formando pares I:C. (c) Si la desaminación de la adenina se da *in situ* el resultado es la formación de pares I:T.

Sin embargo, la mayor parte de las desaminaciones de adenina son inducidas por factores extrínsecos al metabolismo celular normal, en especial por el óxido nítrico (NO) y sus derivados. Como ya hemos comentado anteriormente, este compuesto es producido en grandes cantidades por la iNOS en macrófagos activados durante procesos inflamatorios e infecciosos (Dedon and Tannenbaum 2004). El NO se oxida para formar anhídrido nitroso (N₂O₃), el cual reacciona con la adenina, sustituyendo el grupo amino por un grupo hidroxilo (Burney et al. 1999). Se ha demostrado que células expuestas a NO presentan hasta cuarenta veces más inosina en DNA que células normales (Nguyen et al. 1992).

A.3.1.2. Incorporación de inosina durante la replicación y la transcripción

La segunda vía para la aparición de inosina en DNA y RNA es la incorporación errónea de dITP e ITP durante la replicación y la transcripción, respectivamente. La desaminación de bases no solo ocurre *in situ* en ácidos nucleicos, sino que también puede darse sobre los precursores que se utilizan durante la replicación y la transcripción. Así, la desaminación de las formas trifosfato de adenosina (ATP/dATP), guanosina (GTP/dGTP) y citosina (CTP/dCTP) dan lugar a los correspondientes nucleótidos trifosfato de inosina (ITP/dITP), xantosina (XTP/dXTP) y uridina (UTP/dUTP), respectivamente (O'Brien 2006). En condiciones normales, la inosina disponible en el interior celular representa una pequeña porción del *pool* de nucleótidos, ya que la inosina trifosfato (ITP) y la desoxinosina trifosfato (dITP) son hidrolizadas por la inosina trifosfato pirofosfatasa (ITPasa) a sus formas monofosfato (IMP y dIMP), para evitar su incorporación a RNA y DNA (Sakumi et al. 2010). En *Escherichia coli* y *Saccharomyces cerevisiae* se ha descrito que la eliminación de la IMP deshidrogenasa, la adenilsuccinato (SAMP) sintetasa y la ITPasa, tres enzimas claves en el metabolismo de purinas, provoca la expansión del *pool* de nucleótidos de inosina y como consecuencia la incorporación de inosina en RNA/DNA (Pang et al. 2012). La inosina es reconocida como guanina por las DNA/RNA polimerasas, que la insertan frente a citosina de forma preferente. Pese a que el par I:C forma puentes de hidrógeno estables, la inosina también puede ser incorporada frente a cualquiera de las otras tres bases: A, G y T (Yasui et al. 2008), aunque esto último es poco frecuente. De hecho, un estudio realizado en *E. coli* demuestra que la incorporación de inosina durante la replicación no induce un aumento en la tasa de mutación en este organismo (Budke and Kuzminov 2006). En cambio, si la inosina se ha generado *in situ* en el DNA como resultado de la desaminación de la adenosina, el resultado será una transición A:T>G:C. En un estudio llevado a cabo en linfoblastos humanos, la exposición a óxido nitroso provocó un aumento en los niveles de inosina en DNA y un incremento de 15 veces en la tasa de mutación (Nguyen et al. 1992).

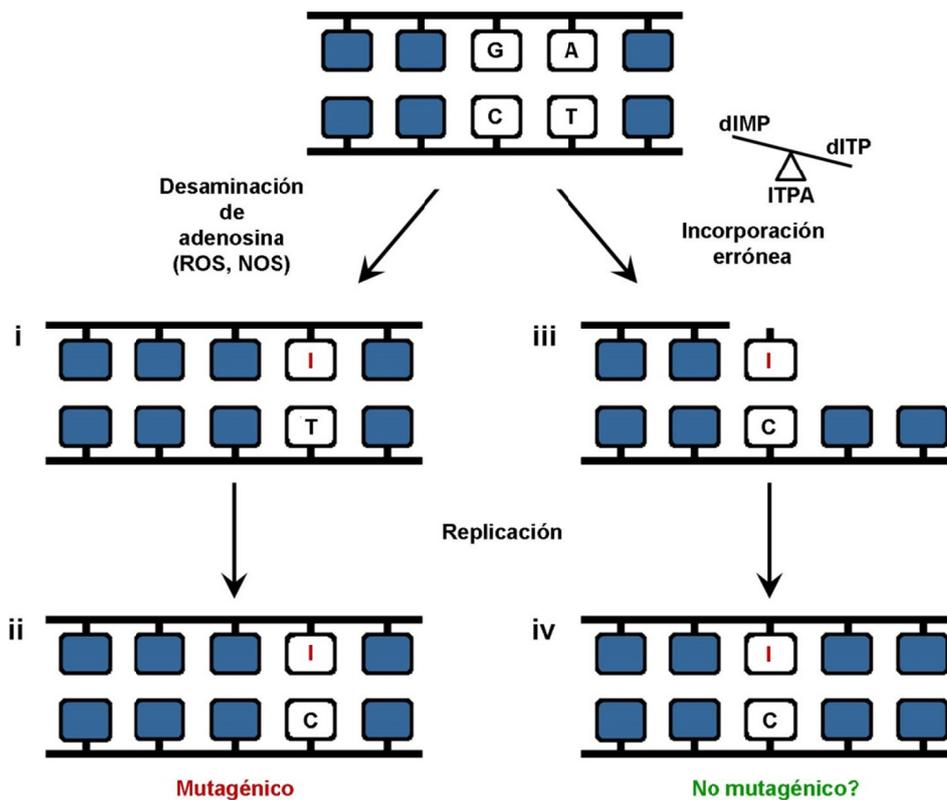


Figura A6. Capacidad mutagénica de la inosina. (i) La desaminación de la adenina *in situ* da lugar a inosina en pares I:T. La preferencia de la inosina por aparear con citosina hace que tras una ronda de replicación se produzcan transiciones A:T>G:C (ii). La desaminación de precursores del DNA provoca un alto ratio dITP/dIMP, lo que desemboca en la incorporación errónea de inosina durante la síntesis de DNA en forma de pares I:C (iii). Durante la replicación la inosina seguirá apareando de forma preferencial con citosina (iv), sin consecuencias significativas sobre la tasa de mutación.

A.3.1.3. Edición de adenina en RNA

Los procesos de edición se dan mayoritariamente en RNA mensajero y transferente, mientras que el ribosómico raramente es editado. La edición de RNA mensajero (mRNA) mediante la desaminación de adenina resulta en la recodificación de la información genética y la adición o eliminación de sitios de *splicing* y codones de stop. Esto provoca cambios en la secuencia de amino ácidos de la proteína naciente y es una fuente de diversidad funcional (Nishikura 2010). No obstante, cabe destacar que la mayor parte de desaminaciones de la adenina se da en regiones no codificantes, regiones no traducidas (UTRs) e intrones. Aún no se conoce con exactitud el significado biológico de esto se especula con su posible implicación en la estabilización de

transcritos, así como en la regulación de la expresión de genes mediante RNA de interferencia y microRNAs (Nishikura 2006).

La edición de mRNA mediante la desaminación de adenina la llevan a cabo las adenosina desaminasas que actúan sobre RNA (ADAR, *adenosine deaminases that act on RNA*). Estas enzimas catalizan la conversión de adenosina a inosina en RNA de cadena doble, y han sido descritas únicamente en metazoos, no encontrándose en plantas, hongos, levaduras ni tampoco en tripanosomátidos (Jin et al. 2009).

Por su parte, la edición de RNA de transferencia (tRNA) implica principalmente la aparición de una gran variedad de bases modificadas (Limbach et al. 1994). Entre ellas cabe destacar la inosina, cuya producción está catalizada por adenosina desaminasas que actúan sobre tRNA (ADAT, *adenosine deaminases that act on tRNA*). La inosina puede surgir como modificación postranscripcional en las posiciones 34, 37 y 57 del tRNA. La inosina en posición 57 sólo se ha observado en arqueas, y su función aún no se conoce (Grosjean et al. 1995). La desaminación de la adenina 37 afecta a la estructura del anticodón, alterando de forma significativa la interacción codón:anticodón (Cantara et al. 2012). Sin duda, la modificación más relevante es la inosina que aparece en la posición 34, también conocida como *wobble position*, y que se corresponde con el primer nucleótido del anticodón en el tRNA. La flexibilidad que presenta la inosina en esta posición a la hora de aparear con otra base le permite establecer uniones a adenina, citosina y uracilo durante el reconocimiento codón:anticodón (Crick 1966; Leonard et al. 1992). Esto posibilita ampliar la cantidad de codones que un único tRNA puede reconocer, a la vez que limita el número de especies de tRNA necesarias (Novoa et al. 2012). De hecho, los tRNAs que contienen adenina en la posición 34 no suelen coexistir en el genoma con tRNAs que contienen guanina en esa misma posición, lo cual sugiere que la lectura de los codones terminados en citosina por tRNAs depende de la presencia de inosina en la posición 34 (Grosjean et al. 2010).

Si bien es cierto que no encontramos proteínas ADAR en *T. brucei*, sí existen enzimas ADAT (Rubio et al. 2007). Estas proteínas se encuentran en casi todos los

organismos descritos, y parecen ser el precursor evolutivo de las proteínas ADAR (Keller et al. 1999). Se ha descrito que son capaces de desaminar adenina en las posiciones 37 y 34 de un tRNA, siendo la desaminación en posición 34 esencial para la supervivencia (Gerber et al. 1998; Gerber and Keller 1999). En *T. brucei*, así como en la mayoría de eucariotas, la adenina 34 es desaminada por una enzima heterodimérica formada por ADAT2 y ADAT3 (ADAT2/3). La depleción de ADAT2 deriva en una disminución de los niveles de edición de adenina, y resulta letal para la viabilidad del parásito (Rubio et al. 2007). En *T. brucei* hay hasta ocho anticodones diferentes (alanina, arginina, isoleucina, leucina, prolina, serina, treonina y valina) cuya primera posición es una adenina susceptible de ser desaminada. En el código genético la treonina está representada por cuatro codones: ACU, ACA, ACG y ACC. Se ha observado que los tRNAs isoaceptores para los tres primeros codones se encuentran codificados en el genoma de *T. brucei*: AGU, UGU y CGU. Sin embargo, no encontramos el correspondiente al codón ACC, y se piensa que *T. brucei* lee este codón utilizando la versión editada del anticodón AGU (IGU), cuya inosina se comportaría como una guanosina. De hecho, estudios de secuenciación han demostrado que aunque el anticodón GGU no se encuentra en el genoma de *T. brucei*, sí lo encontramos cuando analizamos la población de tRNAs (Rubio et al. 2006).

Según estudios recientes, la desaminación de citosina en posición 32 catalizada por el complejo ADAT2/3 es dependiente de la metilación previa de esta base por la metiltransferasa TRM140, dando lugar en último término a la formación de m³U (Rubio et al. 2017). A su vez, la formación de m³C in vitro por TRM140 está condicionada a la presencia de ADAT2/3, cuya interdependencia parece estar basada en una interacción directa.

A.3.2. Mecanismos de eliminación de inosina del DNA

La inosina presente en el DNA es eliminada principalmente mediante la ruta de reparación por escisión de bases (BER). Esta ruta se inicia por una DNA glicosilasa, que reconoce la base dañada en la cadena de DNA e hidroliza el enlace N-glucosídico,

escindiendo la base. El sitio abásico (AP) que produce la glicosilasa es sustrato para una AP endonucleasa, que cataliza la hidrólisis del enlace fosfodiéster en 5' del sitio AP y genera una rotura en la cadena que deja un extremo 3'-hidroxilo y una desoxirribosa fosfato (dRP) en el extremo 5' (Lindahl 1993; Krokan and Bjoras 2013). Existen dos vías de reparación BER (corta o larga) dependiendo del número de nucleótidos que se reemplacen. Mediante la vía corta un único nucleótido es reparado por la acción consecutiva de una DNA polimerasa/dRPasa (Pol β) y una DNA ligasa (LIG1/3) (Hanssen-Bauer et al. 2011). La reparación por la vía larga requiere de la acción de polimerasas replicativas que sintetizan una nueva cadena de entre 2 y 13 nucleótidos. A continuación, la cadena desplazada se elimina por la acción de una endonucleasa (FEN1), y la reparación concluye cuando una ligasa sella la cadena (LIG1) (Svilar et al. 2011). En la mayoría de procariontes y eucariotes se ha descrito que una alquiladenina-DNA glicosilasa (AlkA en *E. coli*; MAG en *S. cerevisiae*; Aag en mamíferos) es la responsable de iniciar la eliminación de inosina en DNA (Saparbaev and Laval 1994; Engelward et al. 1997). En otros organismos, como *Schizosaccharomyces pombe*, una timina-DNA glicosilasa es la encargada de llevar a cabo esta función (Hardeland et al. 2003). Sin embargo, ninguna de estas enzimas están presentes en el genoma de *T. brucei*, lo que sugiere que rutas de reparación alternativas deben estar actuando para evitar la acumulación de inosina en DNA. En múltiples organismos se ha descrito que la endonucleasa V (EndoV), cuyas características y mecanismo de acción serán descritos más adelante, inicia una ruta de reparación alternativa capaz de eliminar inosina en DNA. Brevemente, EndoV reconoce la lesión y cataliza la rotura del segundo enlace fosfodiéster en 3' de la lesión (Yao and Kow 1994). Aunque la cascada enzimática que sigue a la actividad de EndoV aún no está clara, experimentos *in vitro* demuestran que la actividad 3'>5' exonucleasa de la DNA polimerasa I sería suficiente para eliminar una pequeña porción de la cadena dañada. Finalmente, la hebra de DNA sería resintetizada por la misma DNA polimerasa I, y sellada por la acción de una ligasa (Lee et al. 2010).

A.4. ENDONUCLEASA V

EndoV fue descubierta en 1977 en *E. coli* como una enzima con actividad endonucleasa capaz de procesar uracilo en DNA (Gates and Linn 1977). Fue nombrada endonucleasa V por ser la quinta endonucleasa que se describía en *E. coli*. Años más tarde se estableció la desoxinosina como su principal sustrato (Yao et al. 1994). EndoV es una proteína altamente conservada desde bacterias hasta mamíferos capaz de reconocer un amplio abanico de sustratos. Sin embargo, mientras que en procariontes parece estar iniciando una ruta de reparación alternativa capaz de procesar uracilo e inosina en DNA, en organismos eucariotas estaría involucrada en el procesamiento de inosina en RNA (Kuraoka 2015).

A.4.1. Especificidad de sustrato

Se ha descrito un amplio rango de sustratos susceptibles de ser procesados por EndoV. La primera caracterización bioquímica se hizo en *E. coli*, donde inicialmente fue descrita como una enzima capaz de eliminar desoxiuridina del DNA (Gates and Linn 1977; Demple and Linn 1982). Más tarde, EndoV fue caracterizada como una endonucleasa capaz de procesar desoxinosina, y desde entonces esta lesión se ha considerado su principal sustrato (Yao et al. 1994). Posteriormente, se le ha atribuido un amplio abanico de sustratos a la enzima bacteriana: desoxixantosa (Yao and Kow 1997), residuos de urea y sitios abásicos (Yao et al. 1994; Yao and Kow 1994) así como inserciones/deleciones, estructuras en lazo y pseudo-Y (Yao and Kow 1996). Además, tanto en *E. coli* como en *Salmonella typhimurium* se ha demostrado que EndoV reconoce apareamientos erróneos entre bases canónicas (Yao and Kow 1994; Feng et al. 2005). Por otro lado, la enzima de *Thermotoga maritima* posee, además de actividad endonucleasa, actividades 3'>5' exonucleasa dependiente de la presencia de inosina y 5'>3' exonucleasa inespecífica (Mi et al. 2011).

En arqueobacterias, EndoV posee un rango más limitado de sustratos. La desoxinosina sigue siendo el principal sustrato, y el único descrito en el caso de *Archaeoglobus fulgidus* (Liu et al. 2000). Cabe destacar que la enzima de

Ferroplasma acidarmanus, que se encuentra fusionada a una O⁶-alquilguanina alquiltransferasa, también procesa desoxixantósina y desoxiuridina en DNA (Kanugula et al. 2005). En general, las EndoV en procariotas muestra una actividad significativa sobre lesiones en DNA, y su implicación en reparación es ampliamente aceptada. No obstante, estudios recientes demuestran que las EndoV de *E. coli* y *Pyrococcus furiosus* son capaces de procesar inosina en RNA con la misma eficiencia que en DNA (Vik et al. 2013; Kiyonari et al. 2014). Esta observación abre las puertas a un posible papel en metabolismo de RNA también para las enzimas procarióticas.

En eucariotas, los estudios en modelos unicelulares se han visto obstaculizados hasta la fecha por la ausencia de EndoV en *S. cerevisiae*. En cambio, se ha llevado a cabo la caracterización de los ortólogos de EndoV en humanos (hEndoV) y en ratón (mEndoV). En ambos casos la inosina en RNA es el sustrato preferido, sin embargo ambas enzimas se muestran poco eficientes cuando la lesión se encuentra en DNA, con actividades muy inferiores a las observadas en las enzimas procarióticas (Moe et al. 2003; Mi et al. 2012). Adicionalmente se ha observado que hEndoV también es capaz de procesar desoxixantósina, aunque la eficiencia catalítica con este sustrato es incluso menor que la mostrada con la desoxinosina (Mi et al. 2012). En mamíferos, todo apunta a que ha habido una especialización de EndoV hacia el procesamiento de inosina en RNA. Sobre este tipo de sustratos, hEndoV presenta una eficiencia catalítica mayor que la de *E. coli* (Morita et al. 2013; Vik et al. 2013; Nawaz et al. 2016b), siendo capaz de procesar la inosina tanto en sustratos de cadena sencilla como de cadena doble. hEndoV también muestra actividad significativa sobre sustratos que mimetizan moléculas de tRNA y sobre híbridos RNA:DNA si la inosina se localiza en la cadena de RNA. Los datos bioquímicos junto con su localización citoplasmática (Morita et al. 2013; Nawaz et al. 2016a), apuntan a una probable implicación en el metabolismo del RNA.

A.4.2. Estructura y mecanismo catalítico de la endonucleasa V

La estructura de la EndoV ha sido resuelta en *T. maritima*, *E. coli*, *Mus musculus* y *Homo sapiens* (Dalhus et al. 2009; Zhang et al. 2014; Zhang et al. 2015; Nawaz et al.

2016b). EndoV es una proteína $\alpha\beta$, con una estructura central de láminas β formada por 8 cadenas paralelas y antiparalelas, flanqueadas a ambos lados por estructuras α -hélice (Dalhus et al. 2009). La proteína además presenta un motivo característico de la familia ribonucleasa H, que comprende enzimas involucradas en el metabolismo de ácidos nucleicos y que participan en procesos tales como replicación, reparación de DNA, recombinación homóloga e interferencia por RNA (Majorek et al. 2014). EndoV se une al surco menor del DNA y distorsiona la cadena de modo que el nucleótido desaminado se introduce en el sitio de unión de la enzima. El reconocimiento de la hipoxantina se basa en una serie de contactos polares entre residuos de la enzima y la base desaminada, aunque el mecanismo exacto aún no se conoce. Dentro del sitio de unión, cada lado de la base interacciona mediante fuerzas de van der Waals con residuos hidrofóbicos, tales como las leucinas conservadas en las posiciones 85 y 142 en la EndoV de *T. maritima* (Dalhus et al. 2009). Teniendo esto en cuenta es posible que la mayor superficie de interacción que presentan las purinas sea la razón por la cual son un mejor sustrato que las pirimidinas. Por otro lado, se ha demostrado que EndoV también es capaz de introducir bases no desaminadas en el bolsillo de unión, aunque únicamente si provocan la distorsión de la doble cadena de DNA como en el caso de apareamientos erróneos (Rosnes et al. 2013). EndoV cataliza la hidrólisis del segundo enlace fosfodiéster en 3' de la lesión (Yao et al. 1994). Este corte tan peculiar se explica por la gran cantidad de residuos que se interponen entre el sitio catalítico y el de unión al sustrato, entre los cuales se forma una barrera física (Dalhus et al. 2009).

Un alineamiento de la Endo V de diferentes organismos muestra una alta conservación de aquellos residuos que son esenciales para la catálisis. Estudios estructurales y de mutagénesis de la EndoV de *T. maritima* han permitido establecer la función de muchos de los residuos implicados en catálisis. La tirosina en posición 80 es invariable entre organismos y forma parte del motivo prolina-tirosina-isoleucina-prolina (posiciones 79-82), que reconoce distorsiones en la cadena de DNA y actúa a modo de cuña para separar las cadenas de DNA, además de contribuir a la estabilidad del complejo enzima-sustrato (Dalhus et al. 2009; Rosnes et al. 2013).

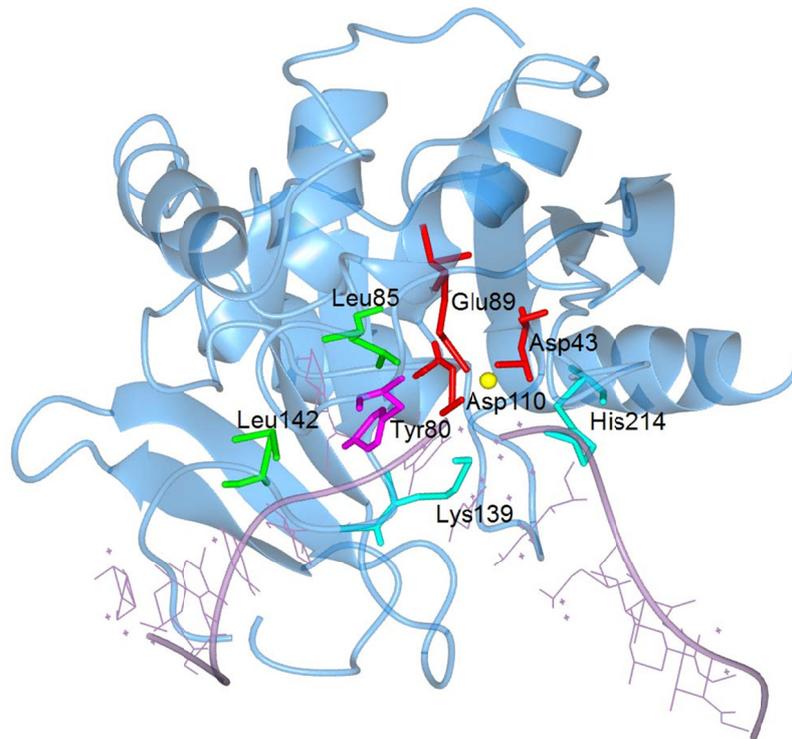


Figura A7. Estructura de la endonucleasa V de *T. maritima* en complejo con DNA (Dalhus et al. 2009). Plegamiento y estructura cuaternaria de la endonucleasa V de *T. maritima* en complejo con una cadena de DNA. Se señalan los principales residuos implicados en la actividad catalítica de la enzima: interacción con el sustrato (Leu85 y Leu142), reconocimiento de la lesión y estabilización del complejo enzima-sustrato (Tyr80), unión al cofactor metálico (Mg^{2+} , esfera amarilla) y coordinación de la hidrólisis (Asp43, Glu89 y Asp110), interacción con el producto (Lys139 y His214).

La actividad endonucleasa de EndoV depende de la presencia de un catión divalente metálico, preferentemente Mg^{2+} o Mn^{2+} (Yao et al. 1994). Durante la hidrólisis, los grupos carboxilo del motivo aspartato-glutamato-aspartato (D43-E89-D110) se encargan de coordinar el cofactor metálico (Huang et al. 2001; Huang et al. 2002). Tras la incisión, los extremos 3' y 5' del producto de reacción quedan fuertemente unidos al ion metálico, la lisina 139 (K139) y la histidina 214 (H214). Esta unión tan firme entre el producto y la enzima sugiere que se produce una transferencia coordinada del intermediario de reparación a la siguiente enzima de la ruta (Dalhus et al. 2009). Los determinantes estructurales por los que las enzimas eucarióticas actúan preferentemente sobre RNA mientras que las procarióticas pueden procesar DNA y RNA con eficiencia similar, aún no se conocen. El sitio activo es similar en ambos tipos

de enzimas, y la diferencia debe residir en el reconocimiento del sustrato. Un estudio realizado con la EndoV humana indica que en sustratos de DNA, la presencia de un ribonucleótido en 3' de la inosina los hace susceptibles de ser procesados por EndoV (Morita et al. 2013; Vik et al. 2013). Esto sugiere que la presencia del grupo 2'-hidroxilo en esa posición es crítico para la actividad de la enzima eucariota. El análisis de la estructura de EndoV en complejo con RNA permitirá descifrar como se lleva a cabo la interacción enzima-sustrato.

La actividad endonucleasa de EndoV no permite la eliminación completa de la lesión que reconoce, por lo que otras enzimas aún no identificadas deben actuar a continuación. Como ya se ha mencionado antes, la alta afinidad con la que EndoV permanece unida al producto de la reacción sugiere que probablemente su actividad está coordinada en un complejo con el resto de enzimas de la ruta. Teóricamente, la eliminación de tan sólo dos nucleótidos sería suficiente para completar la reparación. Sin embargo, en *E. coli* se ha observado que tras la actividad endonucleasa de EndoV hasta tres nucleótidos son eliminados del extremo 3' y dos del extremo 5' (Weiss 2008). Una posible explicación es que la propia EndoV elimine estos nucleótidos tras la incisión. En apoyo de esta hipótesis, se ha descrito que la enzima de *T. maritima* tiene asociada una actividad 3'>5' exonucleasa dependiente de la presencia de inosina, así como una actividad 5'>3' exonucleasa inespecífica (Mi et al. 2011). En este modelo, la actividad de una DNA polimerasa y una DNA ligasa completarían la reacción de reparación. No obstante, la actividad exonucleasa no se ha observado en EndoVs de otros organismos. En el caso de *E. coli* se ha conseguido reconstituir la ruta de reparación alternativa de inosina *in vitro* mediante la actividad endonucleasa de EndoV y las actividades exonucleasa y polimerasa de la DNA polimerasa I que finaliza la escisión de la base dañada y resintetiza la cadena de DNA. Finalmente la cadena se sella mediante la DNA ligasa I (Lee et al. 2010).

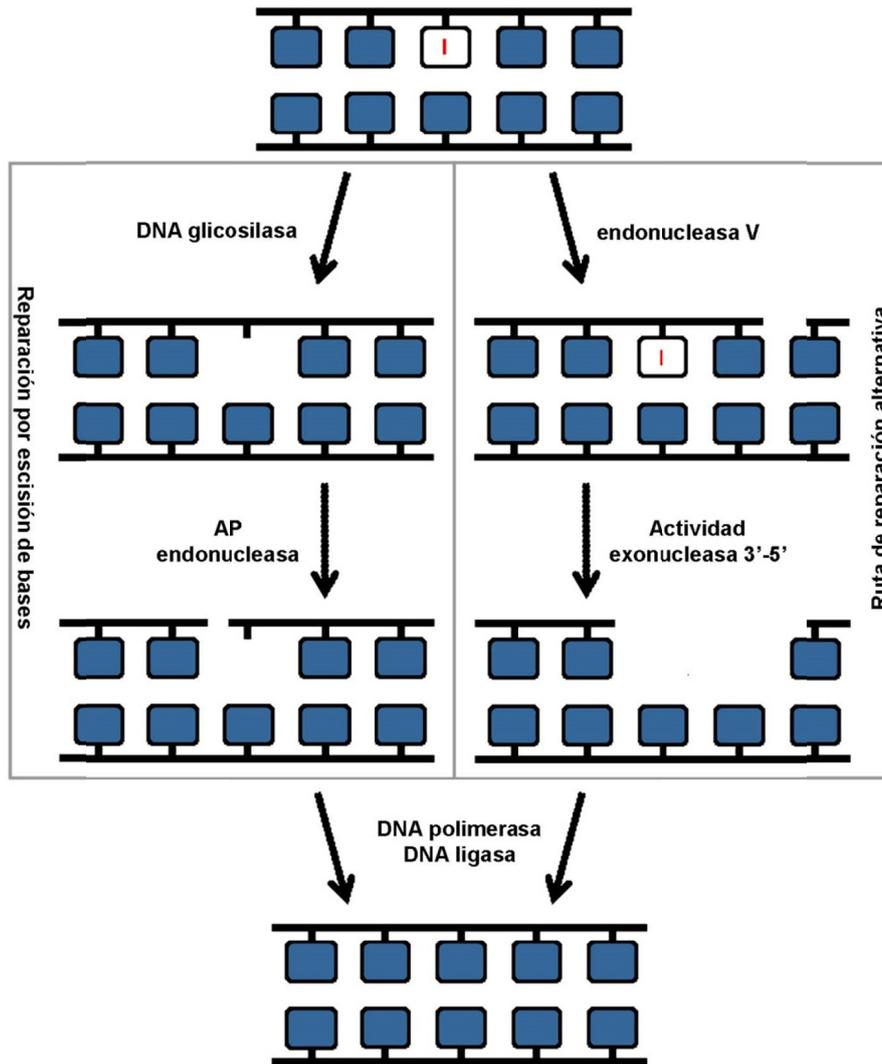


Figura A8. Rutas de reparación para la eliminación bases desaminadas en DNA. La reparación por escisión de bases (izquierda) es la principal ruta para la eliminación de bases desaminadas. Es iniciada por una DNA glicosilasa que escinde la base dañada y deja un sitio abásico. Tras ella, una AP endonucleasa hidroliza el enlace fosfodiéster en 5' del sitio abásico. Finalmente la acción de una DNA polimerasa, seguida de una DNA ligasa, reconstituye la cadena. Endonucleasa V inicia una ruta de reparación alternativa (derecha) al hidrolizar el segundo enlace fosfodiéster en 3' de la base desaminada. La cascada de enzimas que sigue a continuación aún no se ha identificado, aunque parece probable que una enzima con actividad 3'>5' exonucleasa degrade parte de la cadena que a continuación será reconstituida por la acción de una DNA polimerasa seguida de una DNA ligasa.

A.4.3. Función celular de la Endonucleasa V: papel en el metabolismo de DNA y de RNA

Tras establecer en ensayos de actividad *in vitro* su espectro de sustratos potenciales, las endonucleasas V bacterianas se han asociado principalmente con un papel en la reparación de daños en el DNA (Gates and Linn 1977). Los análisis mediante genética reversa y espectros de mutación realizados en *E. coli* pusieron de manifiesto que una deficiencia en EndoV sensibiliza a las células a los daños producidos por óxido nítrico (Guo and Weiss 1998), con un significativo aumento de las transiciones A:T>G:C y G:C>A:T (Schouten and Weiss 1999; Weiss 2001). Las transiciones A:T>G:C son probablemente el resultado de la desaminación de la adenina a hipoxantina que, como ya se ha descrito, apareca con citosina durante la replicación. Por otro lado, las transiciones G:C>A:T suelen ocurrir como consecuencia de la desaminación de citosina a uracilo. Estudios realizados en *Bacillus subtilis* muestran que la delección de EndoV por sí sola o junto con UNG incrementa considerablemente la tasa de mutación en presencia de bisulfito sódico, un agente que desamina citosina específicamente, lo que sugiere la implicación de esta EndoV bacteriana en la reparación de uracilo en pares U:G (Lopez-Olmos et al. 2012).

En el caso de las enzimas eucarióticas, no existen hasta el momento evidencias directas de su implicación en rutas de reparación de DNA. Por el contrario, las EndoV eucarióticas procesan la inosina muy eficientemente cuando ésta se encuentra en una cadena de RNA (Moe et al. 2003; Morita et al. 2013; Vik et al. 2013), lo que sugiere que estas EndoVs posiblemente están jugando un papel en metabolismo de RNA. Esta función no se puede descartar en procariotas, donde EndoV también muestra una actividad significativa sobre sustratos de RNA (Vik et al. 2013; Kiyonari et al. 2014).

La localización subcelular de EndoV se ha estudiado en células humanas mediante la expresión de proteínas fusionadas a epítomos que permiten su detección mediante anticuerpos específicos. Inicialmente se situó a EndoV tanto en el citoplasma como en el núcleo, dentro del cual se distribuye a lo largo del nucleolo, donde

colocaliza con la proteína nucleolar fibrilarina (Fladeby et al. 2012). En un estudio posterior se observó una distribución uniforme en el citoplasma de la célula, descartándose su localización nuclear (Morita et al. 2013). En todos los casos su presencia en el citoplasma parece inequívoca, lo que apoya su posible implicación en el procesamiento de RNA. Además, estudios recientes apuntan a que la localización subcelular de EndoV puede depender de factores exógenos. Se ha visto que en células sometidas a estrés nutricional, EndoV relocaliza en gránulos de estrés (SG, *stress granules*), donde colocaliza con la proteína de unión a poliadenilato (PABPC1) (Nawaz et al. 2016a). PABPC1 está implicada en la biosíntesis de proteínas, la estabilización de RNA mensajero y la biogénesis de ribosomas (Gorlach et al. 1994), y los resultados indican que establece una interacción física con EndoV mediada por RNA (Nawaz et al. 2016a).

Los SG son agregados proteicos transitorios que se forman en respuesta a situaciones de estrés durante las cuales se produce una parada de la transcripción. Una de sus funciones principales es almacenar transcritos de RNA y complejos de transcripción en pausa, así como multitud de proteínas implicadas en metabolismo de RNA, hasta que se restauren las condiciones normales (Buchan and Parker 2009). En *T. brucei*, los SG se han observado en la forma procíclica, que se ve sometida a fuertes situaciones de estrés nutricional en el interior del insecto vector.

OBJETIVOS

B. OBJETIVOS

El mantenimiento de la integridad genómica es fundamental para la supervivencia de los organismos y la continuidad de las especies. La desaminación de bases en ácidos nucleicos es una de las lesiones más comunes cuyo resultado es la aparición de inosina y uracilo en DNA y RNA. Aunque la reparación por escisión de bases es la principal ruta encargada de eliminar este tipo de daños en el DNA, se han descrito vías de reparación alternativas, como la iniciada por la endonucleasa V (EndoV). No obstante, mientras que en procariontes EndoV actúa en la reparación de bases desaminadas en DNA, el ortólogo de mamíferos parece estar implicado en procesos metabólicos relacionados con el RNA.

T. brucei, como parásito extracelular obligado, se ve expuesto al estrés oxidativo generado durante la infección por las defensas del huésped. Las enzimas implicadas en el mantenimiento de la integridad genética son esenciales para su supervivencia, y conocerlas en profundidad nos puede ayudar a desarrollar estrategias contra la enfermedad. Esta tesis se ha centrado en descifrar el papel biológico de una de estas enzimas, la endonucleasa V de *T. brucei* (*TbEndoV*). Con este fin se plantearon los siguientes objetivos:

1. Establecer la actividad enzimática de *TbEndoV* frente a diversos tipos de lesiones, principalmente uracilo e inosina, en sustratos de DNA y RNA.
2. Determinar el impacto de *TbEndoV* en la proliferación y supervivencia de células procíclicas y sanguíneas de *T. brucei*.
3. Investigar la relevancia de *TbEndoV* en el establecimiento de la infección en un modelo murino.
4. Estudiar el posible papel de *TbEndoV* frente a agentes genotóxicos que promueven la incorporación de bases desaminadas en ácidos nucleicos.

5. Describir la localización subcelular de EndoV en células procíclicas de *T. brucei* en condiciones fisiológicas y de estrés nutricional. Determinar el grado de colocalización con otras proteínas que se localizan en gránulos de estrés.

MATERIALES Y MÉTODOS

C. MATERIALES Y MÉTODOS

C.1. MATERIALES

C.1.1. Líneas celulares de *Trypanosoma brucei*

En este trabajo se han utilizado parásitos pertenecientes a la especie *Trypanosoma brucei*, en concreto la subespecie *T. b. brucei* que causa la tripanosomiasis africana en animales, también conocida como “Nagana”. Los experimentos *in vitro* se han realizado con cultivos de tripomastigotes sanguíneos de la forma alargada (forma sanguínea) y tripomastigotes procíclicos (forma procíclica). Todos los parásitos utilizados en esta tesis son, o derivan, de las siguientes líneas celulares:

T. brucei 449 (forma procíclica) (PF) (Biebinger et al. 1997). Esta línea parental se cultiva en presencia de 0,5 µg/mL de fleomicina. A partir de esta línea celular se han generado aquellas que expresaban una copia ectópica de *TbEndoV* (PF/*TbEndoV*), o reducían su expresión mediante la técnica de RNA de interferencia (PF/RNAi).

T. brucei S16 (forma sanguínea) (BF) (Wirtz et al. 1999). El cultivo de esta línea parental se realiza en presencia de 2,5 µg/mL de G-418. Sobre esta línea se ha llevado a cabo la depleción de *TbEndoV* mediante doble reemplazo alélico (knock-out) (dKO), y la expresión de una copia ectópica (BF/*TbEndoV*).

T. brucei UNG-KO (UNG-KO) (forma sanguínea) (Castillo-Acosta et al. 2012). En esta línea se ha suprimido la expresión de UNG mediante doble reemplazo alélico. Su cultivo se realiza en presencia de 2,5 µg/mL de G-418, 5 µg/mL de higromicina y 5 µg/mL de blasticidina. Sobre esta línea se ha realizado la expresión de una copia ectópica de *TbEndoV* (UNG-KO/*TbEndoV*).

C.1.2. Cepas de *Escherichia coli*

XL1-Blue (Bullock 1987) *Rec A1, end A1, gyr A96, thi-1, hdsR17, supE44, relA1, lac* [F'*proAB lacI^q ZΔM15 Tn10* (Tet^r)].

BL21(DE3) (Phillips et al. 1984) F⁻ *dcm, ompT, hsdS (r_B⁻ m_B⁻)gal λ* (DE3).

TB1 (Phillips et al. 1984) F⁻ *ara Δ(lac-proAB) [φ80dlac Δ(lacZ)M15] rpsL(Str^R) thi hsdR*.

C.1.3. Medios de cultivo

SDM-79. Este medio se utiliza para el cultivo *in vitro* de parásitos tripomastigotes procíclicos de *T. brucei*. Su composición se detalla a continuación: MEM (GIBCO) 0,7 % (p/v); medio 199 (GIBCO) 0,2 % (p/v), amino ácidos esenciales MEM 50x (Sigma) 0,8 % (p/v), amino ácidos no esenciales MEM 100x (Sigma) 0,6 % (p/v), glucosa 5,6 mM, HEPES 30 mM, MOPS 24 mM, NaHCO₃ 24 mM, piruvato sódico 1 mM, D-L-alanina 2,24 mM, L-arginina 574 μM, L-glutamina 2 mM, D-L-metionina 469 μM, L-fenilalanina 484 μM, L-prolina 5,2 mM, D-L-serina 571 μM, taurina 1,28 mM, D-L-treonina 2,94 mM, tirosina 552 μM, guanosina 35 μM, ácido fólico 9 μM, D(+)-glucosamina 232 μM, ácido p-aminobenzoico 14,6 μM, biotina 800 nM. Filtrar y suplementar con suero bovino fetal (SBF) 10 % y hemina 11,5 μM.

HMI-9. Este medio se utiliza para el cultivo *in vitro* de parásitos tripomastigotes sanguíneos de *T. brucei*. Su composición incluye lo siguiente: IMDM (Sigma) 1,77 % (p/v), NaHCO₃ 36 mM, hipoxantina 1 mM, timidina 161 mM, cisteína 1,5 mM, batocuproina 78 mM, piruvato sódico 1 mM, β-mercaptoetanol 2 μM. Ajustar el pH a 7,5, filtrar y suplementar con SBF 10 %.

Medio LB (*Lysogeny broth*). Este medio se utiliza para el cultivo de bacterias y está compuesto de triptona (10 g/L), extracto de levadura (5 g/L) y NaCl (5 g/L). Para el cultivo sólido en placas se añade bacto-agar (15 g/L). Para la selección de bacterias transformadas este medio se suplementó con ampicilina (100 μg/mL) o kanamicina (50 μg/mL), dependiendo de la resistencia otorgada por cada plásmido.

C.1.4. Tampones y soluciones

Tampón/Solución	Composición
Tampón fosfato (PBS)	NaCl 136 mM, KCl 2,7 mM, Na ₂ HPO ₄ 8,2 mM, KH ₂ PO ₄ 1,47 mM, pH 7,2.
PBS-250	NaCl 250 mM, KCl 2,7 mM, Na ₂ HPO ₄ 8,2 mM, KH ₂ PO ₄ 1,47 mM, pH 7,2.
PBS-500	NaCl 500 mM, KCl 2,7 mM, Na ₂ HPO ₄ 8,2 mM, KH ₂ PO ₄ 1,47 mM, pH 7,2.
TDB-glucosa	NaCl 80 mM, KCl 5 mM, Na ₂ HPO ₄ 20 mM, MgSO ₄ 1 mM, glucosa 20 mM, pH 7,4.
Tampones para la purificación de <i>TbEndoV</i>	
Tampón de columna (MBP)	Tris-HCl 20 mM pH 7,4, NaCl 200 mM, EDTA 1 mM, inhibidores de proteasas (Roche).
Tampón de elución (MBP)	Tris-HCl 20 mM pH 7,4, NaCl 200 mM, EDTA 1 mM, inhibidores de proteasas (Roche), maltosa 10 mM.
Tampón de almacenamiento	Tris-HCl 20 mM pH 7,4, NaCl 200 mM, glicerol 25 %.
Tampón FPLC-A	Tampón fosfato 200 mM pH 7,4, NaCl 500 mM, β-mercaptoetanol 10 mM, inhibidores de proteasas (Roche).
Tampón FPLC-B	Tampón fosfato 200 mM pH 7,4, NaCl 500 mM, β-mercaptoetanol 10 mM, inhibidores de proteasas (Roche), imidazol 500 mM.
Tampón MonoQ A	Tris-HCl 200 mM pH 8,0, EDTA 0,1 mM, DTT 1 mM, NaCl 50 mM.
Tampón MonoQ B	Tris-HCl 200 mM pH 8,0, EDTA 0,1 mM, DTT 1 mM, NaCl 1 M.
Tampones para la caracterización de <i>TbEndoV</i>	
Tampón de hibridación	Tris-HCl 20 mM pH 8, MgCl ₂ 1 mM.
Tampón de reacción para ensayos de actividad de <i>TbEndoV</i>	Tris-HCl 20 mM pH 7,5, MnCl ₂ 1 mM, BSA 1 %. Para los sustratos de RNA se añaden 10 unidades de RNasin® Plus Ribonuclease Inhibitor (Promega).
Tampón de carga desnaturalizante geles de acrilamida (DNA)	Formamida 90 %, azul de bromofenol 0,1 %, xileno cianol 0,1 %, EDTA 50 mM.
Tampón de lisis para obtención de extractos de <i>TbEndoV</i>	Na ₂ HPO ₄ 10 mM, β-mercaptoetanol 1 %, SDS 1 %, urea 6 M.
Tampón de carga para proteínas	Tris-HCl 250 mM pH 6,8, SDS 12 %, glicerol 40 %, β-mercaptoetanol 20 %.
Tampón <i>SDS Running</i>	Tris base 25 mM, glicina 102 mM, SDS 0,1 %.
Tampón de transferencia	Tris base 25 mM, glicina 150 mM, metanol 20 %.
Tampones para la purificación del anticuerpo anti-<i>TbEndoV</i>	
Tampón de adherencia	Hepes 50 mM pH 7,5.
Tampón bloqueo	Etanolamina-HCl 100 mM pH 8,0.
Tampón elución	Glicina 100 mM pH 2,5.
Tampones para la transfección de parásitos	
Cytomix (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 5 mM, glucosa 0,5 %, BSA 100 µg/mL, hipoxantina 1 mM.
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 a 7,0 utilizando CH ₃ COO.

Tabla C1. Principales tampones utilizados.

C.1.5. Compuestos

Fármacos para la selección de transfectantes:

Geneticina (G418) (Gibco). Antibiótico aminoglucósido que inhibe la síntesis de proteínas.

Fleomicina (Sigma). Antibiótico glucopeptídico que se une a DNA bloqueando la fase S del ciclo celular.

Higromicina (Sigma). Antibiótico glucopeptídico que interfiere en la lectura de mRNAs, inhibiendo la síntesis de proteínas.

Blasticidina (Invitrogen). Antibiótico nucleósido-peptídico que inhibe la síntesis de proteínas al impedir la unión del péptido a la maquinaria ribosomal.

Doxiciclina (Sigma). Derivado de la tetraciclina que se ha utilizado para inducir la transcripción de las construcciones que contenían un represor de tetraciclina: RNAi y expresión de copia ectópica.

Otros compuestos:

Metotrexato (MTX) (Sigma). Inhibidor de la enzima dihidrofolato reductasa, que en *T. brucei* se presenta como una enzima bifuncional con actividad timidilato sintasa.

Bisulfito sódico (SB) (Sigma). Compuesto químico que desamina de forma específica la citosina a uracilo.

DETA/NO (Sigma). Utilizado para conseguir una liberación controlada de óxido nítrico en solución.

C.1.6. Oligonucleótidos utilizados en PCR

Los oligonucleótidos empleados en reacciones de amplificación durante la realización de esta tesis doctoral han sido sintetizados por los Servicios Técnicos del Instituto de Parasitología y Biomedicina López-Neyra.

Nombre	Secuencia (5' → 3')	Sitio de restricción	Uso
DGC5	GCGGATCCAAGCTTCCGCGATAAAGTTGGA CATG	BamHI/HindIII	Construcción RNAi (1)
DGC6	AACGGGCCCCGCCTCCCGGAACGCGAGG	ApaI/HpaI	Construcción RNAi (1)
DGC7	GCGGATCCAAGCTTGGTGCAGTTGATTGAG AGCG	BamHI/HindIII	Construcción RNAi (2)
DGC8	AACGGGCCCCGCGAGTGCAAGTCGGCAGC	ApaI/HpaI	Construcción RNAi (2)
DGC25	GCGGCCACGGGACGTTGAACGCTTGTTTC		Clonación 3'UTR para KO
DGC31	ACCCGACACTGGGTATCAAGAAGGTGTAA		Comprobación KO gen aguas arriba
DGC32	ATAAAGCTTATGAACAGTAAAAATATCAT		Comprobación KO gen aguas abajo
DGC33	CCACGTCGGCGGCGTTGCCATATCCTTTATT CAGG		Mutación dirigida sobre ORF <i>TbEndoV</i>
DGC34	CCTGAATAAAGGATATGGCAACGCCCGCA CGTGG		Mutación dirigida sobre ORF <i>TbEndoV</i>
DGC35	GCGAATTCATGGGTGTGGGAGAAATGAGT	EcoRI	Clonación de <i>TbEndoV</i> en pMAL- c2x
DGC41b	ATGAATTCAGAAGACCTTGCTGTGATGTT AGTTCTGTGTTTA		Clonación 5'UTR para KO
DGC42b	CACAGCAAGGTCTTCTGAAATTCATGTTT		Clonación BLE/PAC para KO
DGC43b	CAAGCGTTCAACGTCCCGTGGCCGCAATAC TGCATAGATAACAAA		Clonación BLE para KO
DGC49p	CAAGCGTTCAACGTCCCGTGGCCGCATCCCC CCATTTCTTCTTT		Clonación PAC para KO
DGC56	GCTCTAGAAGTAGTGATGAAAAAGCCTGA	XbaI	Clonación marcador higromicina en pGRV23b
DGC57	CGCCTCAGGATCGATCCCGGTCGGCATCT	Bsu36I	Clonación marcador higromicina en pGRV23b
DGC55	GCGTTAACGCATTCATTTAGTTGAATCCGTC GGA	HpaI	Clonación <i>TbEndoV</i> en pGRV33
DGC62	GCGGATCCCAATCGTATTTGCCATTTTATT CTGACACAC	BamHI	Clonación 5'UTR para KO
DGC63	GCGGATCCGGGAGTACAGGGACCAGAGTAC CC	BamHI	Clonación 3'UTR para KO
DGC65	GGATCGATCCTGCCATTTAGTTAGTTGGCT TTCCCTTG		Clonación 3'UTR para KO
DGC71	GATTCTTCTTGAGACAAAGGCTTGGCCATGT TCTAGAGCTTATTTTATGGCAGCAACGAGAC CTTACG		Clonación 5'UTR para KO
DGC72	ATGGCCAAGCCTTTGTCTCAAGAAGAATC		Clonación BSD para KO
DGC73	CCAATAACTAAATGGGCAGGATCGATCCT TAGCCCTCCCACACATAACCAGAGGGC		Clonación BSD para KO
VCA19	GAGCCGATGCTTTTGACATGTTAG		Secuenciación del gen HSV-TK.
VCA20	CTTGTGCGCTGTACGTAAATGTGTTGC		Secuenciación del gen HSV-TK.
VCA43	GCCATATGGGTGTGGGAGAAATGAGTG	NdeI	Clonación de <i>TbEndoV</i> en pET28a/pGRv23b/pGRV33
VCA44	GCGGATCCTCAGCATTCAATTTAGTTGAATC	BamHI	Clonación de <i>TbEndoV</i> en pET28a/pMAL-c2x/pGRV23b

Tabla C2. Lista de cebadores utilizados.

C.1.7. Sustratos utilizados para caracterizar la actividad de *TbEndoV*

Los oligonucleótidos empleados en los ensayos para caracterizar la actividad de *TbEndoV* fueron adquiridos a TriLink[®] Biotechnologies y Eurogentec.

Nombre	Secuencia (5' → 3')
DNA dI	CCTGCCCTG I GCAGCTGTGGG
DNA dU	CCTGCCCTG U GCAGCTGTGGG
RNA rI	CCUGCCCUG I GCAGCUGUGGG
DNA rIdG	CCTGCCCTG [rI] GCAGCTGTGGG
DNA dIrG	CCTGCCCTG I [rG]CAGCTGTGGG
Complementaria DNA dT	CCCACAGCTGCTCAGGGCAGG
Complementaria DNA dC	CCCACAGCTGCCCAGGGCAGG
Complementaria DNA dG	CCCACAGCTGCGCAGGGCAGG
Complementaria DNA dA	CCCACAGCTGCACAGGGCAGG
Complementaria RNA rU	CCCACAGCUGCUCAGGGCAGG
Complementaria RNA rC	CCCACAGCUGCCCAGGGCAGG
tRNA ^{Thr} C ₃₂ A ₃₄	GCCGUCCUAGUAAGACGGA
tRNA ^{Thr} C ₃₂ I ₃₄	GCCGUCCU I GUAAGACGGA
tRNA ^{Thr} U ₃₂ A ₃₄	GCCGUC U UAGUAAGACGGA
tRNA ^{Thr} U ₃₂ I ₃₄	GCCGUC U IUGUAAGACGGA
RNA rI (alternativo)	CCGUAGAGCUAC I GAUCGGUCACCG
DNA 8-oxoG	CTTGCCCTG [8-oxoG] GCAGCTGTGGG
DNA THF	CTTGCCCTG [THF] GCAGCTGTGGG
DNA 5-OH-dU	CCTGCCCTG [5-OH-dU] GCAGCTGTGGG
DNA DHU	CTTGCCCTG [DHU] GCAGCTGTGGG

Tabla C3. Lista de sustratos utilizados para caracterizar la actividad de *TbEndoV*. (d)

Indica desoxirribonucleótido, mientras que (r) indica ribonucleótido.

C.1.8. Vectores

pGEM-T (Promega). Este vector de 3000 pares de bases ha sido utilizado para clonar y amplificar los fragmentos obtenidos mediante PCR. Permite la selección de bacterias transformadas mediante ampicilina y el sistema de regulación del *operon lac* (IPTG 100 mM y X-Gal 20 mg/mL).

pET-28a (Novagen). Vector que permite la expresión de proteínas fusionadas a un péptido de 6 histidinas. La selección de transfectantes se realiza con kanamicina, y posee un promotor de la T7 RNA polimerasa que permite inducir la expresión de la proteína clonada.

pMAL-c2x (New England BioLabs). Vector que permite la expresión de proteínas fusionadas a la proteína de unión a maltosa (MBP). La selección de transformantes se realiza con ampicilina. El vector posee un promotor *tac* regulado por el represor del operón de la lactosa que permite inducir la expresión de la proteína clonada mediante IPTG.

pGR19 (Clayton et al. 2005). Vector que permite el silenciamiento génico mediante la técnica de RNA de interferencia. Un fragmento del gen que se quiere silenciar se clona por duplicado en sentidos opuestos, separados por una región denominada *stuffer* que permite la formación de una estructura en tallo-lazo. La transcripción se produce a partir del promotor *parp*, y es inducible mediante doxiciclina. Además contiene un gen de resistencia a higromicina que permite la selección de transfectantes.

pGRV23b (Castillo-Acosta et al. 2012). Vector para la expresión ectópica de proteínas en *T. brucei*. La expresión está controlada por el promotor *parp* y es inducible por doxiciclina. Contiene un gen de resistencia a higromicina para la selección de parásitos transfectados con este plásmido.

C.1.9. Software

C.1.9.1. Programas informáticos

Cary WinUV Software.

Gene Construction Kit[®] versión 1.03.1 (1990) B. Gross, A. Pytte y P. Rice.
Textco, Inc.

Cell-R IX-81 Software.

Imaris Software (BitPlane, Scientific Software).

Huygens Essential Software (versión 3.3; Scientific Volume Imaging).

Fiji/ImageJ.

BD CellQuest Pro Software.

FlowJo Software.

Prism5 (GraphPad Software).

EndNote X8.

Internet Explorer.

Microsoft Office 2010 (Microsoft Word, Microsoft Excel y Microsoft Power Point).

Windows 7, Microsoft.

Adobe PhotoshopTM CS3 version 10.0.

Jalview Desktop (University of Dundee).

ImageQuant, versión 5.0, Molecular Dynamics.

C.1.9.2. Bases de datos

NCBI: búsqueda de secuencias de DNA, proteínas, bibliografía y servicio de BLAST.

TriTrypDB: información sobre proteínas, incluyendo secuencias, niveles de expresión, etc.

GeneDB: búsqueda de secuencias de DNA y proteínas.

EMBL-EBI: análisis de secuencias y alineamientos.

C.1.10. Análisis estadístico

Para el análisis de estadístico de los datos obtenidos se calcularon las medias y las desviaciones estándar de los resultados. En todos los casos las medias se compararon utilizando el test *t de Student*. Se consideró estadísticamente significativo un valor $p < 0,05$ (*: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$). Para realizar los cálculos se utilizó el software Prism5 (GraphPad Software).

C.2. MÉTODOS

C.2.1. Cultivo y manipulación de parásitos

C.2.1.1. Cultivo de *Trypanosoma brucei*

Los estudios *in vitro* se han llevado a cabo utilizando líneas de dos formas parasitarias diferentes: forma procíclica y forma sanguínea. Para su cultivo, la forma procíclica se mantuvo a una temperatura de 28 °C en frascos sin aireación y placas de diversos formatos (NUNC). En condiciones normales los cultivos de células procíclicas se iniciaron a una densidad de $2 \cdot 10^5$ parásitos/mL, y para mantenerlos en fase logarítmica se diluyeron cada 48 horas, cuando alcanzaban una densidad aproximada de 10^7 parásitos/mL. En cuanto a la forma sanguínea, su cultivo se realizó a 37 °C, CO₂ 5 % y humedad, y se utilizaron frascos con aireación y también placas de diversos formatos (NUNC). Los cultivos de células sanguíneas se iniciaron a una densidad de $5 \cdot 10^3$ parásitos/mL, y se diluyeron también cada 48 horas para mantenerlos en fase logarítmica, cuando alcanzaban una densidad aproximada de $1,5 \cdot 10^6$ parásitos/mL. En ambas formas la densidad de los cultivos se midió con un contador de partículas Z2 de Beckman Coulter™, y la dilución se realizó utilizando medio precalentado a la temperatura adecuada. Los medios utilizados se muestran en el apartado C.1.3.

C.2.1.2. Obtención de extractos totales de parásitos

Los parásitos se recogieron mediante centrifugación del cultivo a 1000 g durante 10 minutos y a 4 °C. El pellet obtenido se lavó dos veces con PBS 1x (Tabla C1) a 4 °C, centrifugando tras cada lavado. Finalmente las células se resuspendieron en tampón de lisis (Tabla C1) a una densidad de $5 \cdot 10^8$ parásitos/mL. Antes de analizar las muestras mediante SDS-PAGE se añadió tampón de carga 4x (Tabla C1), y las proteínas se desnaturalizaron calentando la preparación a 99 °C durante 5 minutos, enfriándolas a continuación rápidamente en hielo.

C.2.1.3. Criopreservación y descongelación

Para su congelación las células se centrifugaron a 1000 g durante 10 minutos y temperatura ambiente (RT). Después de retirar el sobrenadante, el pellet se resuspendió en medio fresco con un 10 % de glicerol para alcanzar una densidad de $6 \cdot 10^7$ parásitos/mL en el caso de la forma sanguínea y $2 \cdot 10^8$ parásitos/mL en el caso de procíclicos. En cada vial de congelación se introdujo 0,25 mL de esta preparación. La congelación se llevó a cabo de forma gradual en un recipiente con isopropanol a -80 °C, y tras 24 horas los viales fueron almacenados en nitrógeno líquido para su conservación a largo plazo.

Para el inicio de los cultivos, las células se descongelaron de forma rápida introduciendo los viales congelados en un baño a 37 °C, y el contenido del vial se pasó a un frasco de cultivo con medio fresco.

C.2.1.4. Transfección estable por electroporación

La transfección permite introducir material genético exógeno en células eucariotas. En *T. brucei*, la transfección permite la integración de un plásmido, previamente linearizado, en el genoma del parásito. En ambas formas del parásito esto se consigue mediante electroporación (Carruthers and Cross 1992). En todos los casos, el DNA utilizado se aisló con el kit NucleoSpin® Plasmid (Macherey-Nagel), se digirió con la enzima de restricción adecuada, se precipitó con etanol, y finalmente se resuspendió en agua estéril a una concentración de 1 mg/mL.

Para la forma sanguínea de *T. brucei*, se recogieron $2,4 \cdot 10^7$ células de un cultivo en fase logarítmica mediante centrifugación (1000 g, 10 minutos y RT). Después de retirar el sobrenadante, se lavaron dos veces con tampón de transfección específico para parásitos de la forma sanguínea (Cytomix) (Tabla C1) a RT, centrifugando tras cada lavado. A continuación las células se resuspendieron en Cytomix a una concentración de $6 \cdot 10^7$ parásitos/mL y se añadieron 10 µg del DNA con el que se quiere transfectar. Esta mezcla se transfirió a una cubeta de electroporación *Gene Pulser® Cuvette, 4 mm*

gap (BioRad), y seguidamente se procedió a la electroporación empleando un sistema ECM 630 de BTX con la siguiente configuración: 1,7 kV, 25 Ω y 25 μ F. Tras el pulso, las células se transfirieron a un frasco de cultivo con 12 mL de medio fresco; este contenido se repartió en una placa de 24 pocillos y se dejó a las células recuperarse durante toda la noche en un incubador a 37 °C, CO₂ 5 % y humedad. Al día siguiente se llevó a cabo la selección de los transfectantes agregando a cada pocillo 1 mL de medio con el fármaco de selección oportuno según el plásmido.

En el caso de la forma procíclica de *T. brucei*, $2 \cdot 10^7$ células de un cultivo en fase logarítmica se recogieron mediante centrifugación (1000 g, 10 minutos y 4 °C). Después de retirar el sobrenadante, se lavaron dos veces con tampón de transfección específico para parásitos de la forma procíclica (ZPFM) (Tabla C1) a 4 °C, centrifugando tras cada lavado a dicha temperatura. A continuación, las células se resuspendieron en ZPFM a 4 °C y a una concentración de $4 \cdot 10^7$ parásitos/mL, y se añadieron 10 μ g del DNA con el que se quiere transfectar. Esta mezcla se transfirió a una cubeta de electroporación *Disposable Cuvettes Plus™*, 2mm *gap* (BTX), y la mezcla se incubó 5 minutos en hielo. Seguidamente se procedió a la electroporación en un sistema ECM 630 de BTX con la siguiente configuración: 1,6 kV, 25 Ω y 25 μ F. Tras el pulso las células se transfirieron a un frasco de cultivo con 12 mL de medio fresco dejándolas recuperarse durante toda la noche en un incubador a 28 °C. Al día siguiente se añadieron 0,5 mL de medio condicionado (en el cual han crecido parásitos hasta alcanzar una densidad aproximada de $8 \cdot 10^6$ parásitos/mL, que luego han sido retirados por filtración), con el fármaco de selección apropiado según el plásmido, en todos los pocillos de una placa de 24 pocillos exceptuando la primera fila. En dicha fila se repartió 1 mL del contenido de los frascos con células transfectadas y seguidamente se hicieron diluciones 1:2 por columnas hasta llegar a la última fila.

C.2.1.5. Ensayos de proliferación celular y sensibilidad a compuestos genotóxicos

Para los ensayos de proliferación y viabilidad celular los parásitos se cultivaron en volúmenes de 3 mL en placas de seis pocillos. Cada concentración del compuesto se hizo por duplicado, y el experimento se repitió tres veces de manera independiente. Las líneas utilizadas fueron BF, dKO, dKO/*TbEndoV*, BF/*TbEndoV*, BF/UNG-KO y BF/UNG-KO/*TbEndoV*. Para los cultivos se utilizó medio HMI-9 suplementado con un 10 % de SBF y 1 µg/mL de doxiciclina en el caso de las cepas que expresaban una copia ectópica de *TbEndoV*. La densidad de partida de los cultivos fue de $5 \cdot 10^3$ parásitos/mL, y tras mantenerlos durante 48 horas en un incubador (a 37 °C, CO₂ 5 % y humedad) se hizo un recuento de los mismos utilizando un contador de partículas Z2 de Beckman Coulter™.

C.2.1.6. Determinación del espectro y la tasa de mutación por el test de fluctuación de Luria-Delbrück

La tasa y el espectro de mutaciones se determinaron empleando el gen de la timidina quinasa del virus del Herpes Simplex tipo 1 (HSV-TK) en dos fondos genéticos distintos, PF y PF/UNG-KO, en presencia de DETA/NO. La tasa de mutación del fenotipo TK negativo se midió mediante el test de fluctuación de Luria-Delbrück descrito previamente (Luria and Delbruck 1943). Cultivos en fase logarítmica se diluyeron a una densidad de 10^3 parásitos/mL y se expusieron a una concentración final de 40 µM de DETA/NO. Seguidamente los cultivos se repartieron en placas de 96 pocillos, añadiendo una cantidad de 200 µL a cada pocillo, y se incubaron durante 5-6 días a 28 °C en atmósfera húmeda. Tras alcanzar una densidad aproximada de $5 \cdot 10 \cdot 10^6$ células/mL, los cultivos se transfirieron a 2,5 mL de medio fresco con ganciclovir a una concentración final de 100 µg/mL, y se incubaron en placas de 24 pocillos durante 6-7 días a 28 °C en atmósfera húmeda hasta alcanzar una densidad de $5 \cdot 10 \cdot 10^6$ células/mL. La tasa de mutación se calculó utilizando la ecuación $a = (\ln P_0 \cdot$

$\ln 2)/N$ (Valdes et al. 1996), donde P_0 es la proporción de pocillos sin crecimiento celular y N es el número final de parásitos tras la adición de ganciclovir.

Para obtener el espectro de mutaciones se aisló DNA genómico de los mutantes utilizando DNazol (Invitrogen). El gen TK se amplificó mediante PCR y se secuenció utilizando los oligonucleótidos VCA19 y VCA20.

C.2.2. Técnicas para el estudio de la proteína

C.2.2.1. Obtención de la proteína purificada

TbEndoV se ha purificado utilizando dos sistemas de expresión diferentes. Por un lado se ha expresado fusionada a la proteína de unión a maltosa (MBP) (MBP-*TbEndoV*). En este caso, el gen de *TbEndoV* se amplificó utilizando los primers DGC35 y VCA44, y posteriormente se clonó en el vector de expresión comercial pMAL-c2x (New England Biolabs) utilizando los sitios de restricción NdeI y BamHI. El plásmido resultante, denominado pGC11, permite expresar la proteína fusionada a MBP en bacterias *E. coli* TB1 transformadas.

Por otro lado *TbEndoV* se expresó fusionada a una cola de histidinas (His-*TbEndoV*). Para ello el gen de *TbEndoV* se amplificó utilizando los primers VCA43 y VCA44, y posteriormente se clonó en el vector de expresión comercial pET-28a (Novagen) utilizando los sitios de restricción BamHI y EcoRI. El plásmido resultante, denominado pGC7, permite expresar la proteína fusionada a una cola de histidinas en bacterias *E. coli* BL21 (DE3) transformadas.

Como control se generó un mutante catalítico mediante mutagénesis dirigida. Para ello se sustituyó el ácido aspártico en posición 95 por una alanina. Esto se hizo utilizando el kit QuikChange Lightning Multi Site-Directed Mutagenesis Kit (Agilent Technologies), y los cebadores diseñados para tal efecto conteniendo el cambio de base necesario: DGC33 y DGC34.

C.2.2.2. Expresión de His-*TbEndoV* y MBP-*TbEndoV*

Las condiciones para la expresión de *TbEndoV* se optimizaron probando diferentes cepas bacterianas, tiempos de expresión y temperaturas. Finalmente, la expresión de ambas enzimas, His-*TbEndoV* y MBP-*TbEndoV*, se llevó a cabo a una temperatura de 16 °C durante un periodo de 16 horas en bacterias *E. coli* BL21 (DE3) y *E. coli* TB1 respectivamente. En primer lugar, una colonia de bacterias transformadas con el plásmido de expresión (pGC7 o pGC11) se creció en 10 mL de medio LB (His-*TbEndoV*) o medio rico con glucosa (MBP-*TbEndoV*), ambos con ampicilina a 100 µg/mL y en agitación a 37 °C. Cuando este cultivo llegó a una DO₆₀₀ de entre 0,6 y 1,0 se utilizó para inocular un cultivo de 40 mL que se creció durante toda la noche en agitación a 37 °C. A la mañana siguiente 0,5 L de medio con ampicilina se inocularon con este cultivo (dilución 1:50), y las bacterias se crecieron en agitación y a 37 °C hasta alcanzar una DO₆₀₀ de 0,6. En ese momento se indujo la expresión de la proteína añadiendo IPTG a una concentración final de 0,3 mM, y los cultivos se incubaron a 16 °C durante 16 horas. Al día siguiente los cultivos se centrifugaron a 7000 g durante 30 minutos y a 4 °C para obtener el pellet de bacterias que se preservó a -80 °C.

C.2.2.3. Purificación de la proteína recombinante MBP-*TbEndoV* mediante cromatografía de afinidad

El pellet obtenido durante la expresión se resuspendió en 50 mL de tampón de columna (Tabla C1) a 4 °C y se sonicó 6 veces durante 30 segundos en ciclos del 50 %. El homogeneizado se centrifugó a 9000 g y 4 °C durante 30 minutos para retirar los restos celulares, y el sobrenadante fue diluido con 5 volúmenes de tampón de columna. Para la purificación se utilizó una resina de amilosa (New England BioLabs) en una columna para cromatografía líquida (Sigma). La resina se lavó con 8 volúmenes de tampón de columna, y tras ello se cargó el extracto crudo, que se dejó pasar por gravedad. A continuación la resina se lavó con 12 volúmenes de tampón de columna, y finalmente se eluyó la proteína con tampón de elución (Tabla C1). Las fracciones se

analizaron mediante SDS-PAGE y las que contenían la proteína de interés se combinaron para almacenarlas a -80 °C en tampón de almacenamiento (Tabla C1).

C.2.2.4. Purificación de la proteína recombinante His-TbEndoV mediante cromatografía de afinidad

El pellet obtenido durante la expresión se resuspendió en 20 mL de tampón FPLC-A (Tabla C1) a 4 °C, y se sonicó 6 veces durante 30 segundos en ciclos del 50 %. El homogeneizado se centrifugó a 9000 g y 4 °C durante 30 minutos para retirar el debris celular. Para la purificación se utilizó una columna HiTrap Chelating HP (GE Healthcare) acoplada a un sistema FPLC (Pharmacia). La columna se equilibró con 10 mL de tampón FPLC-A (Tabla C1). Seguidamente se hizo circular el extracto crudo por la columna, y la proteína de fusión se eluyó aplicando un gradiente lineal de tampón FPLC-B (Tabla C1). Las fracciones se analizaron mediante SDS-PAGE, y aquellas que contenían la mayor parte de la proteína se combinaron antes de proceder al siguiente paso de purificación.

C.2.2.5. Purificación de la proteína recombinante His-TbEndoV mediante cromatografía de intercambio aniónico

El tampón de elución de la proteína obtenida en el paso de purificación anterior se reemplazó por tampón MonoQ A (Tabla C1) utilizando columnas PD10 (GE Healthcare). Para el segundo paso de purificación se utilizó una columna Mono Q 5/50 GL acoplada a un sistema de HPLC ÄKTAbasic (GE Healthcare). Tras equilibrar la columna con el tampón MonoQ A, se hizo pasar la proteína purificada, que posteriormente fue eluida aplicando un gradiente lineal de tampón MonoQ B (Tabla C1). Las fracciones se analizaron mediante SDS-PAGE y aquellas que contenían la proteína más pura y concentrada fueron combinadas y almacenadas a -80 °C en el buffer de elución con un 25 % de glicerol.

C.2.2.6. Ensayos de actividad de *TbEndoV*

Para la determinación de actividad endonucleasa se utilizó la proteína MBP-*TbEndoV*. Los oligonucleótidos, con una longitud de 21 bases y conteniendo la modificación deseada, se marcaron con [γ - ^{32}P]ATP (3000 Ci/mmol; Perkin Elmer) en el extremo 5'. Para ello, 10 pmoles de sustrato se incubaron con 25 μCi de [γ - ^{32}P]ATP y 10 unidades de la polinucleótido quinasa T4 (Promega). La reacción se incubó a 37 °C durante 10 minutos, y seguidamente los oligonucleótidos marcados se purificaron utilizando columnas MicroSpin G25 (GE Healthcare). En el caso de los sustratos de cadena doble, los oligonucleótidos marcados se incubaron con la cadena complementaria correspondiente en tampón de hibridación (Tabla C1) a 100 °C durante 5 minutos, tras lo cual se dejó enfriar lentamente a temperatura ambiente.

Los ensayos de actividad se realizaron incubando 5 fmoles de sustrato en tampón de reacción (Tabla C1), y en presencia de distintas concentraciones de *TbEndoV*. Las reacciones, con un volumen final de 10 μL , se incubaron durante 1 hora a 37 °C. Finalmente las reacciones se detuvieron añadiendo 10 μL de tampón de carga (Tabla C1) y calentando la mezcla a 95 °C durante 5 minutos. El producto de la reacción se analizó mediante electroforesis en geles desnaturalizantes de poliacrilamida al 20 % (w/v) (19:1 acrilamida/bis-acrilamida). Los geles se escanearon mediante un equipo Typhoon 9400 (Amersham Biosciences), y el análisis de las imágenes obtenidas para determinar el porcentaje de corte se efectuó con el software Fiji/ImageJ.

C.2.3. Técnicas inmunológicas

C.2.3.1. Obtención de anticuerpo anti-*TbEndoV*

Para la obtención de un anticuerpo policlonal específico contra *TbEndoV* se inmunizó un conejo de la cepa *New Zealand White*. Para la inmunización se utilizó la proteína purificada fusionada a una cola de histidinas. En la primera inmunización se inyectó una emulsión de 0,4 mg de proteína purificada en 0,5 mL de tampón PBS 1x mezclada con el mismo volumen de Adyuvante Completo de Freund (Sigma). La

segunda y tercera inmunizaciones se hicieron a intervalos de dos semanas, y un mes después, la cuarta. Para estas tres se utilizó una emulsión de 0,4 mg de proteína purificada en 0,5 mL de tampón PBS 1x mezclada con el mismo volumen de Adyuvante Incompleto de Freund (Sigma). Transcurrida una semana de cada inmunización se extrajeron \approx 20 mL de sangre, excepto tras la cuarta inmunización que se desangró el animal, obteniéndose un volumen aproximado de 75 mL.

Para obtener el suero, la sangre se incubó a temperatura ambiente durante 2 horas. Tras ellos se incubó 20 minutos a 37 °C, y finalmente se produjo la contracción del coágulo haciendo una incubación de 4 horas a 4 °C. El coágulo se retiró centrifugando la sangre a 2500 g durante 10 minutos. El sobrenadante se almacenó a 4 °C y -80 °C, y para su conservación se añadió azida sódica a una concentración aproximada de 0,2 %.

C.2.3.2. Purificación del anticuerpo anti-*TbEndoV*

Con el objetivo de aumentar la especificidad del anticuerpo anti-*TbEndoV* se realizó una purificación del suero obtenido mediante cromatografía de afinidad frente a la proteína purificada. Para ello se utilizó una resina Affi-gel 15 (Bio-Rad), que permite unir la proteína purificada gracias a su capacidad para fijar ligandos con aminas primarias. Previamente la resina se lavó con 20 volúmenes de agua bidestilada, y seguidamente con 20 volúmenes de tampón de adherencia (Tabla C1), centrifugando a 1500 g durante 2 minutos para retirar los sobrenadantes. A continuación, la resina se incubó con 1 mg de proteína purificada diluida en 4 mL de tampón de adherencia. La incubación se realizó a 4 °C durante toda la noche en un agitador orbital. Al día siguiente el tampón de adherencia se retiró por centrifugación y la resina se lavó con 20 volúmenes de tampón de bloqueo (Tabla C1). Tras ello se resuspendió la resina en 2 mL de tampón de bloqueo y se incubó durante 1 hora a 4 °C en un agitador orbital. Posteriormente, se lavó la resina con 20 volúmenes de las siguientes soluciones: PBS 1x, tampón de elución (Tabla C1) y Tris-HCl 100 mM pH 8,0. La resina, resuspendida en el último tampón utilizado, se transfirió a una columna

Poly-Prep[®] Chromatography Column (Bio-Rad) y se lavó con 20 volúmenes del mismo tampón. Tras ello se lavó con 20 volúmenes de PBS-500 (Tabla C1) primero, y PBS 1x en segundo lugar. Entonces se hizo circular dos veces 10 mL de suero inmunizado obtenido durante la sangría, y a continuación la resina se lavó con 20 volúmenes de las siguientes soluciones: PBS 1x, PBS-250 (Tabla C1), PBS-500 (Tabla C1). Por último, el anticuerpo se eluyó con 5 volúmenes de tampón de elución y la solución obtenida se neutralizó con Tris-HCl 1 M pH 9,5 hasta obtener un pH aproximado de 7,5. Finalmente se añadió azida sódica a una concentración aproximada de 0,02 % para su conservación.

C.2.3.3. Western blot

El análisis de los extractos totales obtenidos se hizo separando las proteínas por peso molecular mediante SDS-PAGE. Para ello se prepararon geles de poliacrilamida al 12 % (acrilamida: bis-acrilamida 37,5:1) en tampón *SDS Running* (Tabla C1), y se realizó electroforesis a un voltaje de 200 V durante 60 minutos. A continuación las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa (Whatman) entre dos papeles Whatman de 3 mm. Esto se hizo a 4 °C en solución de transferencia (Tabla C1), y a una intensidad de corriente de 280 mA durante 60 minutos. La visualización de los marcadores de peso molecular (SDS-PAGE Standard Low Range, BioRad) se hizo tiñendo la membrana con una solución de rojo Ponceau durante 1 minuto. Para la detección de proteínas las membranas se lavaron en solución de lavado (PBS 1x, 0,1 % Tween 20), a continuación en solución de bloqueo durante 30 minutos (solución de lavado + 5 % leche en polvo desnatada), y por último se incubaron con una dilución adecuada del anticuerpo primario en solución de bloqueo durante toda la noche a 4 °C. Tras la incubación con el primario la membrana se lavó con solución de lavado (x3) y se incubó con una dilución adecuada del anticuerpo secundario en solución de bloqueo durante 1 hora. La membrana se lavó nuevamente con solución de lavado (x3), y finalmente las proteínas se visualizaron utilizando el kit de detección ECL[™] (GE Healthcare) y exponiendo las membranas a una película autorradiográfica Hyperfilm[™] ECL (GE Healthcare).

C.2.3.4. Microscopia de fluorescencia

Para los estudios de microscopia las células, en fase logarítmica de crecimiento, fueron recolectadas centrifugando a 1000 g durante 10 minutos y 4 °C, y lavadas dos veces con TDB-glucosa 1x (Tabla C1). Para llevar a cabo la fijación, los parásitos se resuspendieron en solución de lavado (PBS 1x pH 7,2, Tween[®] 20 0,2 %) con p-formaldehído al 4 %, y a una densidad de $5 \cdot 10^7$ parásitos/mL. La fijación se realizó durante 30 minutos sobre un portaobjetos previamente recubierto con Poli-L-lisina para permitir la adhesión de los parásitos a la superficie. Los parásitos fijados se lavaron dos veces en agitación con solución de lavado, y tras ello se permeabilizaron durante 75 minutos con NP-40 al 1 % en solución de bloqueo (solución de lavado con Blocking Reagent (Roche) al 1 %). Los parásitos fijados y permeabilizados se lavaron una vez para detener la permeabilización. La inmunofluorescencia se realizó incubando con el anticuerpo primario correspondiente para cada proteína en solución de bloqueo durante 1 hora: policlonal anti-*Tb*EndoV de conejo (1:100) y monoclonal anti-myc de ratón (Sigma, 1:100). Como anticuerpos secundarios se utilizaron monoclonales de cabra anti-IgG de conejo y anti-IgG de ratón, acoplados al fluorocromo Alexa Fluor[®] 488 (Sigma, 1:500). Las incubaciones se realizaron durante 1 hora. Finalmente las preparaciones se montaron utilizando ProLong[®] Gold Antifade Reagent con DAPI (Life Technologies). Las imágenes, compuestas por hasta 40 capas, se tomaron usando un microscopio de gran angular Olympus y el software Cell-R IX81. La deconvolución de las imágenes se realizó utilizando el software Huygens Essential (versión 3.3; Scientific Volume Imaging).

C.2.3.5. Estudios de estrés nutricional

Para los estudios de estrés nutricional se utilizaron $2,5 \cdot 10^7$ células en fase logarítmica de crecimiento. Las células se recolectaron centrifugando un cultivo durante 10 minutos a 1000 g y RT. Seguidamente se lavaron dos veces en PBS 1x, centrifugando tras cada lavado. Para llevar a cabo el ayuno, los parásitos se incubaron en PBS 1x durante el periodo de tiempo indicado. Inmediatamente después se realizó la

inmunofluorescencia como se ha descrito en el apartado anterior, utilizando los anticuerpos policlonales de conejo anti-*TbEndoV* (1:100), anti-*TbDhh1* (1:100), anti-*TbScd6* (1:100) y anti-*TbDRBD3* (1:100), así como el monoclonal anti-myc de ratón (Sigma, 1:100). Como anticuerpos secundarios se utilizaron monoclonales de cabra anti-IgG de conejo o ratón, acoplados al fluorocromo Alexa Fluor® 488 (Sigma, 1:500) o Alexa Fluor® 594 (Sigma, 1:500).

Para realizar los experimentos de colocación entre *TbEndoV* y *TbDhh1*, el anticuerpo anti-*TbEndoV* se acopló previamente al fluorocromo Alexa Fluor® 594. Las muestras se incubaron en primer lugar con el policlonal anti-*TbDhh1* (1:100) de conejo como primario, y seguidamente con el monoclonal de cabra anti-IgG de conejo Alexa Fluor® 488 (Sigma, 1:500) como secundario. A continuación las muestras se lavaron con solución de bloqueo y se incubaron con un anticuerpo inespecífico primario de conejo para bloquear totalmente los sitios de unión del secundario previamente utilizado. A continuación se lavaron nuevamente las muestras y se incubaron con el policlonal anti-*TbEndoV* (1:100) de conejo previamente conjugado al fluorocromo Alexa Fluor® 594 utilizando el kit Zenon™ Rabbit IgG Labeling (ThermoFisher). Finalmente se realizó un post-fijado con p-formaldehído 4% en solución de lavado durante 15 minutos. Las muestras se montaron y visualizaron como se ha descrito en el apartado anterior.

C.2.3.6. Análisis de la localización de *TbEndoV* durante condiciones de estrés nutricional

El tamaño y la cantidad de gránulos que forma *TbEndoV* durante condiciones de estrés nutricional se analizaron en las líneas PF y PF/RNAi. La inmunofluorescencia se realizó como se ha descrito en los apartados anteriores tras cuatro días de represión de la proteína en la línea PF/RNAi, cuando el fenotipo de inhibición del crecimiento es mayor. La inducción del RNAi se llevó a cabo añadiendo 1 µg/mL de doxiciclina al medio. El grado de colocación se determinó mediante el coeficiente de correlación de Pearson y el coeficiente de solapamiento de Manders. Ambos coeficientes se

calcularon utilizando el *plugin* JACoP para el software Fiji/ImageJ y fijando un umbral manual para el coeficiente de Manders, en un total de al menos 18 células para cada línea. El solapamiento de *TbEndoV* sobre *TbDhh1* está representado por M1, mientras que M2 representa lo contrario. Para la determinación del número y tamaño de los gránulos se hizo un análisis de partículas utilizando el software Fiji/ImageJ, fijando un umbral manual para la intensidad de señal y un tamaño mínimo de partícula de $0,05 \mu\text{m}^2$. El análisis se realizó sobre la proyección z de las imágenes, que fue calculada utilizando el método de suma de capas.

C.2.3.7. Análisis del ciclo celular mediante citometría de flujo (FACS) y tinción con DAPI

El ciclo celular se analizó en las líneas PF y PF/RNAi mediante citometría de flujo, marcando el DNA celular con yoduro de propidio. El estudio se hizo durante un periodo total de seis días, tomando muestras cada 48 horas tras cada inducción del RNAi con $1 \mu\text{g/mL}$ de doxiciclina. El experimento se realizó dos veces de forma independiente, con tres réplicas dentro de cada experimento. Para cada muestra se tomaron $2 \cdot 10^7$ células, centrifugando el cultivo a 1000 g durante 10 minutos. Las células se lavaron dos veces con 5 mL de PBS 1x, y se volvió a centrifugar la preparación a 1000 g durante 10 minutos. A continuación los parásitos se fijaron durante toda la noche a $4 \text{ }^\circ\text{C}$ en una solución de 70 % etanol y 30 % PBS 1x. Al día siguiente las células fijadas se recogieron centrifugando nuevamente a 1000 g durante 10 minutos y $4 \text{ }^\circ\text{C}$, y a continuación se lavaron dos veces con PBS 1x, centrifugando después de cada lavado. Por último, los parásitos se resuspendieron en $0,5 \text{ mL}$ de PBS 1x conteniendo $40 \mu\text{g/mL}$ de yoduro de propidio y $10 \mu\text{g/mL}$ de RNasa A libre de DNasas (Qiagen), y se incubaron durante 30 minutos a RT y en oscuridad. El análisis de las muestras se hizo con un citómetro de flujo tipo FACScaliburTM (Becton Dickinson) utilizando el software CellQuestTM (Becton Dickinson). Los resultados obtenidos se evaluaron con el software de análisis FlowJo (Tree Star Inc.).

El ciclo celular también se analizó mediante microscopia de fluorescencia, haciendo recuento del número de núcleos y kinetoplastos que contiene cada célula. Para ello se utilizaron nuevamente las líneas PF y PF/RNAi, de las cuales se tomaron muestras tras mantenerlas en cultivo durante un periodo de seis días tras la inducción del RNAi con 1 µg/mL de doxiciclina. El experimento se realizó tres veces de forma independiente, y se contabilizaron al menos 100 células por experimento. Para cada muestra se recolectaron 10⁶ parásitos centrifugando durante 10 minutos a 1000 g y RT. A continuación las células se lavaron dos veces con TDB glucosa 1x, y seguidamente se fijaron durante 20 minutos en solución de lavado (PBS 1x pH 7,2 - Tween[®] 20 0,2 %) conteniendo un 4 % de p-formaldehído. La fijación se llevó a cabo sobre un portaobjetos previamente revestido con Poli-L-lisina 0,1 % durante 5 minutos para permitir la adhesión de los parásitos. Las preparaciones se lavaron dos veces con solución de lavado para detener la fijación, y seguidamente se montaron utilizando ProLong[®] Gold Antifade Reagent con DAPI (Life Technologies). Las imágenes fueron adquiridas con un microscopio Zeiss Axiophot (Carl Zeiss, Inc.).

C.2.4. Técnicas para el estudio de *TbEndoV* en células de *T. brucei*

C.2.4.1. Construcción de plásmidos

Para el silenciamiento de *TbEndoV* mediante doble reemplazamiento alélico se generaron tres plásmidos diferentes conteniendo cada uno de ellos un gen de resistencia a los siguientes fármacos: puromicina, fleomicina y blasticidina. Para conseguir la recombinación en el locus de *TbEndoV*, los genes de resistencia se flanquearon con 500 pares de bases de las regiones no traducidas (UTR, *untranslated regions*) en 3' y 5' de *TbEndoV*. Tanto los genes de resistencia como las UTR se amplificaron con cebadores solapantes entre sí (Tabla C2), de modo que los fragmentos se fusionaron mediante PCR. El fragmento final obtenido se clonó en pGEM-T para su producción en bacterias *E. coli* XL1Blue.

Por otro lado, para el silenciamiento de *TbEndoV* mediante RNA de interferencia se diseñaron dos plásmidos que permitían realizar esta técnica mediante la generación de una estructura tallo-lazo. Para ello se utilizaron dos regiones no solapantes del ORF de *TbEndoV*, una de 400 pares de bases, entre las posiciones 29 y 428 del gen, amplificada con los cebadores DGC5 y DGC6; y otra de 477 pares de bases, entre las posiciones 438 y 914 del gen, y amplificada con los cebadores DGC7 y DGC8. Los fragmentos se clonaron en el vector pGR19 utilizando los sitios de restricción *ApaI* y *HindIII* en primer lugar, y *HpaI* y *BamHI* a continuación. Así cada fragmento se clonó dos veces en el vector, en sentidos opuestos y separados por la región *stuffer* que permite la formación de la estructura tallo-lazo.

Por último, para la expresión de la copia ectópica de *TbEndoV* se generaron dos construcciones diferentes. La primera permite expresar la proteína de forma nativa. En este caso, el ORF de *TbEndoV* fue amplificado con los cebadores VCA43 y VCA44, que permiten su clonación en el vector pGRV23b utilizando los sitios de restricción *NdeI* y *BamHI*. La segunda construcción permite la expresión de *TbEndoV* fusionada al epítipo *myc*. Para ello el ORF de *TbEndoV* sin el codón de stop se amplificó con los cebadores VCA43 y DGC55, que permiten su clonación en el vector pGRV33 utilizando los sitios de restricción *NdeI* y *HpaI*.

C.2.4.2. Infección de ratones C57BL/6 con cepas de *T. brucei*

Los estudios *in vivo* se llevaron a cabo en la Unidad de Experimentación Animal del Instituto de Parasitología y Biomedicina López-Neyra. Los ratones utilizados, del tipo C57BL/6 y con 6-8 semanas de vida, se infectaron vía intraperitoneal con un total de $5 \cdot 10^3$ parásitos diluidos a una concentración de $5 \cdot 10^4$ parásitos/mL en PBS 1x estéril. Para la infección se utilizaron las cepas monomórficas de *T. brucei* BF y BF/EV-KO. Tras la infección se monitorizó la parasitemia de cada individuo a partir de sangre extraída cada día de la cola. El recuento parasitario se realizó utilizando cámaras de Neubauer desechables (Kova®).

RESULTADOS

D. RESULTADOS

D.1. CARACTERIZACIÓN ENZIMÁTICA DE LA ENDONUCLEASA V DE *Trypanosoma brucei* (*TbEndoV*)

D.1.1. Identificación de un ortólogo de endonucleasa V en el genoma de *T. brucei*

Utilizando la secuencia de la EndoV humana como punto de partida se realizó una búsqueda de secuencias relacionadas en la base de datos del genoma de *T. brucei* (GeneDB). Como resultado, se encontró una proteína anotada como endonucleasa V putativa (Tb927.10.6860), compuesta por 316 aminoácidos y con un peso molecular estimado de 34,9 kDa. La secuencia obtenida se alineó con ortólogos caracterizados de seis especies diferentes utilizando ClustalOmega (Goujon et al. 2010; Sievers et al. 2011; McWilliam et al. 2013).

El alineamiento, que incluye organismos eucariotas y procariotas, se visualizó posteriormente en JalView con el esquema de colores de Clustal y un umbral del 50 % (Fig. D1). Los organismos incluidos son: *H. sapiens*, *M. musculus*, *P. furiosus*, *B. subtilis*, *E. coli* y *T. maritima*. Los resultados muestran que *TbEndoV* conserva motivos identificados como esenciales para la actividad endonucleasa en *T. maritima* (Huang et al. 2002): la tirosina en posición 133 (Tyr133), responsable de la interacción enzima-sustrato; la tríada Asp95-Glu142-Asp170 cuya función es la interacción con el cofactor metálico durante la catálisis; y la lisina en posición 199 (Lys199), que interviene en la interacción enzima-producto. En general, *TbEndoV* muestra una mayor semejanza con las enzimas eucarióticas, y en especial con el ortólogo humano, que con los componentes procariotas de la familia EndoV (Tabla D1).

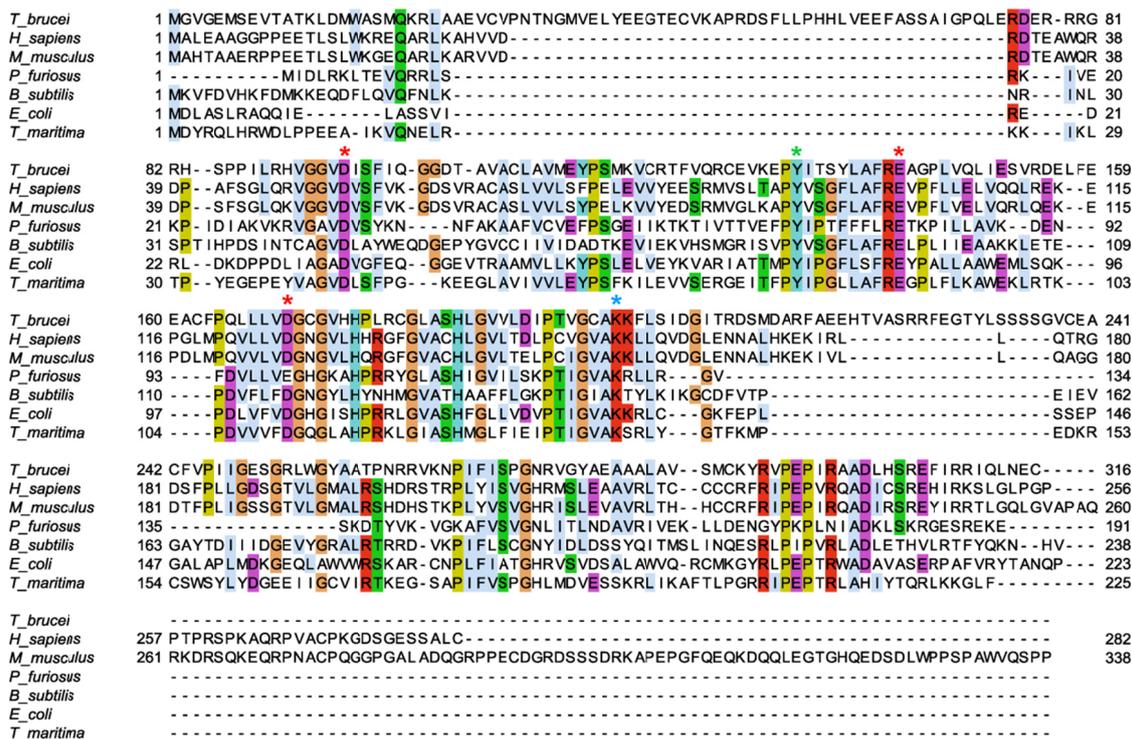


Figura D1. Alineamiento de la endonucleasa V de varios organismos incluyendo *T. brucei*.

Alineamiento realizado con ClustalOmega y visualizado con JalView. Los asteriscos rojos señalan los aminoácidos involucrados en la interacción con el cofactor metálico. Los aminoácidos encargados de la interacción enzima-sustrato están indicados con asteriscos verdes y los aminoácidos involucrados en la interacción enzima-producto están indicados con asteriscos azules. Las secuencias de los diferentes ortólogos han sido obtenidas de la base de datos RefSeq (NCBI): *T. brucei*, *Trypanosoma brucei* (XP_822927.1); *H. sapiens*, *Homo sapiens* (NP_775898.2); *M. musculus*, *Mus musculus* (NP_001158108.1); *P. furiosus*, *Pyrococcus furiosus* (AFN03782.1); *B. subtilis*, *Bacillus subtilis* (NP_391498.2); *E. coli*, *Escherichia coli* (NP_418426.2); *T. maritima*, *Thermotoga maritima* (NP_229661.1).

Ortólogo	Identidad (%)	Score (bits)	E value
<i>H. sapiens</i>	37	143	3×10^{-41}
<i>M. musculus</i>	37	145	4×10^{-41}
<i>P. furiosus</i>	37	81	9×10^{-19}
<i>B. subtilis</i>	26	72	9×10^{-15}
<i>E. coli</i>	33	105	1×10^{-27}
<i>T. maritima</i>	29	96	7×10^{-24}

Tabla D1. Índices de identidad obtenidos tras un análisis con BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*, NCBI) entre *TbEndoV* y los seis ortólogos de endonucleasa V utilizados para el alineamiento.

D.1.2. Expresión de *TbEndoV* en el sistema heterólogo *Escherichia coli*

Utilizando cebadores específicos (Tabla C2), la secuencia codificante de *TbEndoV* se amplificó y clonó en el vector de expresión pMAL-c2x (New England Biolabs) que permite obtener la proteína fusionada a la proteína de unión a maltosa (MBP, *maltose binding protein*) en el extremo amino-terminal. La cepa de *E. coli* TB1 se transformó con el vector resultante (pGC11). Empleando una pareja diferente de cebadores (Tabla C2), la secuencia de *TbEndoV* se amplificó y clonó también en el vector de expresión pET28 (Novagen), que permite la expresión de la proteína fusionada a una cola de histidinas. Con el vector resultante (pGC7) se transformó la cepa de *E. coli* BL21 (DE3).

Las cepas transformadas TB1 y BL21 (DE3) se cultivaron hasta alcanzar una densidad de $2 \cdot 10^8$ células/ml ($A_{600} \sim 0.5$) en medio LB con glucosa y ampicilina o en LB con ampicilina, respectivamente. En ambos casos, la expresión de *TbEndoV* se indujo añadiendo isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) a una concentración final de 0.3 mM. Los cultivos se incubaron en agitación en dos condiciones diferentes: a 37 °C durante 2 horas y a 16 °C durante 16 horas. Las bacterias se recogieron por centrifugación y los pellets se resuspendieron en tampón para su posterior sonicación.

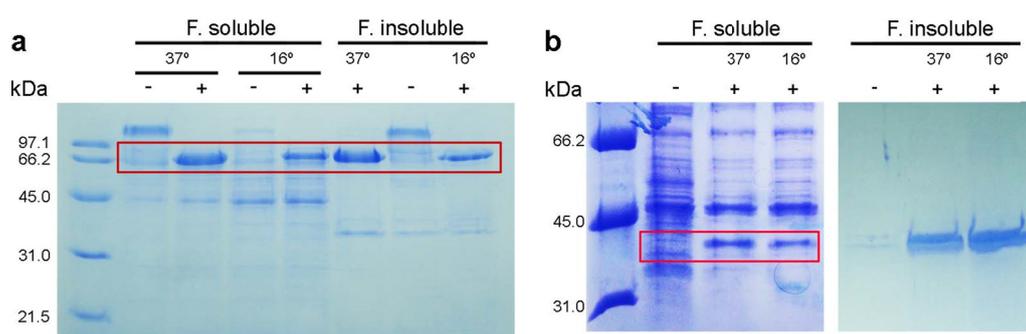


Figura D2. Análisis mediante SDS-PAGE de las condiciones de expresión de *TbEndoV*.

(a) Condiciones experimentales para la expresión de MBP-*TbEndoV*. Los extractos celulares, obtenidos a partir de cultivos suplementados (+) o no (-) con IPTG, se separaron en fracción soluble e insoluble. **(b)** Condiciones experimentales para la expresión de His-*TbEndoV*. Los extractos celulares se separaron en fracción soluble e insoluble.

Se obtuvieron los extractos de proteína en dos fracciones, una soluble y otra insoluble. Las fracciones se analizaron mediante SDS-PAGE en geles de acrilamida al 15 % (Fig. D2a,b). Las proteínas de fusión MBP-*TbEndoV* (77,4 kDa) e His-*TbEndoV* (36,0 kDa) se expresaron en las distintas condiciones ensayadas observándose en las correspondientes fracciones solubles.

D.1.3. Generación de un mutante catalítico D95A mediante mutagénesis dirigida

Con el objetivo de descartar una posible contaminación con la EndoV bacteriana durante el proceso de purificación, se generó el mutante catalítico D95A. El ácido aspártico en la posición 95 está altamente conservado y es el responsable de coordinar al cofactor metálico durante la hidrólisis del sustrato (Dalhus et al. 2009). En varios organismos se ha descrito que la sustitución de este residuo por una alanina suprime la actividad endonucleasa de EndoV (Huang et al. 2002; Vik et al. 2013). La mutación D95A se generó mediante mutagénesis dirigida (QuikChange Lightning Multi Site-Directed Mutagenesis Kit, Agilent Technologies) empleando el vector pGC11 y utilizando cebadores diseñados con el cambio de base deseado en la secuencia de la proteína (Tabla C2), dando lugar al vector de expresión pGC11X. La expresión de la proteína mutante se realizó siguiendo el mismo procedimiento que con la proteína funcional fusionada a MBP.

D.1.4. Purificación de *TbEndoV* recombinante

La proteína fusionada a MBP se purificó desde un extracto obtenido a partir de 500 mL de cultivo de bacterias TB1 transformadas con pGC11 o pGC11X e incubados a 16 °C durante 16 horas. El extracto se incubó con resina de amilosa durante 4 horas en rotación y a una temperatura de 4 °C para su purificación por cromatografía de afinidad (apartado C.2.2.3). Tras su elución, las fracciones 2, 3 y 4 (Fig. D3a), que contenían la mayor parte de la proteína, se combinaron en una sola preparación. Tras sustituir el

tampón de elución por uno de almacenamiento, la proteína se guardó a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su utilización.

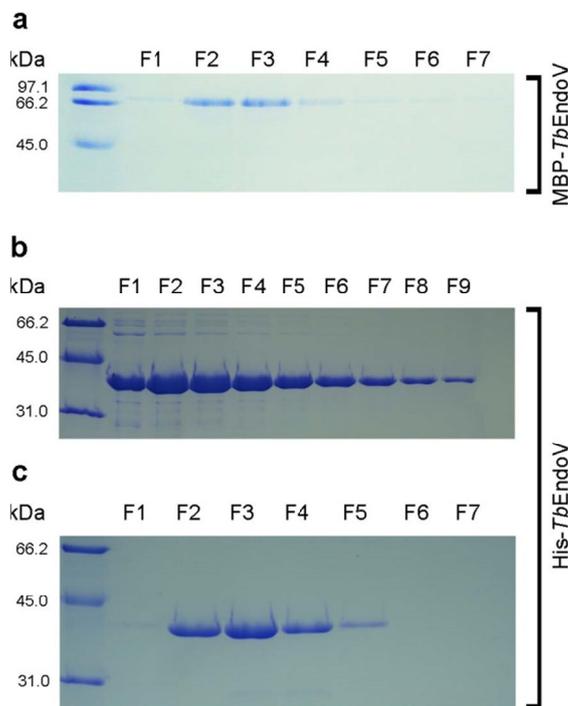


Figura D3. Análisis mediante SDS-PAGE de la purificación de *TbEndoV*. (a) Fracciones (F) obtenidas tras la purificación de la proteína fusionada a MBP mediante cromatografía de afinidad a amilosa. (b) Purificación de His-*TbEndoV* mediante cromatografía de afinidad a níquel. (c) Fracciones obtenidas tras su purificación mediante intercambio aniónico.

La purificación de la proteína de fusión His-*TbEndoV* se realizó en dos pasos cromatográficos: afinidad e intercambio aniónico. Los extractos se obtuvieron a partir de la sonicación de un pellet de bacterias obtenido de un cultivo incubado a $16\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 16 horas. La purificación se inició mediante cromatografía de afinidad a níquel empleando una columna HiTrap Chelating HP (GE Healthcare) acoplada a un equipo FPLC (Pharmacia). Las fracciones obtenidas (Fig. D3b) se combinaron y el tampón se sustituyó antes de proceder al segundo paso de purificación mediante intercambio iónico, para el cual se empleó una columna MonoQ 5/50 GL (GE Healthcare) acoplada a un sistema de HPLC ÄKTAbasic (GE Healthcare). Las fracciones que contenían la mayor parte de la proteína (Fig. D3c) se combinaron y el tampón de elución se sustituyó por tampón de almacenamiento.

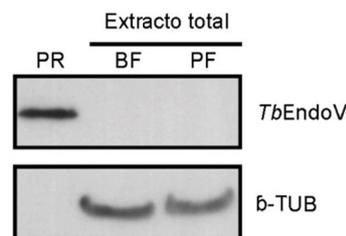
D.1.5. Identificación de *TbEndoV* mediante Huella de Masas Peptídicas

La identidad de la proteína purificada se confirmó mediante un análisis de Huella de Masas Peptídicas (*Peptide Mass Fingerprinting*, PMF) en el Servicio Proteómica del I.P.B López-Neyra. La banda correspondiente al tamaño esperado de la proteína obtenida durante la purificación se analizó mediante un espectrómetro de masas MALDI TOF/TOF modelo UltrafleXtreme de Bruker. El espectro de masas obtenido se utilizó para identificar las proteínas en las bases de datos de *T. brucei* y Swiss-Prot con filtro para *E. coli* mediante el uso de MASCOT (Matrix Science) como motor de búsqueda. El resultado, con una cobertura de secuencia del 32,9 %, concluye la identificación de una única proteína de 34,9 kDa anotada como endonucleasa V en la base de datos de *T. brucei*.

D.1.6. Obtención de anticuerpos policlonales frente a *TbEndoV*

Con el fin de obtener anticuerpos policlonales frente a *TbEndoV* se inmunizó un conejo utilizando la proteína recombinante soluble His-*TbEndoV*. Tras recoger el suero inmunizado, el anticuerpo se purificó mediante afinidad empleando la proteína purificada acoplada a una resina Affi-Gel[®]15. La validez del anticuerpo fue confirmada por western blot mediante la detección de proteína purificada (20 ng). En cambio, en extractos de *T. brucei* la proteína endógena no pudo detectarse debido tal vez a un bajo nivel de expresión de EndoV (Fig. D4).

Figura D4. Validación del anticuerpo anti-*TbEndoV* mediante western blot. PR, proteína recombinante purificada (20 ng). Los extractos celulares se obtuvieron a partir de $5 \cdot 10^6$ parásitos de la forma sanguínea (BF) y de la forma procíclica (PF). β -tubulina (β -TUB), control de carga.



D.1.7. *TbEndoV* es una ribonucleasa con actividad sobre hipoxantina

Para caracterizar la actividad catalítica de *TbEndoV* en primer lugar se incubó la enzima con distintos sustratos de DNA que portan una lesión en la posición central, bien uracilo (U) o hipoxantina (Hx). Los oligonucleótidos (Tabla C3) de cadena sencilla (ss, *single strand*) de 21 bases se marcaron con P³² en su extremo 5', y los oligonucleótidos complementarios para formar los sustratos de cadena doble (ds, *double strand*) se diseñaron para generar pares Hx:T (dsDNA dI:dT) o Hx:C (dsDNA dI:dC) y U:G (dsDNA dU:dG) o U:A (dsDNA dU:dA).

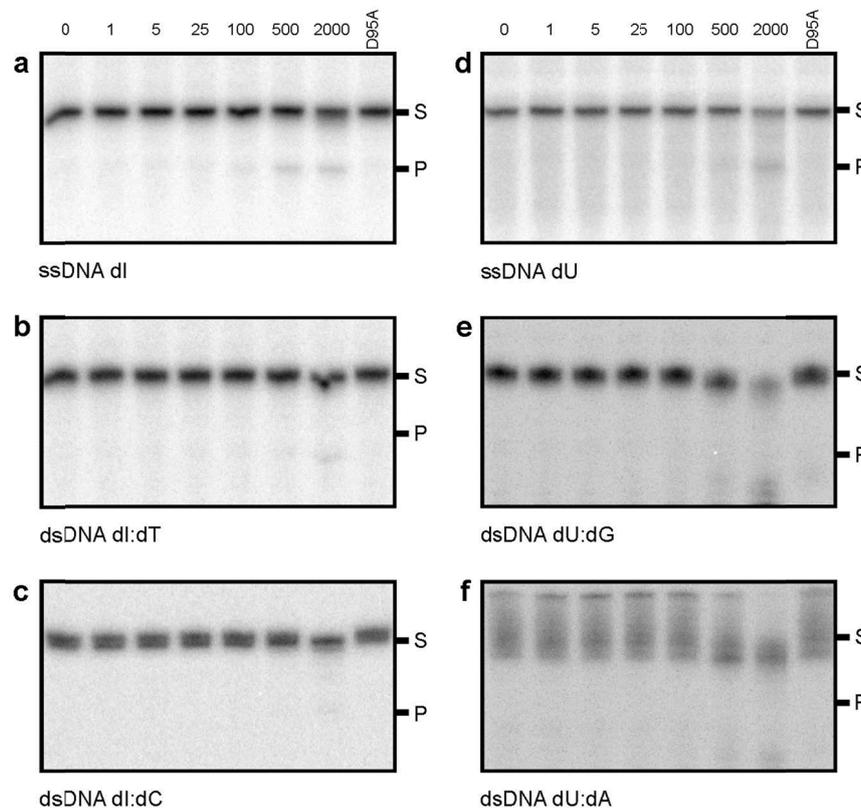


Figura D5. *TbEndoV* muestra baja o ninguna actividad sobre sustratos de DNA. Oligonucleótidos de DNA en cadena sencilla (ssDNA) o cadena doble (dsDNA), que portan Hx (a-c) o U (d-f) en posición central, se incubaron con concentraciones crecientes de *TbEndoV* (0 - 2000 nM, como se indica en las figuras). El producto de la reacción se analizó mediante electroforesis en geles desnaturalizantes de poliacrilamida al 20 % (19:1). Se indica la posición del sustrato (S) y el producto (P). El mutante catalítico D95A se utilizó como control negativo.

Estos apareamientos mimetizan posibles sustratos fisiológicos procedentes de la desaminación de adenina y citosina, en el caso de los pares Hx:T y U:G, respectivamente. Mientras que los pares Hx:C y U:G se producirían como resultado de la incorporación errónea de Hx y U durante la replicación. En general, *TbEndoV* muestra baja o ninguna actividad endonucleasa sobre DNA (Fig. D5). En el caso de la Hx, *TbEndoV* presenta cierta actividad sobre ssDNA dI y dsDNA dI:dT (Fig. D5a,b), y prácticamente ninguna sobre dsDNA dI:dC (Fig. D5c). Por otro lado, se detectó cierta actividad sobre U en ssDNA (Fig. D5d) a altas concentraciones de enzima pero no sobre los sustratos de DNA de doble cadena (Fig. D5e,f). El mutante D95A no presentaba actividad alguna en ninguno de los casos, demostrando que la actividad observada es intrínseca a *TbEndoV*.

Mientras que la EndoV bacteriana presenta actividad endonucleasa significativa sobre sustratos de DNA y de RNA, la EndoV humana sólo procesa de manera eficiente Hx en sustratos de RNA (Morita et al. 2013; Vik et al. 2013). Para evaluar la actividad endonucleasa de la enzima de *T. brucei* sobre RNA, *TbEndoV* se incubó con un oligorribonucleótido (Tabla C3) de 21 bases, con una Hx en posición central (ssRNA rI). Al igual que con los sustratos de DNA, se diseñaron cadenas complementarias a este oligonucleótido para generar sustratos de cadena doble donde la Hx queda enfrentada tanto a uracilo (dsRNA rI:rU) como a citosina (dsRNA rI:rC). Ciertamente, *TbEndoV* procesa de forma muy eficiente RNA de cadena sencilla con Hx (Fig. D6a, f, g), aunque no muestra ninguna actividad significativa sobre los sustratos de cadena doble (Fig. D6b, c, g). Como esperábamos, la incubación con el mutante D95A no generó ningún producto de reacción.

Adicionalmente, se contempló la posibilidad de que la incorporación de Hx se produzca en la hebra de RNA naciente durante la transcripción, dando lugar a híbridos DNA:RNA en los que quedaría enfrentada a citosina (dsRNA:DNA rI:dC). No obstante, los ensayos no revelaron ninguna actividad endonucleasa relevante de *TbEndoV* sobre este sustrato (Fig. D6d, g). Solo se encontró cierto grado de actividad frente a un

sustrato semejante en el que el ribonucleótido de Hx queda enfrentado a un desoxirribonucleótido de timina (dsRNA:DNA rI:dT) (Fig. D6e, g).

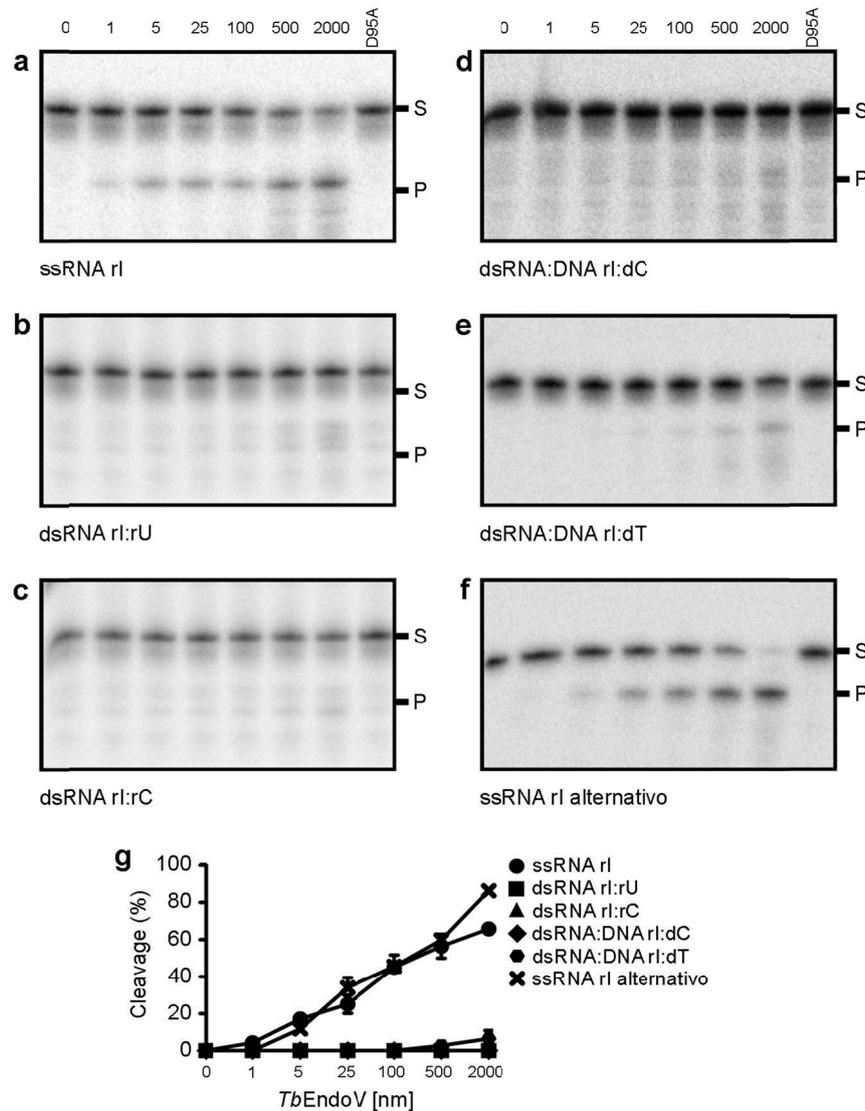


Figura D6. *TbEndoV* procesa eficientemente hipoxantina en RNA. Oligonucleótidos de RNA en cadena sencilla (a,f), cadena doble (b,c) o híbridos con cadenas complementarias de DNA (d,e), y portando Hx en la posición central, se incubaron con concentraciones crecientes de *TbEndoV* (0 - 2000 nM, como se indica en las figuras). Los productos de reacción se resolvieron mediante electroforesis en geles desnaturalizantes de poliacrilamida 20 % (19:1). Se indica la posición del sustrato (S) y el producto (P). El mutante catalítico D95A se utilizó como control negativo. (e) Cuantificación de los datos representados en (a - d). Cada punto representa la media (\pm SD) de tres experimentos independientes.

Es interesante remarcar que en ninguna de las condiciones probadas *TbEndoV* fue capaz de catalizar el corte del sustrato completamente, ni siquiera a la máxima concentración de enzima (2000 nM). Esto sólo se fue posible al emplear un sustrato de secuencia diferente (Fig. D6f, g), lo que indica que el reconocimiento y/o la incisión del sustrato depende de su secuencia y apoya la idea de que la estructura secundaria del sustrato podría ser un factor determinante de la actividad de *EndoV*.

Por último, dado el amplio abanico de sustratos que reconocen los componentes procariotas de la familia *EndoV*, se consideró la posibilidad de que *TbEndoV* estuviera actuando sobre otro tipo de lesiones en DNA. Sin embargo, en nuestros ensayos no se encontró actividad significativa frente a distintos tipos de lesiones tales como 8-oxoguanina, residuos de tetrahidrofurano (que mimetizan sitios abásicos), 5'-hidroxi-2'-desoxiuridina o 5'6'-dihidrouracilo, daños provocados por estrés oxidativo y nitrosativo (Fig. D7).

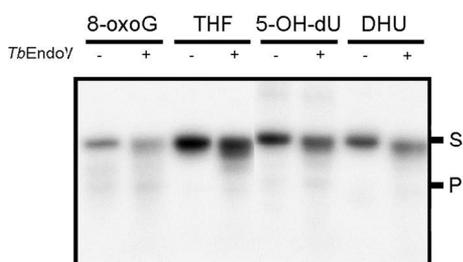


Figura D7. Actividad de *TbEndoV* sobre diferentes lesiones en DNA. Oligonucleótidos de DNA en cadena sencilla portando 8-oxoguanina (8-oxoG), tetrahidrofurano (THF), 5'-hidroxi-2'-desoxiuridina (5-OH-dU) o 5'6'-dihidrouracilo (DHU) en la posición central se incubaron con un exceso de *TbEndoV* (2000 nM). Los productos de

reacción se resolvieron mediante electroforesis en geles desnaturalizantes de poliacrilamida 20 % (19:1). Se indica la posición del sustrato (S) y el producto (P).

D.1.8. Condiciones óptimas de reacción de *TbEndoV*

Las condiciones óptimas para la actividad *in vitro* de *TbEndoV* se establecieron utilizando un sustrato de RNA de cadena sencilla con una hipoxantina en la posición central (RNA rI, Tabla C3). *EndoV* es una endonucleasa dependiente de cofactor metálico (Gates and Linn 1977). La caracterización bioquímica de ortólogos de *EndoV* de otros organismos nos muestra que el pH adecuado para la reacción oscila entre 7 y 9 dependiendo del metal utilizado (Mi et al. 2011; Vik et al. 2013).

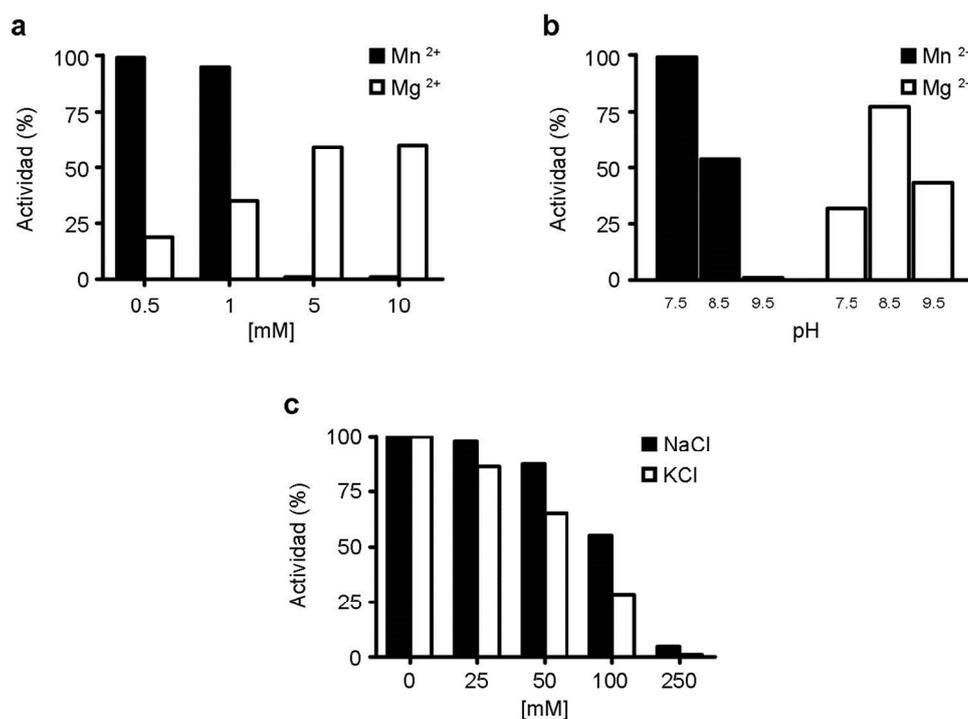


Figura D8. Análisis de las condiciones de reacción para la actividad endonucleasa de *TbEndoV*. Un oligonucleótido de RNA portando una inosina en la posición central se incubó con *TbEndoV* (100 nM) en diferentes condiciones de reacción: **(a)** efecto de la concentración y naturaleza del cofactor metálico (Mg^{2+} o Mn^{2+}) a pH 7,5; **(b)** efecto del pH en presencia de Mg^{2+} (0,5 mM) o de Mn^{2+} (10 mM); **(c)** efecto de la fuerza iónica sobre la actividad empleando diferentes concentraciones de NaCl o KCl.

La actividad de *TbEndoV* a pH 7,5 es mayor a bajas concentraciones Mn^{2+} (0,5-1 mM) o a altas de Mg^{2+} (5-10 mM), aunque en términos absolutos el Mn^{2+} es el cofactor metálico preferido (Fig. D8a). En presencia de Mn^{2+} (0,5 mM), el pH óptimo es 7,5 mientras que utilizando Mg^{2+} (10 mM) como cofactor, la actividad enzimática es máxima a un pH de 8,5 (Fig. D8b). Por otro lado, la presencia de NaCl o KCl inhibe la actividad (Fig. D8c), por lo que finalmente se dejaron fuera de la mezcla de reacción.

D.1.9. Análisis de los determinantes de sustrato para la actividad endonucleasa de *TbEndoV*

EndoV hidroliza el segundo enlace fosfodiéster en 3' de la lesión (Yao et al. 1994). Este corte tan peculiar se explica por su estructura, en la cual el sitio de unión al sustrato y el sitio activo están separados (Dalhus et al. 2009), aunque su significado

funcional aún no se conoce. En procariotas, EndoV es capaz de procesar DNA y RNA con similar eficiencia. Por el contrario, tanto la enzima de mamíferos (Morita et al. 2013; Vik et al. 2013) como la de *T. brucei*, tienen una fuerte preferencia por RNA sobre DNA. Esto indica que el grupo 2'-hidroxilo ausente en la desoxirribosa es necesario para la eficiencia catalítica de EndoV.

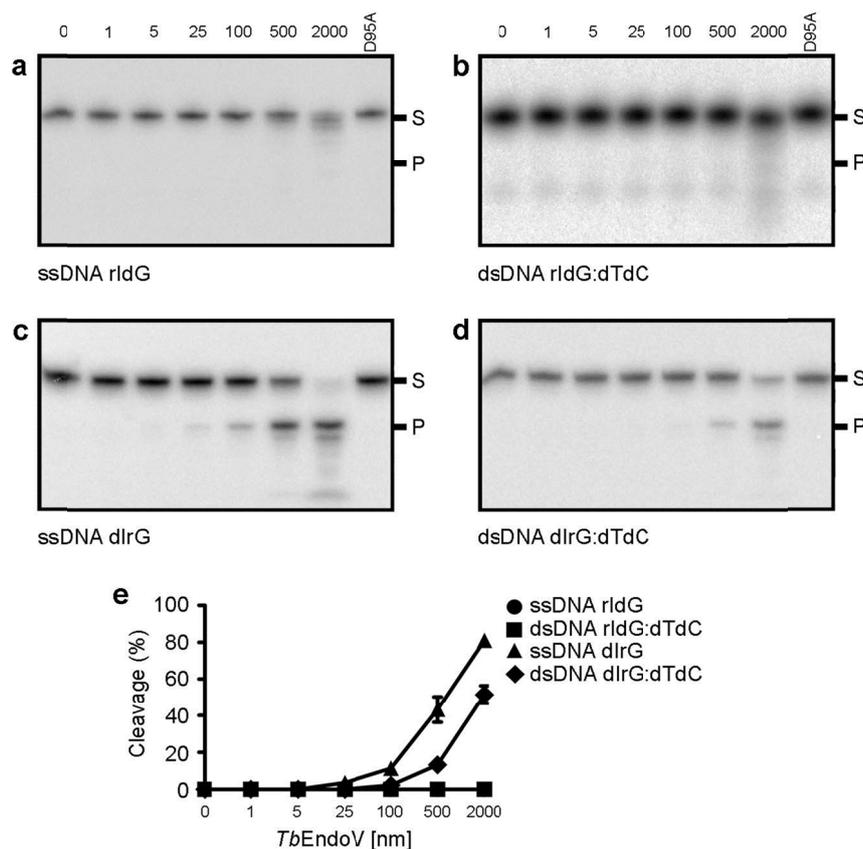


Figura D9. La presencia de un ribonucleótido en 3' de la base desaminada es esencial para la actividad de *TbEndoV*. (a, b) Oligonucleótidos de DNA de cadena sencilla o doble con riboinosina o (c, d) desoxiinosina seguida en 3' por un ribonucleótido se incubaron con concentraciones crecientes de *TbEndoV* (0 - 2000 nM, como se indica en las figuras). El producto de la reacción se resolvió mediante electroforesis en geles desnaturalizantes de poliacrilamida 20 % (19:1). Se indica la posición del sustrato (S) y el producto (P). El mutante catalítico D95A se utilizó como control negativo. (e) Cuantificación de los datos representados en (a - d). Cada punto representa la media (\pm SD) de tres experimentos independientes.

Con el fin de establecer los determinantes de sustrato necesarios para la actividad de *TbEndoV*, diseñamos oligonucleótidos de DNA en los cuales la lesión

(Hx), o la base en 3' de la lesión, es un ribonucleótido (Tabla C3). Los ensayos de actividad revelaron que TbEndoV no corta los sustratos de DNA portando riboinosina y seguidos en 3' por una desoxirribosa (ssDNA rIdG y dsDNA rIdG:dTdC) (Fig. D9a, b, e). En cambio, un desoxirribonucleótido de inosina seguido en 3' por un ribonucleótido (ssDNA dIrG y dsDNA dIrG:dTdC) si es procesado de manera eficiente por TbEndoV, tanto si el sustrato es de cadena sencilla o doble (Fig. D9c, d, e) aunque el proceso es más eficiente en el caso de la cadena sencilla.

D.1.10. TbEndoV actúa sobre inosina en sustratos tRNA

En *T. brucei* se ha caracterizado una adenina desaminasa implicada en la edición de tRNA (ADAT) esencial para la supervivencia del parásito (Rubio et al. 2007). El tRNA correspondiente al amino ácido treonina (tRNA^{Thr}) posee tres isoaceptores codificados en el genoma (5'-AGU, UGU, CGU-3') de *T. brucei*. La lectura del cuarto codón que codifica este aminoácido en el código genético (5'-ACC-3') depende de la desaminación de la adenina en la posición *wobble* del anticodón 5'-AGU- 3'. Existen hasta 8 especies de tRNA (alanina, arginina, isoleucina, leucina, prolina, serina, treonina y valina) en la misma situación en *T. brucei*, por lo que la correcta traducción de las proteínas depende en gran medida de este proceso de edición. La inosina en la posición *wobble* se genera de forma continua y se encuentra en cadena sencilla, lo que podría hacerla susceptible de ser procesada por *TbEndoV* y constituir uno de sus sustratos fisiológicos.

Para comprobar si *TbEndoV* es capaz de procesar este tipo de sustratos se generaron versiones truncadas del tRNA^{Thr} con la secuencia del brazo del anticodón portando adenina o inosina en la posición *wobble* (Tabla C3). Como muestra la Fig. 10, *TbEndoV* cataliza la incisión de la molécula de tRNA cuando la adenina (tRNA^{Thr} C₃₂A₃₄) es sustituida por Hx (tRNA^{Thr} C₃₂I₃₄) en la posición *wobble* (Fig. D10a, b, e).

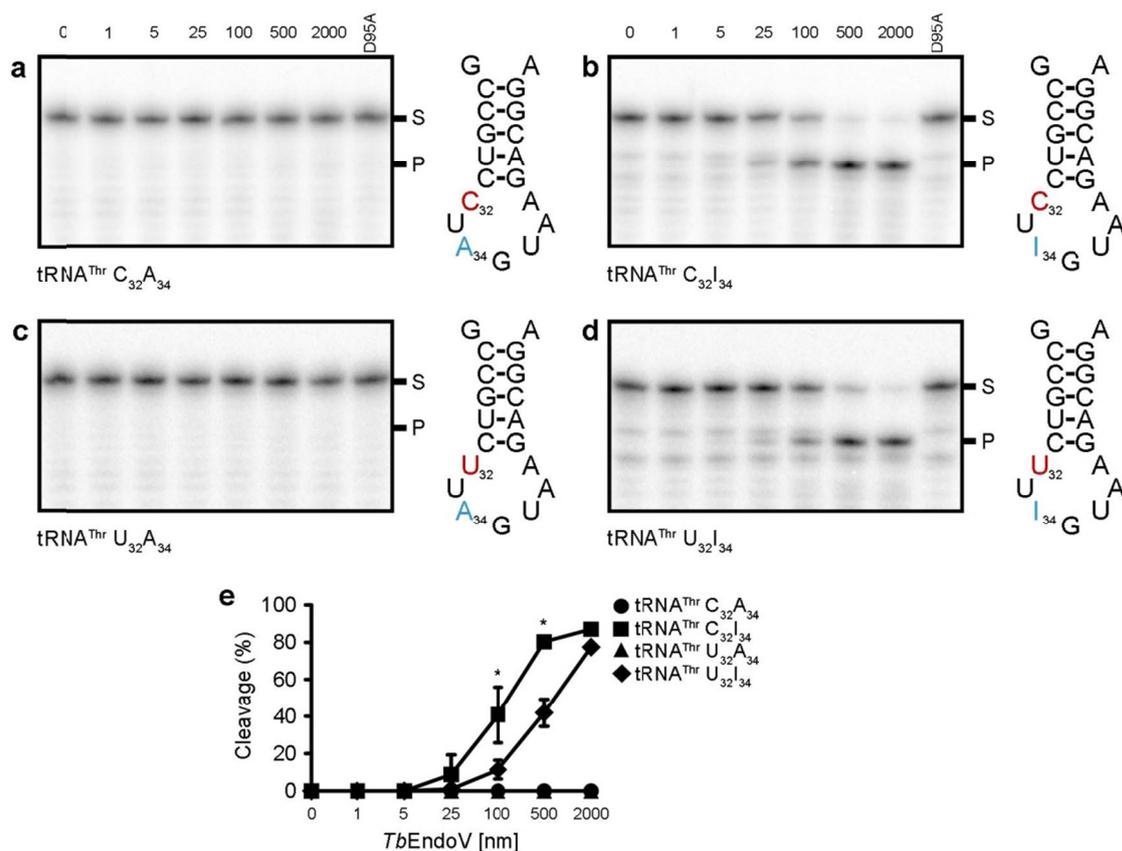


Figura D10. *TbEndoV* procesa eficientemente inosina en sustratos que emulan la estructura de RNA transferentes. Dos posiciones (citocina 32 y adenina 34) son editadas en el tRNA de la treonina en *T. brucei*. *TbEndoV* (0 - 2000 nM, como se indica en las figuras) se incubó con los siguientes sustratos que mimetizan los distintos grados de edición: **(a)** Oligonucleótidos de RNA con la secuencia correspondiente al brazo del anticodón del aminoácido de la treonina con el anticodón en su forma nativa; **(b)** con inosina en posición 34; **(c)** con uracilo en posición 32; **(d)** y con ambas posiciones editadas. Los productos de reacción se analizaron mediante electroforesis en geles desnaturalizantes de poliacrilamida 20 % (19:1). Se indica la posición del sustrato (S) y el producto (P). El mutante catalítico D95A se utilizó como control negativo. **(e)** Cuantificación de los datos representados en (a - d). Cada punto representa la media (\pm SD) de tres experimentos independientes. Los asteriscos señalan diferencias significativas calculadas mediante la prueba *t* de Student: * $p < 0,05$.

Adicionalmente, se ha descrito que la desaminación de A₃₄ se ve estimulada por la desaminación de la citosina en la posición 32 del tRNA^{Thr} (Rubio et al. 2006). Para comprobar el efecto que la presencia de U en esta posición pueda tener en la actividad de *TbEndoV* generamos sustratos con dicha modificación en combinación con adenina o inosina (tRNA^{Thr} U₃₂A₃₄ y tRNA^{Thr} U₃₂I₃₄). Nuestros resultados indican que la

presencia de uracilo tiene un efecto negativo en la capacidad de *TbEndoV* para procesar este tipo de sustratos, lo que sugiere que la desaminación de citosina en posición 32 puede ser un mecanismo para inhibir el procesamiento de tRNAs editados en la posición 32 (Fig. D10c, d, e).

D.2. PAPEL BIOLÓGICO DE *TbEndoV*

D.2.1. Generación de líneas deficientes en *EndoV*

Con el objetivo de estudiar la relevancia de *EndoV* en la biología de *T. brucei* se generaron líneas de tripomastigotes sanguíneos y procíclicos deficientes en *EndoV*. Mientras que en células procariotas se ha postulado que *Endo V* tiene un papel importante en la ruta alternativa de reparación por escisión de bases, en células eucariotas *Endo V* parece tener una función preponderante en la incisión de RNA. En nuestro caso *TbEndoV* parece tener como sustrato preferencial el RNA de cadena simple aunque no se puede descartar su papel en DNA. La generación de mutantes defectivos en *EndoV* permite disponer de una herramienta muy útil para analizar su función celular en las distintas formas de vida del parásito. Para la inactivación de *TbEndoV* se realizó un doble reemplazamiento alélico. Para ello, se diseñaron tres construcciones en las cuales el gen de resistencia a fleomicina, puromicina o blastomicina estaba flanqueado por 500 pares de bases de las regiones no traducidas (*untranslated regions, UTRs*) situadas en 5' y 3' de *EndoV* en el genoma de *T. brucei*. El reemplazamiento alélico de *TbEndoV* se consiguió mediante recombinación de la construcción en las zonas UTR de los parásitos transfectados, los cuales fueron seleccionados añadiendo blastomicina, fleomicina o puromicina al medio.

Para obtener las líneas KO de *TbEndoV*, las líneas parentales de ambas formas se transfectaron secuencialmente con las construcciones linearizadas, tras lo cual los clones recombinantes se seleccionaron en presencia del antibiótico apropiado. La integración de los marcadores de selección se confirmó por PCR empleando cebadores

que hibridaban en 5' o 3' del cassette de inactivación de *TbEndoV* en combinación con cebadores específicos del marcador de selección (Tabla C3). La primera ronda de transfecciones en parásitos de la formas sanguínea y procíclica dieron lugar a clones resistentes a puromicina que habían integrado correctamente el correspondiente marcador de selección. Uno de estos clones de cada forma fue seleccionado para una segunda ronda de transfección con un cassette de inactivación con fleomicina (tripomastigotes sanguíneos) o blasticidina (procíclicos) como marcadores de selección.

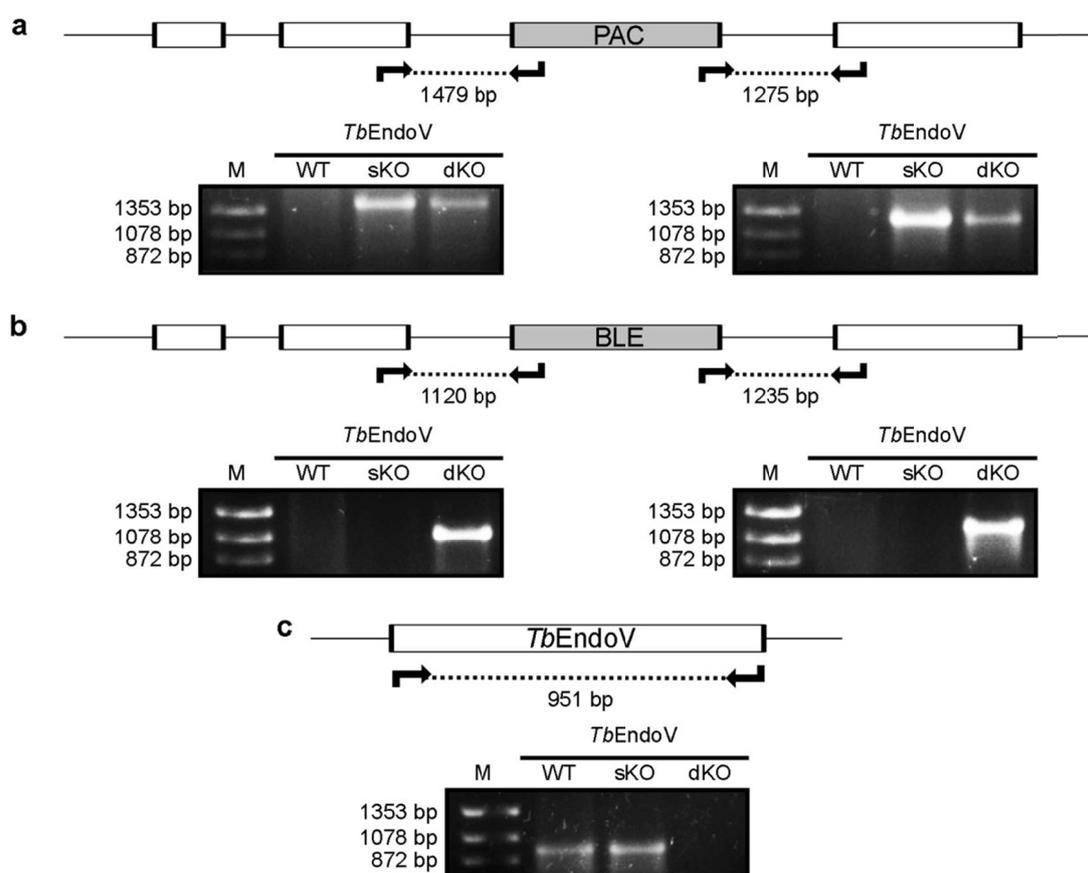


Figura D11. Comprobación mediante PCR del doble reemplazamiento alélico de *TbEndoV* en parásitos de la forma sanguínea. (a) Producto de PCR sobre DNA genómico de células donde uno de los alelos de *TbEndoV* ha sido reemplazado por el gen de resistencia a puromicina o (b) fleomicina. Los cebadores utilizados producen fragmentos de 1470 y 1275 pares de bases en el caso de la puromicina, y fragmentos de 1120 y 1235 pares de bases en el caso de la fleomicina. (c) La amplificación con cebadores específicos para el ORF de *TbEndoV* resulta positiva cuando utilizamos DNA genómico de células parentales o con un único alelo (sKO) de *TbEndoV*, y negativa sobre DNA genómico de células con ambos alelos reemplazados (dKO).

En la forma sanguínea, ambos alelos fueron reemplazados de forma satisfactoria. Los marcadores de selección se insertaron en ambos *loci* de *TbEndoV* (Fig. D11a,b), y no fue posible amplificar el ORF de la proteína mediante PCR (Fig. D11c). Así mismo, no se detectó expresión de *TbEndoV* mediante PCR cuantitativa sobre RNA total (Fig. D13a). Se estableció así una línea KO deficiente en EndoV en la forma sanguínea de *T. brucei*, lo que indica que esta enzima no es esencial en esta forma del parásito en condiciones de cultivo axénico.

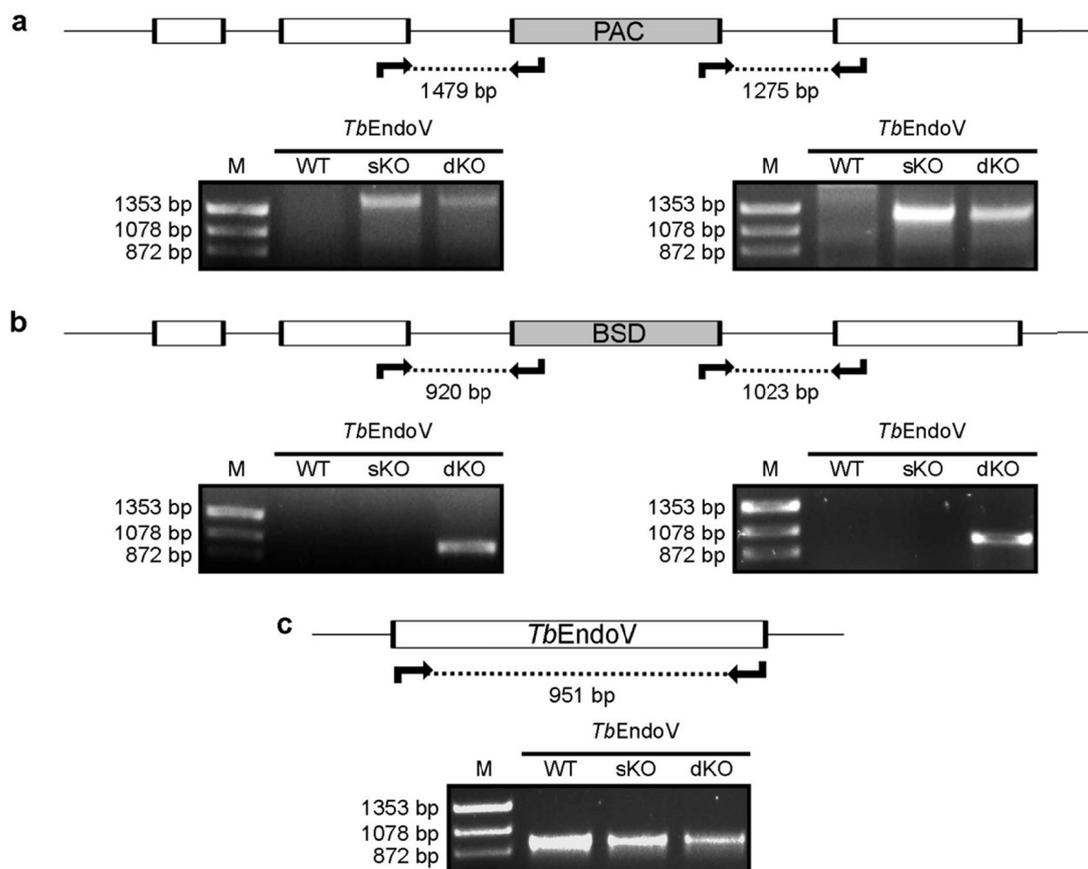


Figura D12. Comprobación mediante PCR del doble reemplazamiento alélico de *TbEndoV* en parásitos de la forma procíclica. (a) Producto de PCR sobre DNA genómico de células donde uno de los alelos de *TbEndoV* ha sido reemplazado por el gen de resistencia a puromicina o (b) blasticidina. Los cebadores utilizados producen fragmentos de 1470 y 1275 bp en el caso de la puromicina, y fragmentos de 920 y 1023 bp en el caso de la blasticidina. (c) La amplificación con cebadores específicos para el ORF de *TbEndoV* resulta positiva en todos los casos ya que el reemplazamiento alélico completo sólo se ha conseguido en presencia de una copia ectópica del gen.

En la forma procíclica, el reemplazamiento alélico completo no fue posible. Sólo se obtuvieron clones tras la segunda ronda de reemplazo alélico condicionados a la presencia de una copia ectópica del gen. Para esto último, células obtenidas tras la sustitución del primer alelo se transfectaron con una construcción de DNA que incluye además de un marcador de selección, el gen *TbEndoV*, cuya expresión se regula por doxiciclina y está flanqueado por secuencias que permiten la integración en regiones rDNA. La sustitución del segundo alelo se hizo en presencia de 1 µg/mL de doxiciclina para mantener la expresión de la copia ectópica de *TbEndoV*. Se obtuvieron clones en los cuales ambos marcadores se habían insertado de forma correcta (Fig. D12a,b), pero que contenían una copia ectópica del gen (Fig. D12c). Todos los clones seleccionados expresaban niveles de mRNA de *TbEndoV* semejantes a la línea parental desde la copia ectópica y de forma constitutiva incluso en ausencia de doxiciclina (Fig. D13b). En consecuencia, la línea celular obtenida no puede considerarse una línea KO *bona fide* deficiente en *TbEndoV*.

Dada la imposibilidad de generar el KO de *TbEndoV* en la forma procíclica de *T. brucei*, se procedió a suprimir la expresión del gen mediante interferencia mediada por RNA (RNAi). Para ello, una región de 477 pb del gen *TbEndoV* se amplificó y clonó en un vector de expresión en orientaciones opuestas flanqueando una secuencia de DNA denominada *stuffer*, que permite la formación de un RNA de estructura tallo-lazo. La expresión de este RNA está regulada mediante un promotor inducible con doxiciclina. Tras obtener transfectantes de RNAi, los niveles de expresión de *TbEndoV* se determinaron mediante PCR cuantitativa. Como muestra la Fig. D13, la eficiencia de este RNAi resultó ser muy reducida, reteniendo las células transfectadas más de un 80 % de la expresión de *TbEndoV* mRNA respecto a células control tras 6 días de inducción (Fig. D13c).

Conociendo la reducida eficacia del RNAi, se generó una segunda construcción de RNAi empleando una región de 400 pb sin solapamiento con la de la anterior construcción. En este caso se obtuvieron varios clones que mostraban una reducción

significativa en los niveles de mRNA (Fig. D13d) ($p < 0.05$). Los niveles de expresión se cuantificaron tras 2, 4 y 6 días de inducción del RNAi. La inhibición de la expresión llegó a ser de hasta el 60 % a los cuatro días.

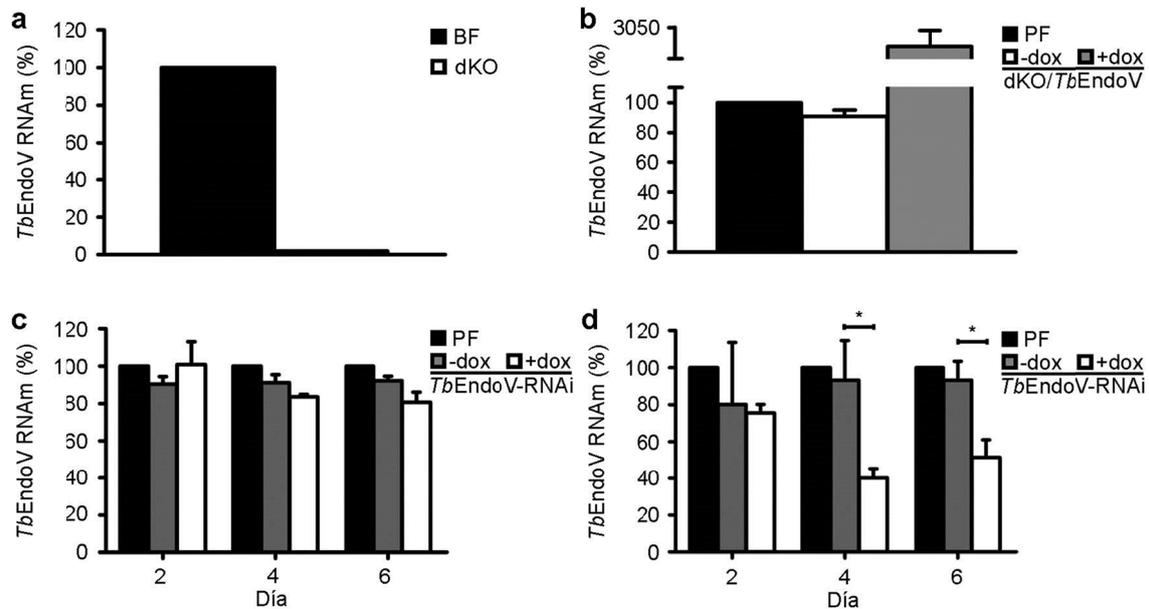


Figura D13. Medición de los niveles de mRNA de *TbEndoV* en células KO y RNAi. Niveles de mRNA de *TbEndoV* medidos mediante PCR cuantitativa utilizando RNA total de: (a) células sanguíneas dKO; (b) células procíclicas dKO con una copia ectópica inducible de *TbEndoV*; y (c,d) células procíclicas RNAi tras 2, 4 y 6 días de inducción utilizando 1 μ g/mL de doxiciplina. Los datos corresponden a la media (\pm SD) de tres experimentos independientes. Los asteriscos señalan diferencias significativas calculadas mediante una prueba *t* de Student: * $p < 0,05$.

D.2.2. Generación de líneas transgénicas que sobreexpresan *TbEndoV*

Con el fin de obtener líneas de tripomastigotes procíclicos y sanguíneos que sobreexpresaran *TbEndoV*, las cepas parentales de ambas formas se transfectaron con vectores de expresión con una copia inducible del gen *TbEndoV* o *TbEndoV* fusionado en C-terminal con el epítipo c-myc (*TbEndoV*-myc). Los altos niveles de proteína expresados por estas cepas permitieron su observación mediante western blot usando anti-*TbEndoV* (Fig. D14a,c,d) o anti-myc (Fig. D14b).

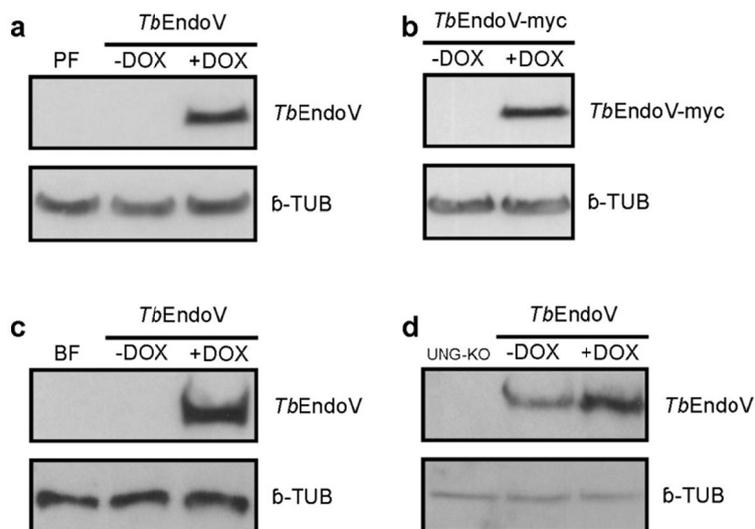


Figura D14. Niveles de expresión de *TbEndoV* en líneas celulares transgénicas de *T. brucei*. (a) Sobreexpresión de *TbEndoV* o (b) *TbEndoV-myc* en la línea parental de la forma procíclica. (c) Sobreexpresión de *TbEndoV* en la forma sanguínea. (d) Expresión ectópica de *TbEndoV* en la línea PF/UNG-KO derivada de la forma sanguínea. En todos los casos, los niveles de proteína detectados corresponden a extractos totales de $5 \cdot 10^6$ parásitos. La detección de *TbEndoV-myc* se llevó a cabo utilizando un anticuerpo específico para este epítipo. La proteína β -tubulina se utilizó como control de carga.

Es necesario señalar que a pesar de sucesivos intentos, no fue posible generar líneas de la forma sanguínea que sobreexpresasen *TbEndoV-myc*. Adicionalmente, se obtuvo la expresión de una copia ectópica de *TbEndoV* en una línea sanguínea previamente establecida en nuestro laboratorio deficiente para la uracilo-DNA glicosilasa (UNG) (PF/UNG-KO/*TbEndoV*). UNG es la única glicosilasa en *T. brucei* implicada en la eliminación de la base uracilo en el proceso de reparación por escisión de bases. El objeto de esta línea celular es el estudio del papel de *TbEndoV* en la eliminación de uracilo del DNA, función que había sido previamente descrita para sus ortólogos procarióticos.

D.2.3. Efecto de la depleción o eliminación de *TbEndoV* sobre la tasa de proliferación de *T. brucei*

Para estudiar el impacto que tiene la supresión de la actividad de EndoV sobre la proliferación celular se monitorizó el crecimiento de tres cultivos independientes durante un periodo de 16 días. Los cultivos se diluyeron a la densidad de partida cada 48 horas si bien las curvas de proliferación representadas corresponden al crecimiento acumulado durante el periodo total. La inducción de la copia ectópica de *TbEndoV* o del RNAi se realizó mediante suplementación con 1 $\mu\text{g/mL}$ de doxiciclina.

En el caso de la forma sanguínea, las líneas celulares BF y BF-dKO se cultivaron en medio HMI-9 suplementado con un 10 % de suero bovino fetal (SBF), y partiendo de una densidad inicial de $5 \cdot 10^3$ parásitos/mL. En dichas condiciones, la eliminación de *TbEndoV* en las formas sanguíneas de *T. brucei* no alteró de manera significativa la tasa de crecimiento de dichos parásitos (Fig. D15a).

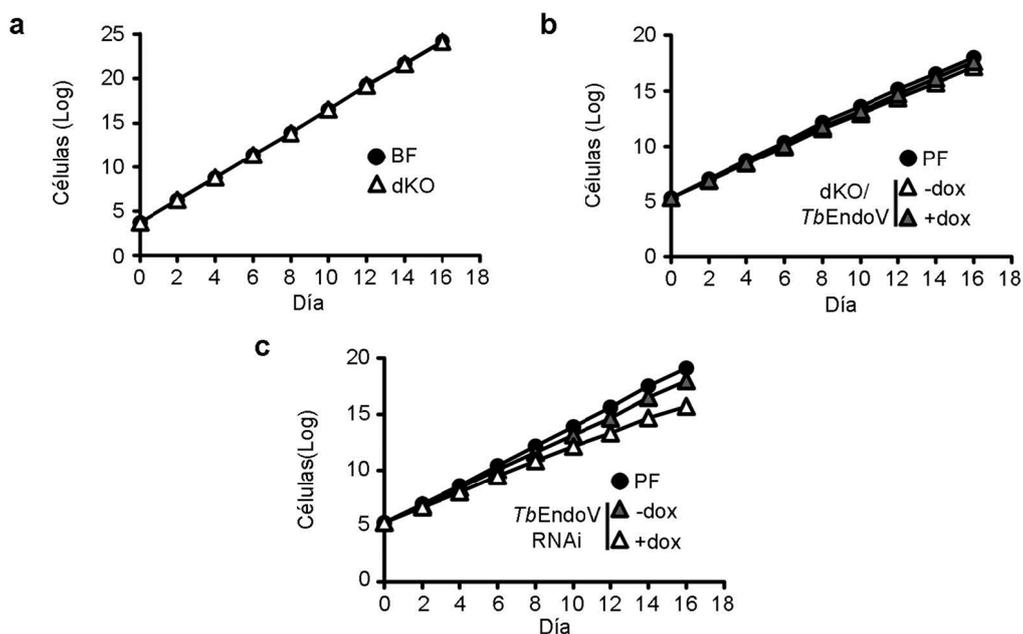


Figura D15. Impacto de la endonucleasa V en la proliferación de *T. brucei* in vitro. (a) Representación del crecimiento acumulado de líneas de parásitos sanguíneos. BF, línea parental; dKO, doble knock-out de EndoV. (b) Proliferación de líneas de parásitos procíclicos. PF, línea parental; dKO/*TbEndoV*, doble knock-out de *TbEndoV* con copia ectópica. (c) Efecto del RNAi de *TbEndoV*. -/+ dox, -/+ doxiciclina. Todos los datos se obtuvieron a partir de tres experimentos independientes.

Así mismo, se determinó la proliferación de las cepas procíclicas PF, dKO/*TbEndoV* y *TbEndoV*-RNAi, cultivadas en medio SDM-79 suplementado con un 10 % de SBF y 7.5 µg/mL de hemina, y partiendo de una densidad inicial de $2 \cdot 10^7$ parásitos/mL. Como hemos comentado previamente, la línea dKO/*TbEndoV* presenta niveles de expresión residuales de la copia ectópica en ausencia de inductor. Quizás por este motivo, los parásitos dKO/*TbEndoV* no mostraron diferencias significativas en proliferación respecto a la línea parental control (Fig. D15b). Por otra parte, los altos niveles de *TbEndoV* en presencia de inductor (> 3000 %) (Fig. D13b) no afectan a la capacidad proliferativa del parásito. Por el contrario, la depleción de *TbEndoV* mediante la inducción del RNAi provocó un defecto moderado pero consistente del crecimiento respecto a las líneas control PF y *TbEndoV*-RNAi en ausencia del inductor (Fig. D15c).

D.2.4. La depleción de *TbEndoV* en formas procíclicas de *T. brucei* causa alteraciones importantes en el ciclo celular

Teniendo en cuenta el defecto en proliferación que presentan las células procíclicas con bajos niveles de EndoV, se procedió a su caracterización mediante el análisis por citometría de flujo (FACS, *fluorescence-activated cell sorting*) de la progresión del ciclo celular a 2, 4 y 6 días tras la inducción del RNAi en tres cultivos independientes. Los parásitos fijados se marcaron con yoduro de propidio con el objetivo de distinguir las diferentes fases del ciclo celular (G1, S y G2/M) según la carga genética. Como podemos observar en la figura D16a, el análisis mediante FACS revela una acumulación de células en fase S (del 10,8 % al 23,3 %; $p < 0,001$) cuando se depleciona *TbEndoV* lo que podría indicar un defecto durante la duplicación del DNA nuclear. Este aumento de la población en fase S va acompañado de una disminución del número de células que encontramos en fase G1 (del 56,1 % al 40,7 %; $p < 0,001$). Además, se produce un aumento significativo del número de parásitos en fase sub-G1 (del 0,8 % al 5,0 %; $p < 0,001$).

Con el objetivo de validar estos datos, se llevó a cabo microscopía de fluorescencia utilizando 4',6-diamino-2-fenilindol (DAPI) para teñir el DNA celular. Este experimento permite conocer el número de núcleos y kinetoplastos que posee cada célula. La microscopía se realizó tras seis días de inducción del RNAi, cuando el defecto en crecimiento es más acusado. El recuento final corresponde a la media de tres experimentos independientes con un total de más de 100 células cada uno.

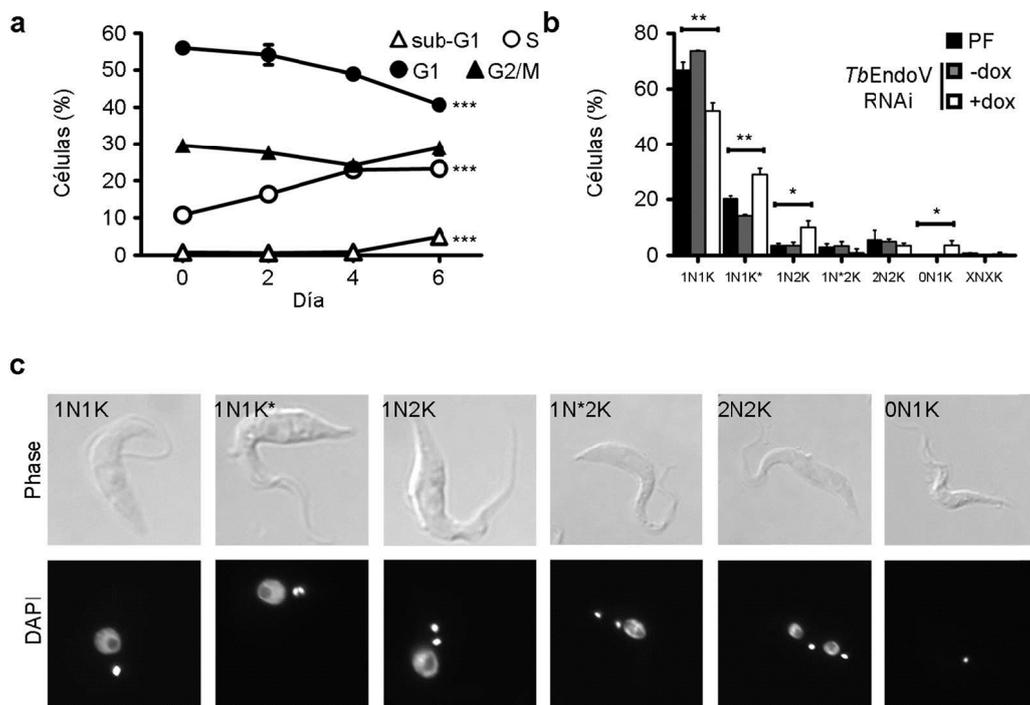


Figura D16. Análisis del ciclo celular en formas procíclicas deficientes en EndoV. (a) Análisis mediante FACS de células procíclicas tras 2, 4 y 6 días de silenciamiento de *TbEndoV* mediante RNAi. Los datos corresponden a la media (\pm SD) de tres experimentos independientes. Los asteriscos señalan diferencias significativas calculadas mediante la prueba *t* de Student: *** $p < 0,001$. **(b)** Cuantificación del número de núcleos y kinetoplastos mediante microscopía de fluorescencia en células procíclicas tras 6 días de represión de la expresión de *TbEndoV* mediante RNAi. Los datos corresponden a la media (\pm SD) de las células (>300) procedentes de tres experimentos independientes. Los asteriscos señalan diferencias significativas calculadas mediante la *t* de Student: * $p < 0,05$ y ** $p < 0,01$. **(c)** Imágenes representativas de microscopía realizada sobre parásitos procíclicos tras 6 días de inducción del RNAi donde los núcleos (N) y los kinetoplastos (K) han sido marcados con DAPI.

La figura D16b ilustra los resultados obtenidos para las cepas PF y EndoV-RNAi. Se observan cambios significativos en cuatro poblaciones celulares distintas: en primer lugar, un incremento del número de parásitos 1N1K* (del 20,3 % al 29,0 %; $p < 0,01$). Esta población presenta un núcleo más grande y alargado que las células normales que es resultado de una ralentización de la transición S→G2/M produciéndose una acumulación de células en fase S también observada mediante FACS. Por otro lado, observamos una disminución de la población 1N1K (del 66,7 % al 52,1 %; $p < 0,01$), que comprende células en fase G1, así como un aumento de células 1N2K (del 3,6 % al 10,1 %; $p < 0,05$), que representa a células en fase G2. Por último, la principal anomalía observada fue el incremento de células 0N1K (del 0 % al 3,7 %; $p < 0,01$), denominadas *zoides*. Estas células carecen de núcleo, lo que indica un defecto durante la división mitótica, y se incluyen en la población sub-G1 encontrada en FACS. Un fenotipo semejante, con inhibición de la fase S y mitosis defectuosa, se ha descrito en la forma procíclica de *T. brucei* tras el tratamiento con bleomicina o afidicolina (Ono and Nakabayashi 1980; Ploubidou et al. 1999) y es resultado de la progresión de la citoquinesis en ausencia de mitosis.

D.2.5. Análisis del impacto de *TbEndoV* sobre la infectividad y virulencia en un modelo animal

La relevancia de *TbEndoV* durante el proceso de infección se evaluó en ratones hembra C57BL/6. Se infectaron tres ratones con $5 \cdot 10^3$ parásitos (en tampón TDB-glucosa) de cada una de las líneas. Tras monitorizar la parasitemia en sangre así como la supervivencia de los ratones durante 8 días post-infección no se encontraron diferencias significativas en la evolución de la parasitemia ni en la media de supervivencia de los ratones infectados con la línea deficiente para *TbEndoV*, que se mantiene en torno a los seis días post-infección (Fig. D17a, b).

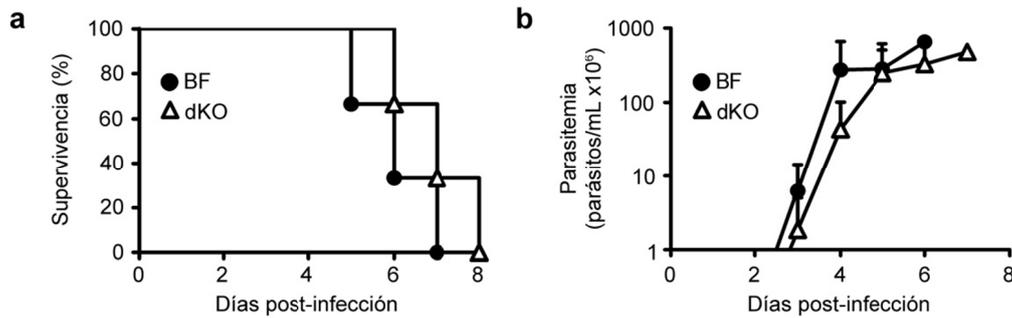


Figura D17. Efecto de *TbEndoV* sobre la infectividad y virulencia. (a) Supervivencia tras la infección de tres ratones C57BL/6 infectados con $5 \cdot 10^3$ parásitos de las formas sanguíneas parental (BF) y KO de *TbEndoV* (dKO). (b) La parasitemia observada se ha representado como la media (\pm SD) de los recuentos obtenidos para los diferentes ratones a distintos días post-infección.

D.2.6. Papel de *TbEndoV* en la protección frente a agentes genotóxicos

Durante el proceso de infección, la forma sanguínea de *T. brucei* se ve sometida a agentes que producen daños en el DNA por lo que el mantenimiento de la integridad genómica es vital durante esta etapa del ciclo. En este contexto, *TbEndoV* podría estar actuando en una ruta de reparación por escisión alternativa a BER como ocurre en bacterias. No obstante, nuestros datos indican que *TbEndoV* no tiene una actividad significativa sobre sustratos de DNA, aunque no se puede descartar que otros factores ausentes *in vitro* puedan estar modulando su actividad en la célula. Así, hay estudios que indican que la presencia de ATP a niveles fisiológicos inhibe la actividad de *TbEndoV*, mientras que la presencia de la proteína PABP1 la estimula (Nawaz et al. 2016a). Por otro lado, no podemos excluir del todo un papel en el metabolismo de DNA para *TbEndoV* ya que estudios de complementación génica señalan que las enzimas de mamíferos, con especificidad de sustrato similar a la enzima de tripanosoma, son capaces de revertir el fenotipo hipermutador que presentan cepas de *E. coli* deficientes en EndoV (Moe et al. 2003; Mi et al. 2012). Además, nuestros datos indican que *TbEndoV* se encuentra, aunque en menor proporción, en el núcleo (véase apartado D.3.1) donde podría estar llevando cabo tal función.

En base a estos indicios experimentales, se estudió la implicación de *TbEndoV* en la capacidad de proliferación de parásitos de la forma sanguínea tras su exposición a diversos compuestos químicos que comprometen la integridad genómica. Las líneas celulares utilizadas fueron las siguientes: línea parental (BF), línea doble knock-out de *TbEndoV* (dKO), línea parental que expresa *TbEndoV* ectópicamente (BF/*TbEndoV*) y la línea dKO complementada con copia ectópica de *TbEndoV* (dKO/*TbEndoV*). Dada la posible interacción funcional entre UNG y EndoV se emplearon además las líneas PF/UNG-KO y PF/UNG-KO/*TbEndoV*. Todas las líneas se cultivaron en medio HMI-9 en presencia de diferentes concentraciones de los compuestos ensayados, y partiendo de una densidad inicial de $5 \cdot 10^3$ parásitos/mL. Tras 48 horas en cultivo se contabilizó el número de células con un contador de partículas Z2 de Beckman Coulter™.

D.2.6.1. Papel de EndoV en la reparación de uracilo en el DNA genómico de *T. brucei*

Las endonucleasas V procarióticas reconocen y catalizan la incisión de DNA con uracilo de manera eficiente, demostrándose así mismo su participación en el proceso de reparación en bacterias (Gates and Linn 1977; Demple and Linn 1982; Lopez-Olmos et al. 2012). Para estudiar la implicación potencial de *TbEndoV* en reparación de DNA empleamos dos agentes que promueven la presencia de uracilo en DNA mediante distintos mecanismos, el metotrexato y el bisulfito de sodio.

El metotrexato (MTX) es un inhibidor de la dihidrofolato reductasa, que en *T. brucei* se presenta como una enzima bifuncional con actividad timidilato sintasa. La inhibición de esta enzima, clave para la síntesis *de novo* de pirimidinas, genera una reducción en la síntesis de dTTP y un aumento en los niveles de dUTP (Horowitz et al. 1997; Castillo-Acosta et al. 2008). El incremento de la ratio dUTP/dTTP promueve la incorporación de dUTP durante la replicación, generando pares uracilo-adenina en DNA. El tratamiento con MTX en un rango de concentraciones de 0 a 10 μ M no reveló diferencias notables entre células deficientes en EndoV (Fig. D18a) o que sobreexpresan esta endonucleasa (Fig. D18b) y la línea parental control. En un fondo genético

deficiente en UNG, cuya sensibilidad a antifolatos se ha demostrado anteriormente (Castillo-Acosta et al. 2012), la expresión de altos niveles de *TbEndoV*, muy por encima de los niveles fisiológicos, no logra revertir el fenotipo de hipersensibilidad a MTX (Fig. D18c).

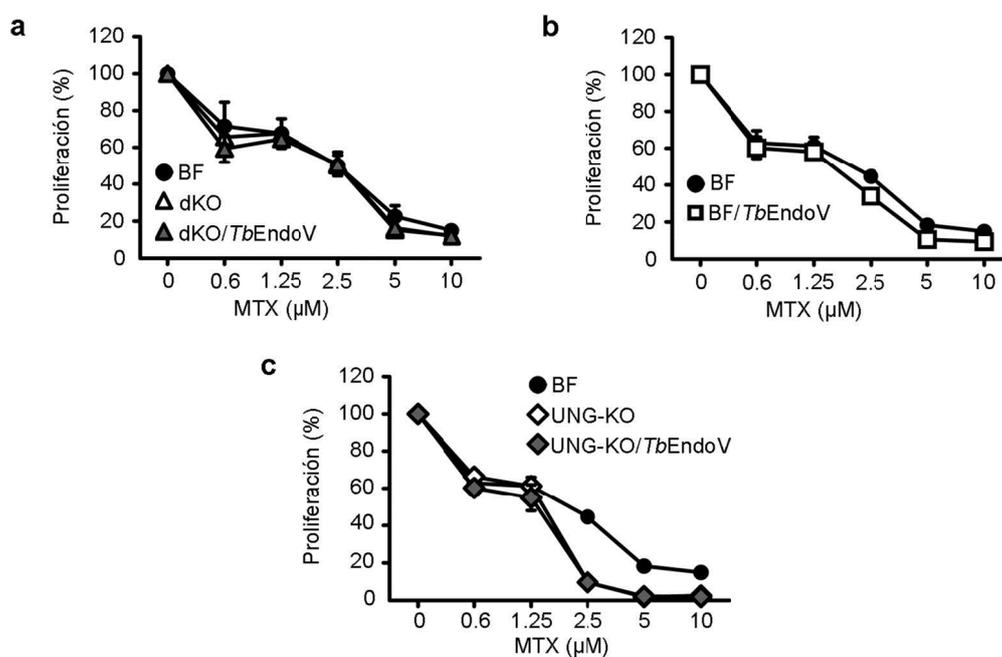


Figura D18. Efecto de la depleción o sobreexpresión de *TbEndoV* en parásitos sanguíneos cultivados en presencia de MTX. Los parásitos se cultivaron en HMI-9 suplementado con 10% de SBF y en presencia de concentraciones crecientes de MTX (0-10 μM). Todos los cultivos partían de una densidad inicial de $5 \cdot 10^3$ parásitos/mL, y el crecimiento se cuantificó tras 48 horas en cultivo. Los datos corresponden a la media (\pm SD) de tres experimentos independientes. Efecto del MTX sobre: **(a)** parásitos sanguíneos deficientes en *TbEndoV*, **(b)** parásitos sanguíneos que expresan una copia ectópica de la proteína en un fondo genético parental, **(c)** parásitos sanguíneos que expresan una copia ectópica de la proteína en un fondo genético deficiente en UNG.

Por otra parte, el bisulfito de sodio (SB) es un agente que induce la desaminación específica de citosina en DNA, provocando la acumulación de uracilo en forma de pares uracilo-guanina. Se ha comprobado que mutantes de *B. subtilis* deficientes para UNG y EndoV muestran altas tasas de mutación, que se ven exacerbadas en presencia de SB (Lopez-Olmos et al. 2012), lo que sugiere un papel para EndoV en la eliminación del uracilo presente en DNA como consecuencia de la

desaminación de citosina. El tratamiento con SB se realizó en un rango de concentraciones de 0 a 1000 μM . En presencia de UNG, *TbEndoV* no parece tener ningún impacto sobre la proliferación celular (Fig. D19a, b). Por el contrario, mientras que la línea deficiente en UNG exhibe una reducción significativa del crecimiento en presencia de SB (Fig. D19c; $p < 0,001$), la expresión de altos niveles de *TbEndoV* restaura la capacidad proliferativa a niveles semejantes a la línea control (Fig. D19c).

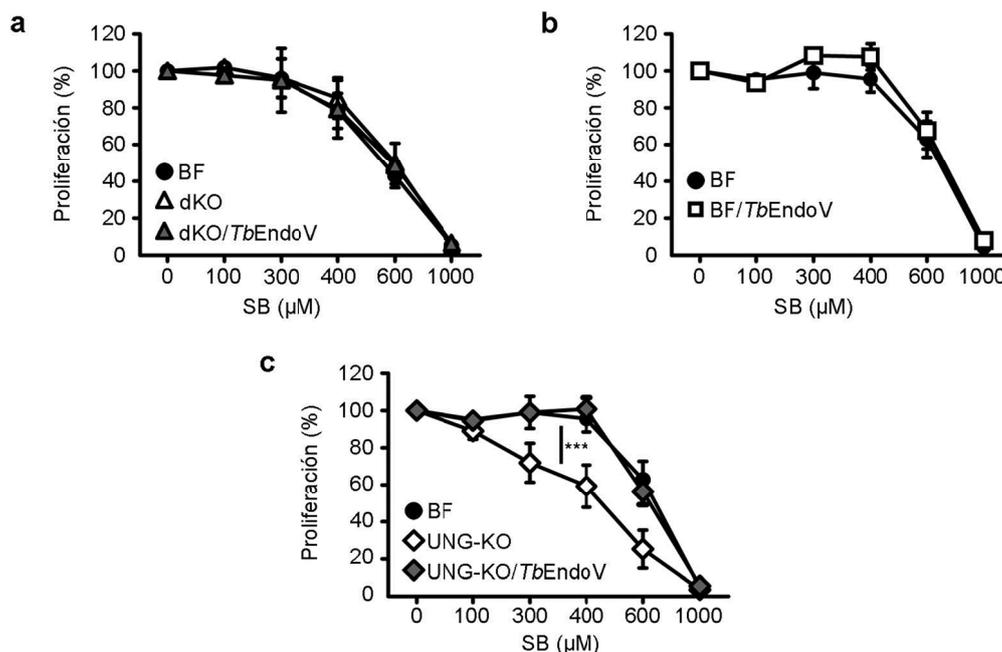


Figura D19. Papel de *TbEndoV* en la protección frente a la desaminación de citosina en parásitos sanguíneos. Los parásitos se cultivaron en HMI-9 suplementado con 10% de SBF y en presencia de concentraciones crecientes de bisulfito de sodio (SB) (0-1000 μM). Todos los cultivos partían de una densidad inicial de $5 \cdot 10^3$ parásitos/mL, y el crecimiento se cuantificó tras 48 horas en cultivo. Los datos corresponden a la media (\pm SD) de tres experimentos independientes. Los asteriscos señalan diferencias significativas calculadas mediante ANOVA de una vía: *** $p < 0,001$. Efecto del SB en: (a) parásitos sanguíneos deficientes en *TbEndoV*, (b) parásitos sanguíneos que expresan una copia ectópica de la proteína en un fondo genético parental y (c) parásitos sanguíneos que expresan una copia ectópica de la proteína en un fondo genético deficiente en UNG.

D.2.6.2. Consecuencias del estrés nitrosativo en *T. brucei*. Papel de UNG y EndoV

Cuando *T. brucei* infecta al hospedador mamífero y se desencadena la respuesta inmune primaria, los macrófagos activados expresan altos niveles de la óxido nítrico

sintasa inducible, y comienzan a secretar óxido nítrico (NO) en grandes cantidades (Namangala 2011). Los derivados de este compuesto provocan roturas de cadenas, y oxidación y desaminación de bases y, como consecuencia, inestabilidad cromosómica y aparición de mutaciones (Burney et al. 1999). Esto mismo es aplicable al RNA, lo que genera transcritos aberrantes que dan lugar a proteínas defectuosas.

En primer lugar examinamos el impacto de NO sobre la integridad genómica de *T. brucei* estableciendo la tasa de mutagénesis y el espectro de mutaciones que ocurre en este organismo tras la exposición *in vitro* a un donador de este agente oxidante (DETA/NO). Para este estudio se utilizaron líneas procíclicas, establecidas con anterioridad en nuestro laboratorio, que expresan la timidina quinasa (TK) del virus Herpes Simplex (HSV). Expresamos este gen -que confiere sensibilidad a ganciclovir- en dos fondos genéticos diferentes: parental (PF/TK) y deficiente para UNG (PF/UNG-KO/TK). Estudios previos en nuestro laboratorio demostraron que la supresión de UNG produce un fenotipo hipermutador en el que las transiciones GC>AT y las inserciones son los eventos de mutación más comunes (Castillo-Acosta et al. 2012). La tasa de mutación se calculó mediante el test de fluctuación de Luria-Delbrück, utilizando la TK de HSV como gen reportero de mutaciones. En el caso de la línea PF/TK, la tasa de mutación a la máxima concentración de DETA/NO utilizada (40 μ M) llegó a ser 2,7 veces (Tabla D2) superior a la registrada en ausencia de NO. Un incremento similar (2,6 veces, Tabla D2) se produjo en la línea PF/UNG-KO/TK a la misma concentración de DETA/NO con respecto a las células no tratadas. No obstante, es importante resaltar que la tasa de mutación encontrada en la línea PF/UNG-KO/TK en presencia de NO es casi 16 veces mayor que la mostrada por la línea parental en ausencia de NO (Tabla D2).

El espectro de mutaciones mostrado por la línea PF/UNG-KO tras el tratamiento con DETA/NO también difiere de forma significativa del de la línea parental tratada. Las células deficientes para UNG muestran un incremento en el número de inserciones

(27 %) en presencia de NO, principalmente aquellas que involucran a 2 ó más bases (Tabla D3).

	0 μM	10 μM	20 μM	30 μM	40 μM	
PF/TK	Número inicial de tripanosomas, Ni	200	200	200	200	200
	Número final de tripanosomas, Nf	9.92×10^5	8.43×10^5	7.45×10^5	5.54×10^5	2.99×10^5
	Generaciones celulares por cultivo, $(Nf - Ni)/Ln 2$	1.43×10^6	1.22×10^6	1.07×10^6	7.99×10^5	4.31×10^5
	Número de cultivos	96	192	192	192	192
	Cultivos sin crecimiento	69	141	140	145	146
	Proporción de pocillos sin crecimiento celular, P_0	0.72	0.73	0.73	0.76	0.76
	Número medio de mutantes por cultivo, $m = -Ln P_0$	0.33	0.31	0.32	0.28	0.27
	Tasa de mutación, m/número total de generaciones	2.31×10^{-7}	2.54×10^{-7}	2.94×10^{-7}	3.51×10^{-7}	6.35×10^{-7}
PF/UNG-KO/TK	Número inicial de tripanosomas, Ni	200	200	200	200	200
	Número final de tripanosomas, Nf	9.06×10^5	6.08×10^5	5.28×10^5	4.10×10^5	2.26×10^5
	Generaciones celulares por cultivo, $(Nf - Ni)/Ln 2$	1.31×10^6	8.77×10^5	7.62×10^5	5.91×10^5	3.26×10^5
	Número de cultivos	192	192	192	192	192
	Cultivos sin crecimiento	31	32	40	43	58
	Proporción de pocillos sin crecimiento celular, P_0	0,16	0,17	0,21	0,22	0,30
	Número medio de mutantes por cultivo, $m = -Ln P_0$	1,86	1,79	1,57	1,50	1,20
	Tasa de mutación, m/número total de generaciones	1.42×10^{-6}	2.04×10^{-6}	2.06×10^{-6}	2.53×10^{-6}	3.67×10^{-6}

Tabla D2. Datos obtenidos con el test de fluctuación de Luria-Delbrück en células procíclicas transfectadas con el gen TK de HSV. Las líneas PF/TK y PF/UNG-KO/TK, transfectadas con la enzima TK de HSV, fueron expuestas a concentraciones crecientes de DETA/NO (0 - 40 μM). La tasa de mutación hacia un fenotipo de resistencia a ganciclovir fue calculada utilizando el test de fluctuación de Luria-Delbrück, tal y como se indica en el apartado C.2.1.6 de Materiales y Métodos.

Las inserciones de mayor tamaño coinciden con zonas repetitivas, que pueden haber favorecido procesos de recombinación. Por otro lado, las sustituciones de una base en pares G:C sufren el mayor incremento (constituyen un 55 % del total). Dentro de estas, las más comunes son las transiciones G:C>A:T (41 %), resultado de la

presencia de uracilo en DNA como consecuencia de la desaminación de la citosina que en ausencia de UNG no son reparados. Es interesante resaltar el gran incremento en deleciones de gran tamaño (13,9 veces, llegando a representar el 46 % del total de mutaciones) que se da en la línea parental expuestas a estrés nitrosativo con respecto a las células no tratadas (Castillo-Acosta et al. 2012). Nuevamente, estas deleciones se producen en zonas repetitivas de la secuencia, que pueden haber favorecido los procesos de recombinación. Cabe destacar que dichas deleciones no ocurren en la línea PF/UNG-KO/TK (Tabla D3) tras la exposición a DETA/NO aunque es importante tener en cuenta que en el caso de las células deficientes para UNG, hasta el 36 % de los clones resistentes a ganciclovir que se aislaron no se pudieron analizar debido a errores durante la amplificación por PCR. La causa más probable de este efecto es la presencia de reordenamientos genéticos a gran escala que ocurren en ausencia de BER, como ya se ha reportado previamente (Castillo-Acosta et al. 2012).

	Mutación	Incidencia	Tasa de mutación (10^{-7})^a
PF/TK con 40μM DETA/NO	(-1) deleción	2/24(8%)	0.50
	deleciones	11/24(46%)	2.92
	(+1) inserción	1/24(4%)	0.25
	inserciones	1/24(4%)	0.25
	GC \rightarrow AT	3/24(12%)	0.76
	GC \rightarrow TA	2/24(8%)	0.50
	GC \rightarrow CG	1/24(4%)	0.25
	AT \rightarrow CG	2/24(8%)	0.50
	AT \rightarrow TA	0/24(0%)	0.0
	AT \rightarrow GC	1/24(4%)	0.25
PF/UNG-KO/TK con 40 μM DETA/NO	(-1) deleción	1/51(2%)	0.7
	deleciones	0/51(0%)	0.0
	(+1) inserción	4/51(8%)	2.9
	inserciones	14/51(27%)	9.9
	GC \rightarrow AT	21/51(41%)	15.0
	GC \rightarrow TA	4/51(8%)	2.9
	GC \rightarrow CG	3/51(6%)	2.2
	AT \rightarrow CG	2/51(4%)	1.5
	AT \rightarrow TA	2/51(4%)	1.5
	AT \rightarrow GC	0/51(0%)	0.0

PF/TK no tratado (Castillo-Acosta et al. 2012)	(-1) deleción	1/23 (4%)	0.09
	deleciones	2/23 (9%)	0.21
	(+1) inserción	3/23 (13%)	0.31
	inserciones	2/23 (9%)	0.20
	GC → AT	7/23 (30%)	0.69
	GC → TA	4/23 (17%)	0.41
	GC → CG	3/23 (13%)	0.31
	AT → CG	1/23 (4%)	0.09
	AT → TA	0/23 (0%)	0
	AT → GC	0/23 (0%)	0
PF/UNG-KO/TK no tratado (Castillo-Acosta et al. 2012)	(-1) deleción	1/24 (4%)	0.57
	deleciones	1/24 (4%)	0.57
	(+1) inserción	2/24 (8%)	1.14
	inserciones	4/24 (17%)	2.41
	GC → AT	10/24 (42%)	6.00
	GC → TA	5/24 (21%)	3.00
	GC → CG	1/24 (4%)	0.57
	AT → CG	0/24 (0%)	0
	AT → TA	0/24 (0%)	0
	AT → GC	0/24 (0%)	0

Tabla D3. Espectro de mutaciones del gen HSVTK HSV en células expuestas a NO. El espectro de mutaciones para las líneas PF/TK y PF/UNG-KO/TK se estableció mediante secuenciación del gen TK de HSV en los clones aislados tras la exposición de los cultivos a estrés nitrosativo. Los datos corresponden a la máxima concentración de DETA/NO utilizada (40 μ M). Con propósitos ilustrativos se incluyen los resultados ya publicados para ambas líneas en ausencia de óxido nítrico (Castillo-Acosta et al. 2012). ^a La tasa de mutación corresponde al producto de la proporción de una clase específica de mutación y la tasa de mutación total para cada línea (calculadas en la Tabla D2).

Una vez establecida la existencia en *T. brucei* de alteraciones genéticas como consecuencia del estrés nitrosativo, se evaluó el papel de *TbEndoV* frente a las posibles lesiones generadas, así como su interacción con BER. Para ello en primer lugar se trataron las células con DETA/NO en un rango de concentraciones de 0 a 50 μ M. Como muestra la Fig. D20a, la inactivación génica de *TbEndoV* no causó ningún efecto sobre la proliferación a las concentraciones ensayadas. En cambio, las líneas que sobreexpresan *TbEndoV* presentaron un crecimiento ligeramente superior al mostrado por la línea control, tanto en presencia como en ausencia de UNG (Fig. D20b, c), si bien estas diferencias no resultaron estadísticamente significativas.

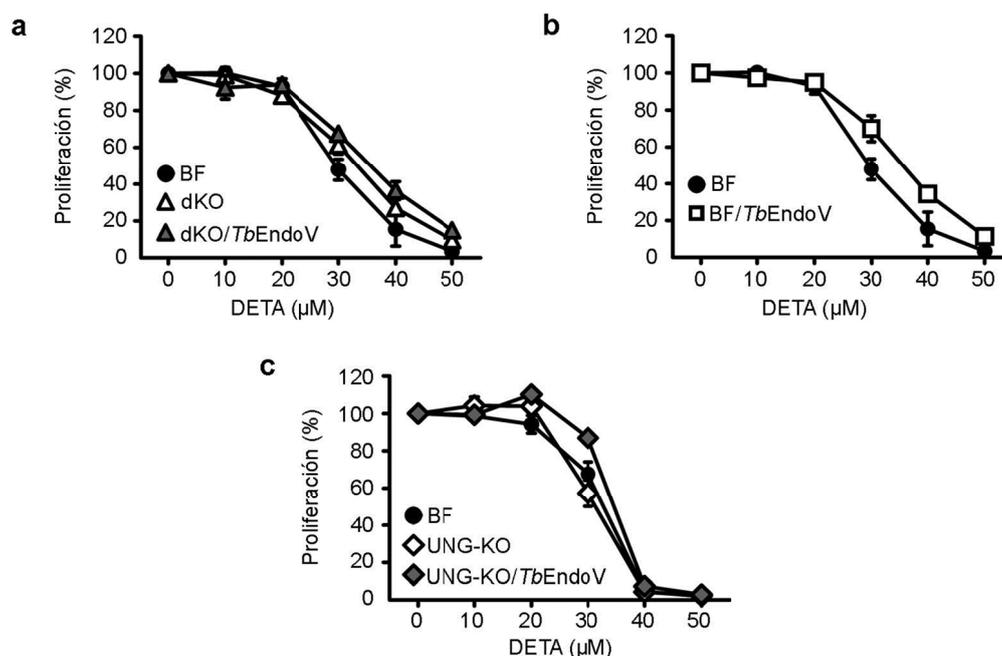


Figura D20. Efecto antiproliferativo del óxido nítrico en parásitos sanguíneos deficientes o que sobreexpresan *TbEndoV*. Los parásitos se cultivaron en HMI-9 suplementado con 10 % de SBF y en presencia de concentraciones crecientes de DETA/NO (0 - 50 μM). Todos los cultivos partían de una densidad inicial de $5 \cdot 10^3$ parásitos/mL, y el crecimiento se cuantificó tras 48 horas en cultivo. Los datos corresponden a la media (\pm SD) de tres experimentos independientes. Efecto del DETA/NO en: **(a)** parásitos sanguíneos deficientes en *TbEndoV*, **(b)** parásitos sanguíneos que expresan una copia ectópica de la proteína en un fondo genético parental **(c)** parásitos sanguíneos que expresan una copia ectópica de la proteína en un fondo genético deficiente en UNG.

D.3. ANÁLISIS DE LA DISTRIBUCIÓN INTRACELULAR DE *TbEndoV*

D.3.1. Localización subcelular

En células humanas, en todos los estudios de localización de EndoV realizados hasta la fecha se han empleado células que sobreexpresan la proteína fusionada a un epítipo. Aunque inicialmente se localizó asociada al nucléolo (Fladeby et al. 2012), estudios posteriores descartaron esta posibilidad, localizándola únicamente en el citoplasma (Morita et al. 2013). Con el fin de determinar la localización de *TbEndoV* en

el interior celular se realizaron estudios de inmunofluorescencia indirecta utilizando el anticuerpo anti-*TbEndoV* generado en nuestro laboratorio, así como un anticuerpo anti-myc (Sigma). Siguiendo el protocolo descrito en el apartado C2.3.4, las células fijadas y permeabilizadas se incubaron con los anticuerpos primarios anti-*TbEndoV* y anti-myc a una dilución 1:100. Como anticuerpo secundario se utilizó un anti-IgG de conejo en el caso de anti-*TbEndoV*, y un anti-IgG de ratón en el caso de anti-myc, ambos conjugados con el fluorocromo Alexa Fluor[®] 488. Las preparaciones fueron visualizadas en un microscopio Olympus de gran angular con el software Cell-R IX-81. Para este estudio se utilizaron las líneas procíclicas PF, PF/*TbEndoV* y PF/*TbEndoV*-myc. La expresión ectópica de la proteína se indujo dos días antes de la inmunofluorescencia añadiendo 1 µg/mL de doxiciclina al medio. En la figura D21 se muestra la proyección Z de entre 8 y 12 planos tomados con una separación de 0,2 µm.

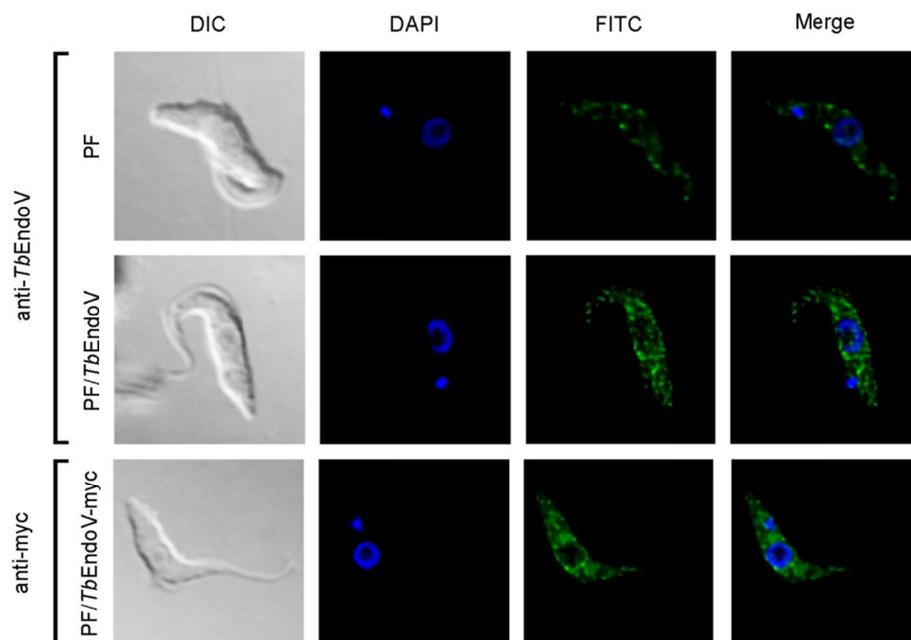


Figura D21. Localización subcelular de *TbEndoV* en células procíclicas. Imágenes de microscopía de fluorescencia mostrando la localización subcelular de *TbEndoV* en las líneas PF (fila superior), PF/*TbEndoV* (fila central) y PF/*TbEndoV*-myc (fila inferior).

En la línea PF, *TbEndoV* presenta una localización mayoritariamente citoplasmática (Fig. D21, fila superior) con un patrón de distribución granular, y se observa una mayor acumulación de la proteína en la periferia del núcleo, distribución

característica de proteínas implicadas en metabolismo de RNA. Además, *TbEndoV* también se detecta en el núcleo aunque de forma minoritaria. Para confirmar esta distribución, se analizó la localización durante la expresión ectópica de *TbEndoV* (Fig. D21, fila central) y *TbEndoV-myc* (Fig. D21, fila inferior). En ambos casos, la señal correspondiente a *TbEndoV* muestra una mayor intensidad pero manteniendo la misma distribución que el de la proteína endógena.

D.3.2. *TbEndoV* se relocaliza en gránulos de estrés tras la depleción de nutrientes colocalizando con la proteína *TbDhh1*

Son muchas las funciones que *EndoV* puede estar desempeñando en el metabolismo de RNA, sin embargo todavía no se ha conseguido describir con exactitud su función fisiológica. No obstante, si participase en el procesamiento de mRNAs y tRNAs sería probable que se localizase en estructuras tales como cuerpos de procesamiento de RNA (p-bodies, *processing bodies*) y gránulos de estrés (SGs, *stress granules*), donde se acumulan proteínas implicadas en el metabolismo de RNA. Se ha descrito recientemente que la *EndoV* humana se redistribuye bajo condiciones de estrés nutricional en SGs donde colocaliza con PABP1, una proteína involucrada en el metabolismo de RNA (Nawaz et al. 2016a). En estos gránulos se almacena RNA y complejos de transcripción principalmente, durante situaciones de estrés bajo las cuales la síntesis de proteínas resulta inviable o contraproducente para la célula (Fritz et al. 2015).

Con el fin de esclarecer el papel de *TbEndoV* bajo condiciones de estrés se llevó a cabo el análisis mediante inmunofluorescencia indirecta sobre células de la forma procíclica. Para emular las condiciones de estrés, las células fueron incubadas en PBS durante el tiempo indicado, tras lo cual se procedió a la visualización de las proteínas mediante microscopía de fluorescencia. En este estudio se emplearon las líneas procíclicas PF, PF/*TbEndoV-myc* y PF-RNAi. La inducción del RNAi en la línea PF-RNAi y la expresión de *TbEndoV-myc* en la línea PF/*TbEndoV-myc* se realizó

mediante la adición de 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de doxiciclina al medio. En *T. brucei* se ha descrito un amplio número de proteínas que se redistribuyen en SGs cuando la célula se ve sometida a condiciones de estrés nutricional (Fritz et al. 2015). Como primera aproximación utilizamos tres proteínas presentes en estas estructuras: la helicasa DEAD-box de RNA Dhh1 (*TbDhh1*), implicada en la degradación de mRNAs (Presnyak and Coller 2013); el supresor de la traducción Scd6 (*TbScd6*) (Cristodero et al. 2014); y la proteína de unión a RNA DRBD3 (*TbDRBD3*), que participa en la estabilización de mRNAs (Fernandez-Moya et al. 2012). Estas tres proteínas son componentes bien caracterizados de SGs que se agrupan formando *foci* discretos de gran tamaño que no son observables en condiciones normales de crecimiento.

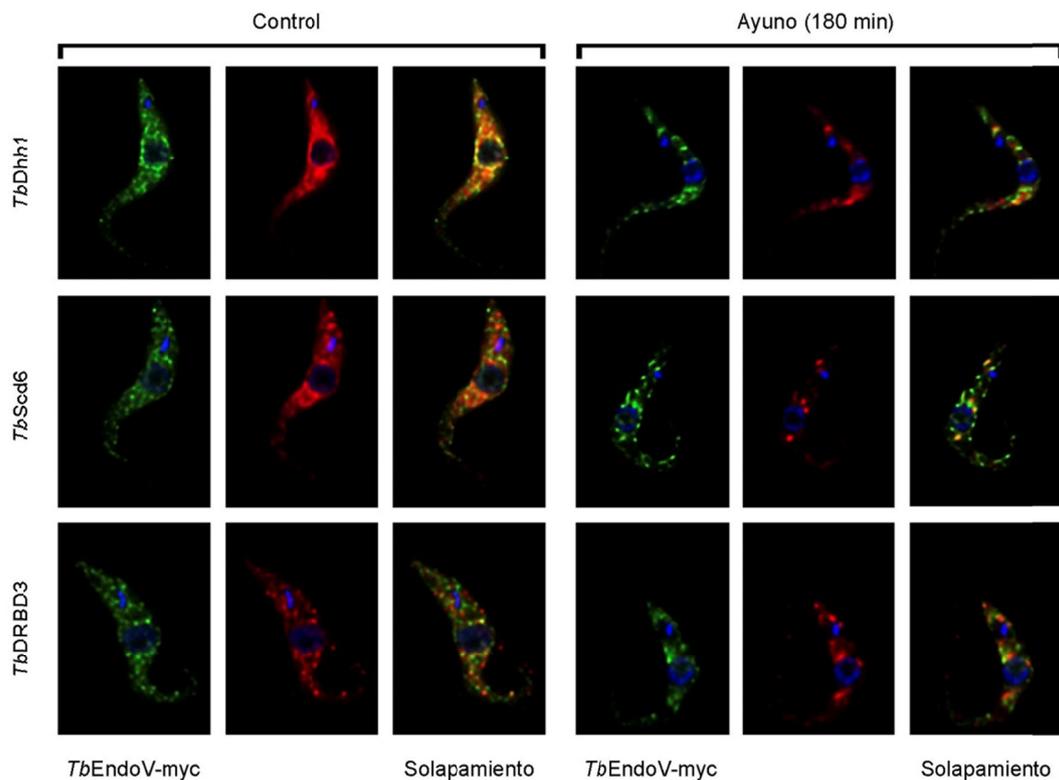


Figura D22. Colocalización de *TbEndoV-myc* con diferentes marcadores de SGs. Imágenes de microscopía de fluorescencia de la línea PF/*TbEndoV-myc* mostrando la colocalización de *TbEndoV-myc* con las proteínas marcadoras de SGs *TbDhh1* (fila superior), *TbScd6* (fila central) y *TbDRBD3* (fila inferior).

Para cada uno de estos tres marcadores medimos el grado de colocación con *TbEndoV-myc* tras someter a las células a estrés nutricional. El grado de colocación se estableció con los coeficientes de Pearson y Manders, que fueron calculados utilizando el software Fiji/ImageJ. Como se ilustra en la figura D22, *TbEndoV-myc* colocaliza en mayor o menor medida con las tres proteínas en condiciones óptimas de cultivo, mostrando valores para el coeficiente de Pearson por encima de 0,80 para todos los marcadores (Tabla D4). Sin embargo, en el caso de *TbDRBD3* y *TbScd6*, el valor de este índice decae cuando se induce privación de nutrientes durante 180 minutos (Tabla D4). En el caso de *TbDhh1*, el grado de colocación se mantiene durante el estrés nutricional (Tabla D4), razón por la que decidimos usar esta proteína como marcador de SGs para validar el protocolo utilizado.

	Control			Estrés nutricional		
	Pearson±SD	M1±SD	M2±SD	Pearson±SD	M1±SD	M2±SD
<i>TbDhh1</i>	0,88±0,03	0,83±0,05	0,76±0,07	0,81±0,03	0,58±0,15	0,46±0,09
<i>TbScd6</i>	0,84±0,03	0,76±0,09	0,80±0,07	0,69±0,06	0,22±0,15	0,16±0,09
<i>TbDRBD3</i>	0,83±0,05	0,77±0,08	0,70±0,14	0,74±0,06	0,47±0,12	0,26±0,11

Tabla D4. Cuantificación de la colocación entre *TbEndoV-myc* y diferentes marcadores de SGs. La tabla muestra los coeficientes de Pearson y Manders (M1, porcentaje del marcador correspondiente que solapa sobre *TbEndoV-myc*; M2, porcentaje de *TbEndoV-myc* que solapa sobre el marcador indicado). Los datos corresponden a la media (±SD) de al menos 20 células provenientes de dos experimentos diferentes.

Tras establecer *TbDhh1* como marcador de SGs se analizó la relocalización de *TbEndoV* en condiciones de ayuno tras incubar la línea PF parental en PBS durante 60, 120 y 180 minutos. Como se muestra en la figura D23, *TbEndoV* se agrupa formando gránulos de mayor tamaño y más definidos tras 120 minutos, los cuales comienzan a desaparecer al alcanzar los 180 minutos de estrés nutricional (Fig. D23, fila superior). La dinámica de formación de SGs es semejante a la mostrada por *TbDhh1* (Fig. D23, fila inferior) (Fritz et al. 2015).

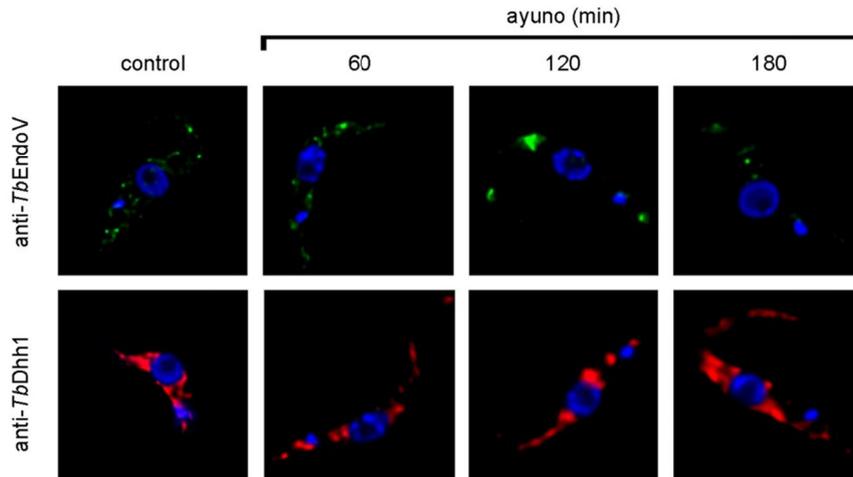


Figura D23. Redistribución de *TbEndoV* en el citoplasma durante condiciones de estrés nutricional. Imágenes de microscopía de fluorescencia mostrando la localización de *TbEndoV* (fila superior) y *TbDhh1* (fila inferior) en la línea PF tras someter las células a ayuno durante el tiempo indicado.

El análisis de formación de SGs por *TbEndoV* en condiciones de estrés nutricional también se llevó a cabo posteriormente en la línea PF-RNAi con el doble objetivo de comprobar la efectividad del silenciamiento y establecer sin ambigüedad la identidad de la proteína presente de los gránulos observados. Tras cuatro días de inducción del RNAi, se indujo estrés nutricional durante 120 minutos. Como muestra la figura D24, la línea PF-RNAi no muestra gránulos con la misma intensidad y tamaño que la línea parental durante el ayuno. Un análisis cuantitativo de partículas realizado con el software Fiji/ImageJ, utilizando entre 18 y 33 células de cada línea y estableciendo el mismo umbral de intensidad y tamaño de partícula ($0,05\mu\text{m}^2$) para ambas cepas, arroja los datos mostrados en las figuras D24b,c. Tras 120 minutos de estrés nutricional, los parásitos que expresan niveles normales de *TbEndoV* forman gránulos que son de mayor tamaño que durante condiciones normales de cultivo (Fig. D24c; $p < 0,01$). Por otro lado, durante el ayuno los parásitos con niveles reducidos de expresión para *TbEndoV* (PF-RNAi) muestran menor número de gránulos y de menor tamaño ($p < 0,05$) (Fig. D24c, b) respecto a la línea parental en las mismas condiciones experimentales.

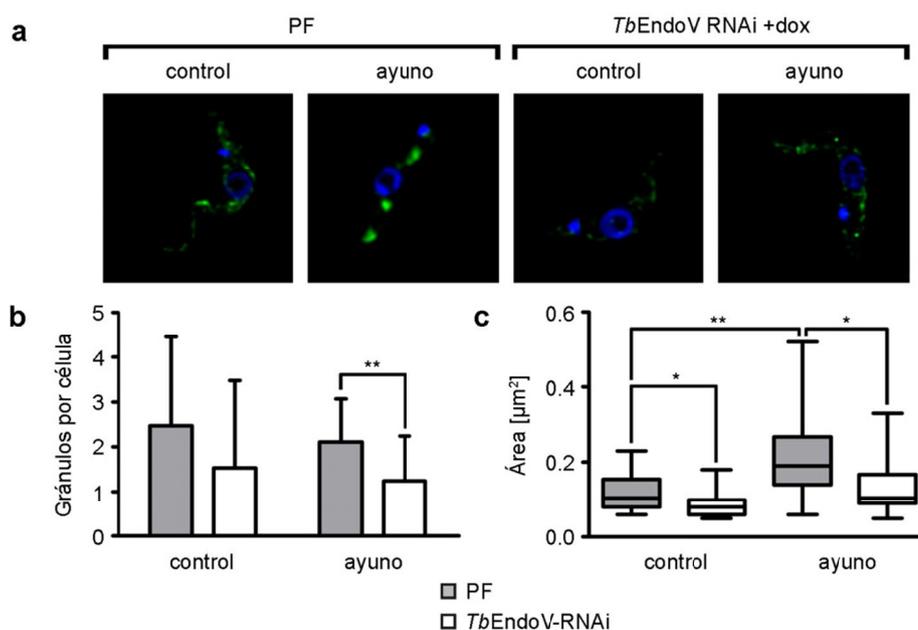


Figura D24. Estudios de relocalización subcelular de *TbEndoV* en células con niveles reducidos de expresión. (a) Microscopía de fluorescencia ilustrando las diferencias en nivel de expresión y distribución de *TbEndoV* en las líneas PF y RNAi tras mantener las células en ayuno durante 120 minutos. **(b)** Cuantificación del número de gránulos por célula, considerando un área mínima de $0,05 \mu\text{m}^2$ y un umbral de intensidad fijado manualmente. Los datos corresponden a la media (\pm SD) de al menos 16 células por línea celular procedentes de dos experimentos independientes. Los asteriscos indican diferencias significativas calculadas mediante la *t* de Student: ** $p < 0,01$. **(c)** Análisis del área de los gránulos en las líneas PF y RNAi sometidas a ayuno durante 120 minutos. Los datos corresponden a la media (\pm SD) de las áreas medias calculadas para cada célula, con un total de entre 18 y 32 células por línea procedentes de dos experimentos independientes. Los asteriscos indican diferencias significativas calculadas mediante la *t* de Student: * $p < 0,05$ y ** $p < 0,01$.

Por último se procedió a establecer si efectivamente la forma nativa de *TbEndoV* colocaliza con *TbDhh1* en gránulos de estrés. Dada la incompatibilidad que presenta utilizar dos anticuerpos generados en conejo, el anticuerpo anti-*TbEndoV* se conjugó al fluorocromo Alexa Fluor[®] 594 utilizando el Zenon[™] Rabbit IgG Labeling Kit (Thermo Fisher), mientras que para detectar *TbDhh1* se utilizó un anticuerpo secundario anti-IgG de conejo marcado con el fluorocromo Alexa Fluor[®] 488. Tras someter las células a 120 minutos de privación de nutrientes se llevó a cabo la inmunofluorescencia siguiendo el protocolo descrito en el apartado C2.3.5 (Fig. D25). Según el coeficiente de Manders, en condiciones control hasta el 69 % de la señal correspondiente a *TbEndoV* solapa con

la señal de *TbDhh1* (M1). Y en el sentido opuesto, hasta el 90 % de la señal correspondiente a *TbDhh1* solapa con la de *TbEndoV* (M2). Bajo condiciones de estrés este coeficiente se mantiene igualmente elevado, con un 70 % para M1 y un 73 % para M2. Este alto grado de colocalización se ve confirmado por el coeficiente de correlación de Pearson, con un valor de 0,87 que se mantiene en las condiciones de control y estrés nutricional.

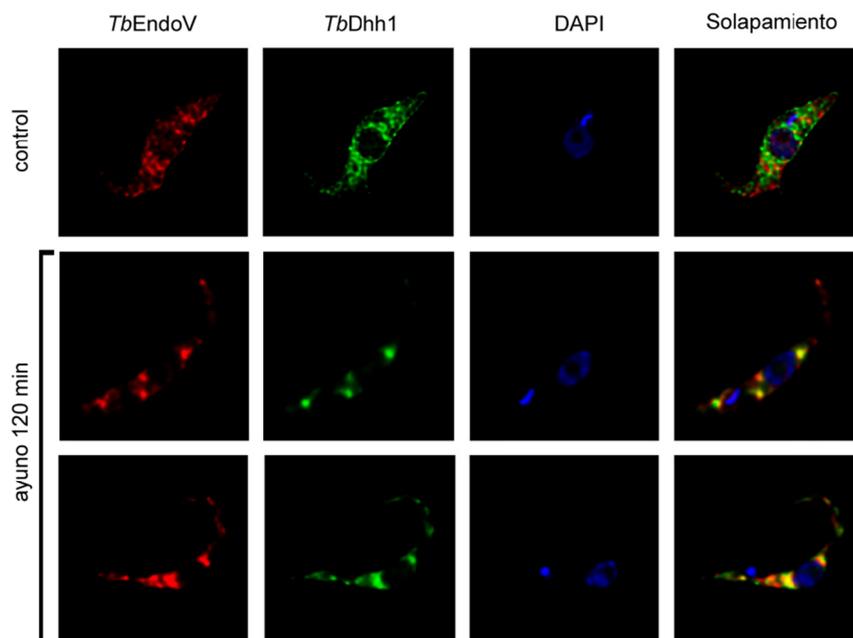


Figura D25. Estudio de la colocalización de *TbEndoV* y *TbDhh1* en gránulos de estrés en células procíclicas. Las células se sometieron a estrés nutricional incubándolas durante 120 minutos en PBS antes de proceder a su visualización por microscopía de inmunofluorescencia. *TbEndoV* se marcó utilizando el anticuerpo primario anti-*TbEndoV* conjugado al fluorocromo Alexa Fluor® 594, mientras que *TbDhh1* se visualizó utilizando el primario anti-*TbDhh1* y un anticuerpo secundario conjugado al fluorocromo Alexa Fluor® 488. El DNA del núcleo y el kinetoplasto se detectaron con DAPI. Las imágenes son representativas de las tinciones obtenidas en al menos dos experimentos independientes.

DISCUSIÓN

E. DISCUSIÓN

Todos los organismos están sujetos a daños que comprometen la integridad genómica, cuyo mantenimiento es de vital importancia para la supervivencia del organismo y la continuación de la especie. Las especies reactivas de oxígeno (ROS) y nitrógeno (NOS) provocan daños sobre ácidos nucleicos, lípidos y proteínas, que en la mayoría de los casos alteran su función y reducen la viabilidad celular (Spletstoesser and Schuff-Werner 2002). Debido a su condición de parásito extracelular, *Trypanosoma brucei* se ve expuesto a agentes oxidantes generados como mecanismo de defensa por el huésped (Tabel et al. 1999; Duleu et al. 2004), que se suman a los producidos por el metabolismo endógeno de la célula. Por tanto, en este tipo de protozoos parásitos son de vital importancia los sistemas celulares que ayudan a mantener la integridad genómica, tales como los mecanismos de reparación de DNA. Conocer en profundidad dichos mecanismos es imprescindible para poder ser explotados como blancos para la acción de fármacos antiparasitarios (Vonlaufen et al. 2008). La endonucleasa V (EndoV) se encuentra en la mayoría de organismos, desde bacterias hasta humanos, aunque la evolución ha otorgado diferentes funciones a esta enzima. En procariotas, tiene un papel en reparación de DNA, conformando una ruta de reparación alternativa para la eliminación de daños por desaminación principalmente (Demple and Linn 1982; Guo and Weiss 1998; Schouten and Weiss 1999; Weiss 2001). En eucariotas, sin embargo, se cuestiona su implicación en la eliminación de lesiones del DNA, ya que los datos actuales sugieren para esta enzima una función en el metabolismo de RNA (Morita et al. 2013; Vik et al. 2013). En este trabajo se han explorado aspectos básicos de la función biológica de la EndoV de *T. brucei* (*TbEndoV*) que incluyen desde la caracterización de su actividad enzimática hasta la determinación de su relevancia en la supervivencia del parásito y en la protección frente a agentes genotóxicos.

E.1. *TbEndoV* ES UNA ENDORIBONUCLEASA CON ACTIVIDAD SOBRE INOSINA

La aparición de bases desaminadas en el DNA, tales como el uracilo y la hipoxantina, es un proceso relativamente común que se produce de manera espontánea o inducido por agentes desaminantes intrínsecos y extrínsecos de la célula (Karran and Lindahl 1980; Lindahl 1993). Este tipo de daños son el sustrato de glicosilasas especializadas que inician la ruta de reparación por escisión de bases (BER), la principal ruta de reparación, si bien no la única, encargada de corregir estas lesiones (Brooks et al. 2013). Hasta el momento no se conoce ninguna enzima en *T. brucei* con capacidad para escindir hipoxantina, una acción normalmente llevada a cabo en otros organismos por una alquiladenina-DNA glicosilasa (AAG). Por el contrario, sí existe una proteína con actividad uracil-DNA glicosilasa (UNG) que constituye el primer paso en la reparación de uracilo a través de BER. En bacterias, existe una ruta de reparación alternativa de bases desaminadas iniciada por EndoV que funciona como segunda línea de defensa tras la ruta de reparación BER (Lopez-Olmos et al. 2012). En *T. brucei* sin embargo, las propiedades enzimáticas de *TbEndoV* determinadas *in vitro* sugieren que es improbable que juegue un papel relevante en reparación de DNA. No obstante, no se puede descartar que existan factores, ausentes en nuestro ensayo de actividad, que modulen la actividad de *TbEndoV* sobre DNA en condiciones fisiológicas. A este respecto, estudios con la proteína humana (hEndoV) recombinante han reportado que las proteínas Tudor-SN (*Tudor staphylococcal nuclease*) y PABPC1 (*Polyadenylate-binding protein C1*), esta última mediante interacción física, estimulan su actividad de incisión. Por el contrario, concentraciones fisiológicas de ATP en el ensayo de reacción tienen un efecto inhibitorio lo que podría constituir un mecanismo de regulación estricto de la actividad de EndoV con el fin de evitar la degradación incontrolada de mRNAs (Morita et al. 2013; Nawaz et al. 2016a).

La endonucleasa V de *T. brucei* muestra una gran similitud a nivel bioquímico con su ortólogo humano ya que ambas enzimas comparten la preferencia por sustratos

de inosina en cadena sencilla de RNA, lo que sugiere que éste puede ser también el sustrato genuino en tripanosomátidos. Por el contrario, *TbEndoV* no es capaz de procesar inosina en DNA de forma eficiente excepto cuando existe un ribonucleótido en posición adyacente 3' (Fig. D9). Por tanto, el grupo 2'-hidroxilo en esta ribosa es esencial para la actividad de incisión. La diferencia en actividad entre sustratos de cadena sencilla y doble (Fig. D6) sugiere además que la estructura del ácido nucleico es también crítica para el procesamiento de este tipo de sustratos.

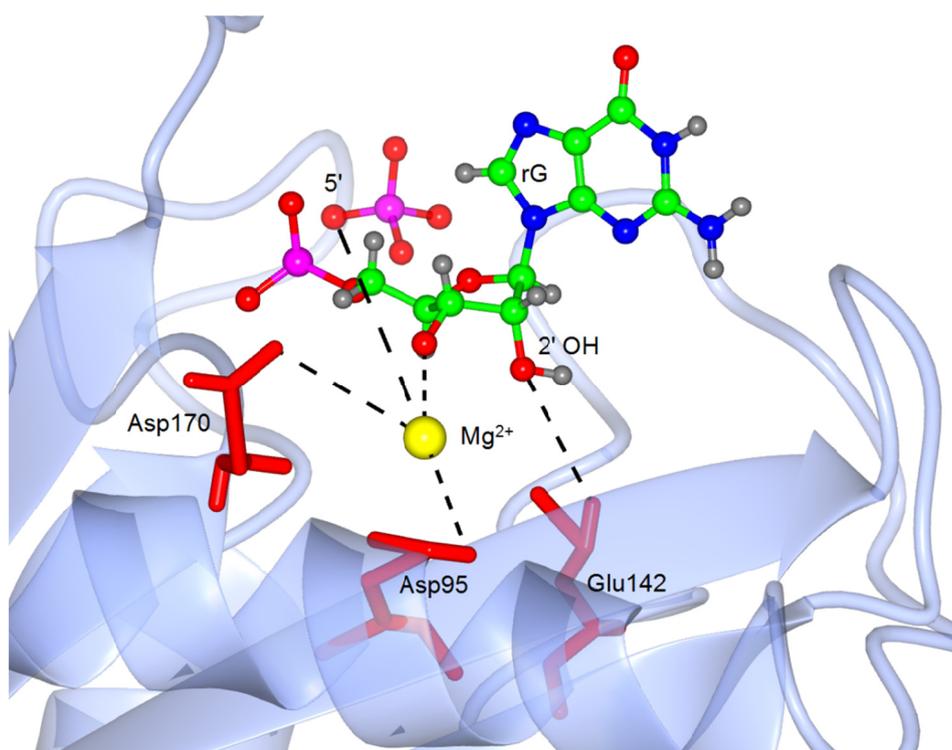


Figura E1. Modelo de la estructura de *TbEndoV* en complejo con su producto de reacción. La secuencia de *TbEndoV* se modeló usando el software SWISS-MODEL y utilizando la estructura de hEndoV (código PDB: 4NSP). El modelo de *TbEndoV* en complejo con el ribonucleótido en 3' se construyó mediante superposición con la estructura de la EndoV de *T. maritima* en complejo con su producto de reacción (DNA) (código PDB: 2W35). En nuestro modelo, la desoxiguanina en 3' respecto de la inosina se ha sustituido por una riboguanina. Se señalan los residuos implicados en la coordinación del ión metálico durante la hidrólisis (Asp95, Glu142 y Asp170). Alternativamente, se ha propuesto que el residuo Glu142 podría establecer una interacción con el grupo 2'-OH y posibilitar así el reconocimiento de sustratos de RNA.

El modelo para hEndoV, basado en la estructura de la endoV de *T. maritima* en complejo con su producto de incisión, sugiere que el grupo 2'-OH podría interactuar

con un residuo de glutamato (E100) reemplazando a una molécula de agua del sitio activo (Vik et al. 2013). La elaboración de un modelo de *TbEndoV* pone de manifiesto que la enzima de *Trypanosoma* también conserva este residuo de glutamato (E142) en su sitio activo donde podría desempeñar una función a análoga (Fig. E1). No obstante, la confirmación del papel del residuo de glutamato y el establecimiento de las bases moleculares de la preferencia por RNA requieren la resolución de la estructura tridimensional de alguna de estas endonucleasas V especializadas en sustratos de RNA.

E.2. IDENTIFICACIÓN DE LA ENDONUCLEASA V COMO UNA PROTEÍNA DE RESPUESTA A ESTRÉS

El análisis mediante microscopia de inmunofluorescencia indica que *TbEndoV* es una proteína de distribución predominantemente citoplasmática, lo que apoya su probable papel en metabolismo de RNA. No obstante, no se puede descartar una presencia minoritaria en el núcleo celular y por tanto una implicación en metabolismo de DNA. Al igual que la enzima de *T. brucei*, la hEndoV se ha detectado de forma reiterada en el citoplasma (Fladeby et al. 2012; Morita et al. 2013), si bien estudios previos también indicaban una localización nucleolar que los autores relacionaron con un posible papel en metabolismo de RNA ribosómico (Fladeby et al. 2012; Morita et al. 2013). *T. brucei* es el segundo organismo eucariota después de humanos en el que se establece la localización de EndoV. Sin embargo, mientras que en los estudios de localización de la proteína humana se han empleado proteínas de fusión en condiciones de sobreexpresión, en este trabajo se detectan por primera vez los niveles de proteína endógena utilizando anticuerpos específicos generados en nuestro laboratorio.

Empleando estas mismas herramientas, hemos establecido que en condiciones de privación de nutrientes, *TbEndoV* se acumula en gránulos de estrés (SGs, *stress granules*) en el citoplasma de *T. brucei*, donde colocaliza con la helicasa DEAD-box de RNA Dhh1, un componente bien caracterizado de los gránulos de estrés (Kramer et al. 2013) (Fig. E2). De forma análoga, hEndoV relocaliza en SGs cuando se somete a

células humanas a estrés oxidativo mediante la exposición a arsenito (Nawaz et al. 2016a). hEndoV colocaliza en estos gránulos con la proteína PABPC1, que promueve la estabilización y traducción de mRNAs poliadenilados (Kedersha et al. 1999) y con proteína relacionadas con la presencia de inosina en RNA como ADAR1 (*adenosine deaminase acting on RNA*) y Tudor-SN, con las cuales podría actuar de forma concertada en la degradación de mRNAs específicos (Nawaz et al. 2016a).

Los SGs son estructuras que contienen complejos de traducción que quedan bloqueados durante situaciones de estrés y cuya función es preservar mRNAs y evitar temporalmente su traducción hasta que se restauren las condiciones normales de la célula (Cassola 2011). Estímulos tales como la privación de glucosa, cambios de temperatura o el estrés oxidativo provocan la formación de SGs y determinan su composición (Stoecklin and Kedersha 2013). En *T. brucei*, los SGs se han observado en la forma procíclica del parásito, probablemente más expuesta a cambios de temperatura y falta de nutrientes dentro del insecto vector (Cassola 2011). Por otro lado, los cuerpos de procesamiento (*p-bodies*, *processing bodies*) son estructuras con características comunes, aunque en ellos se acumulan moléculas de mRNA que en este caso han sido marcadas para su degradación, así como factores encargados de procesar dichos mRNAs (Cassola 2011). Tanto en humanos como en *T. brucei* ambas estructuras, *p-bodies* y SGs, no son entidades herméticamente cerradas, sino que establecen interacciones físicas y funcionales (Stoecklin and Kedersha 2013), y tienen componentes en común tales como *TbDhh1* (Kramer 2014). Incluso se ha sugerido que en *T. brucei*, al igual que ocurre en levaduras, los gránulos de estrés surgen a partir de *p-bodies* existentes (Fritz et al. 2015) (Fig. E2).

Aunque aún no hemos podido establecer si *TbEndoV* se encuentra en *p-bodies* de forma constitutiva, nuestros datos indican que forma parte de los gránulos de estrés que se forman bajo condiciones de estrés nutricional. La privación de glucosa desencadena en la célula la producción de especies reactivas de oxígeno capaces de producir daños en mRNA mediante la desaminación de bases (Simons et al. 2009).

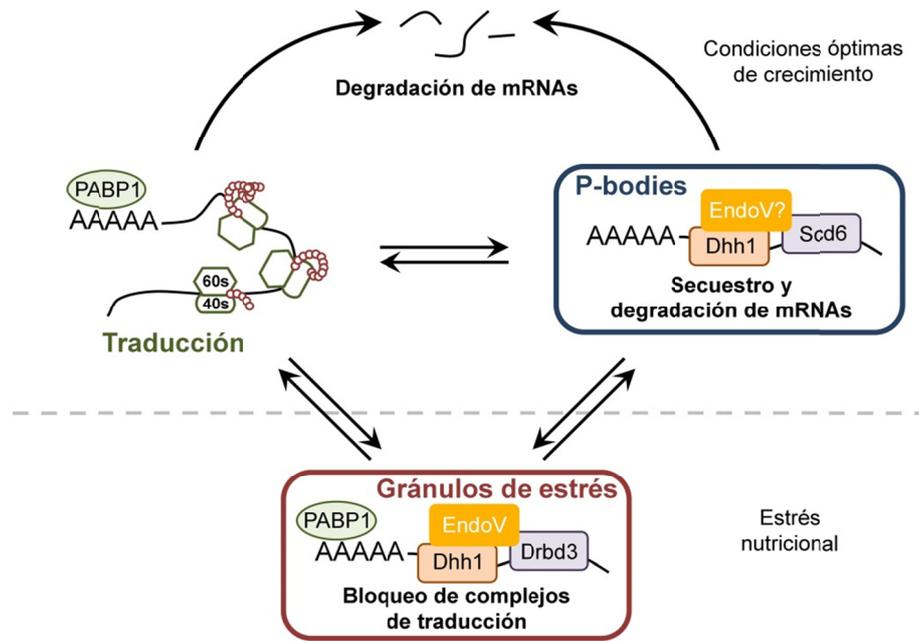


Figura E2. Papel propuesto para *TbEndoV* en la dinámica y control de la traducción de mRNAs en *T. brucei* en respuesta a estrés nutricional. Durante condiciones óptimas de crecimiento los transcritos se mantendrían en equilibrio entre las unidades de traducción o polirribosomas y los *p-bodies*. En estas estructuras los mRNAs son marcados para su degradación o devueltos para su traducción. En condiciones de estrés nutricional los mRNAs son retenidos, junto con los complejos de traducción, en SGs. *TbEndoV*, que colocaliza con *TbDhh1* durante situaciones de estrés nutricional, puede estar actuando como un control de calidad de los mRNAs que son reclutados en los *p-bodies* o bien formando parte de SGs.

En este contexto, *TbEndoV* puede estar efectuando un control de calidad de los mRNAs desaminados, regulando la transferencia de los transcritos dañados a los *p-bodies* que se encuentran en las inmediaciones para su eliminación. Por otro lado, durante condiciones de estrés nutricional, los niveles citoplasmáticos de ATP, nucleótido que actúa como inhibidor de hEndoV, disminuyen drásticamente, por lo que la relocalización de esta enzima a gránulos de estrés puede tener como objetivo su exclusión del citoplasma cuando su actividad es máxima, evitando así que degrade transcritos útiles para la célula (Nawaz et al. 2016a). Al mismo tiempo, el reclutamiento en los SGs de enzimas relacionadas funcionalmente y de otros factores puede ser una forma eficiente de crear las condiciones idóneas que permitan a EndoV ser funcionalmente activa.

E.3. SUSTRATOS POTENCIALES DE LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE LA ENDONUCLEASA V EN *T. brucei*

La capacidad de distintas EndoVs eucarióticas recombinantes de actuar de forma eficiente *in vitro* sobre sustratos de RNA con inosina ha sido plenamente demostrada en diversos estudios, incluyendo éste; no obstante, la función de estas enzimas a nivel celular aún no se ha establecido. Son varios los posibles papeles que *TbEndoV* puede estar desempeñando en la célula al igual que son varias las posibles causas que pueden dar origen a la presencia de inosina en RNA (Fig. E3). En todas sus formas celulares, *T. brucei* se ve expuesto a un fuerte estrés oxidativo y nitrosativo. Durante el proceso de infección, los macrófagos activados del huésped liberan grandes cantidades de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno como parte de la respuesta inmune primaria (Tabel et al. 1999; Duleu et al. 2004). Asimismo, el insecto vector también genera una respuesta de tipo oxidativo contra el parásito y tras la infección con *T. brucei*, la mosca tse-tsé incrementa los niveles de ROS (Hao et al. 2003). En este contexto celular, se produce la desaminación *in situ* de bases en DNA y RNA así como en los precursores que conforman los ácidos nucleicos, que pueden ser incorporados por las DNA y RNA polimerasas durante los procesos de replicación y transcripción, respectivamente. En *E. coli* y *S. cerevisiae*, la depleción de la inosina-trifosfato pirofosfatasa (ITPA), enzima que hidroliza el (d)ITP presente en el pool de nucleótidos, deriva en la acumulación de inosina, tanto en DNA como en RNA (Pang et al. 2012). Dado que la inosina es reconocida principalmente como guanina, su presencia puede resultar mutagénica (Yasui et al. 2008), o puede interferir con la síntesis de proteínas durante la traducción (Tuorto and Lyko 2016). Por tanto, es plausible especular con la idea de que *TbEndoV* tiene un papel fundamental en la eliminación de transcritos de RNA dañados/desaminados. La célula evita así la generación de proteínas mutantes no funcionales que pueden resultar perjudiciales así como el gasto energético que ello supone.

Otra vía para la incorporación de inosina en RNA es dependiente de la actuación de enzimas especializadas: las adenosina desaminasas que actúan sobre mRNA y tRNA (ADAR y ADAT respectivamente). Estas enzimas catalizan la desaminación controlada de adenina en posiciones específicas del RNA, donde esta modificación resulta imprescindible para procesos de *splicing*, la diversidad del código genético o la modificación funcional de proteínas (Nishikura 2010; Yeo et al. 2010). En células humanas, ADAR1 y EndoV colocalizan en gránulos de estrés inducidos por exposición a arsenito, por lo que se ha propuesto que ambas proteínas podrían colaborar en la degradación de transcritos (Nawaz et al. 2016a). ADAR1 generaría desaminaciones que hacen a los transcritos susceptibles de ser procesados por EndoV, permitiendo una renovación de los mismos. No obstante, en *T. brucei* no existe un ortólogo de ADAR y no se ha caracterizado hasta la fecha ninguna otra proteína de función análoga.

Si bien en *T. brucei* no se han encontrado proteínas ADAR capaces de actuar sobre mRNA, sí se ha descrito en profundidad la existencia de proteínas ADAT, capaz de desaminar adenosina en tRNA (Rubio et al. 2006; Rubio et al. 2007). ADAT es un heterodímero formado por *TbADAT2* (subunidad catalítica) y *TbADAT3* (de función meramente estructural). La depleción de *TbADAT2* mediante RNAi provoca un defecto severo en la proliferación celular (Rubio et al. 2007), lo que sugiere que esta enzima es esencial para el parásito y vital para generar anticodones que no se encuentran presentes en los tRNAs codificados en el genoma. Hasta ocho anticodones tienen adenina en la posición 34 (posición *wobble*) y son por tanto susceptibles de ser desaminados. Por ejemplo, el tRNA para la treonina presenta una adenina en posición 34 que es desaminada a inosina por ADAT (Rubio et al. 2006). Además este tRNA también se edita en posición 32, en este caso mediante la desaminación de citosina a uracilo.

En este estudio hemos visto que *in vitro*, *TbEndoV* reconoce y actúa eficientemente sobre la forma editada únicamente a inosina (Fig. D10), lo que sugiere que su función podría ser la incisión de estos tRNAs con el fin de promover su degradación. En cambio, la edición de C a U en posición 32 genera un sustrato menos

susceptible de ser procesado por *TbEndoV* y podría constituir un mecanismo de regulación de la actividad de esta endonucleasa.

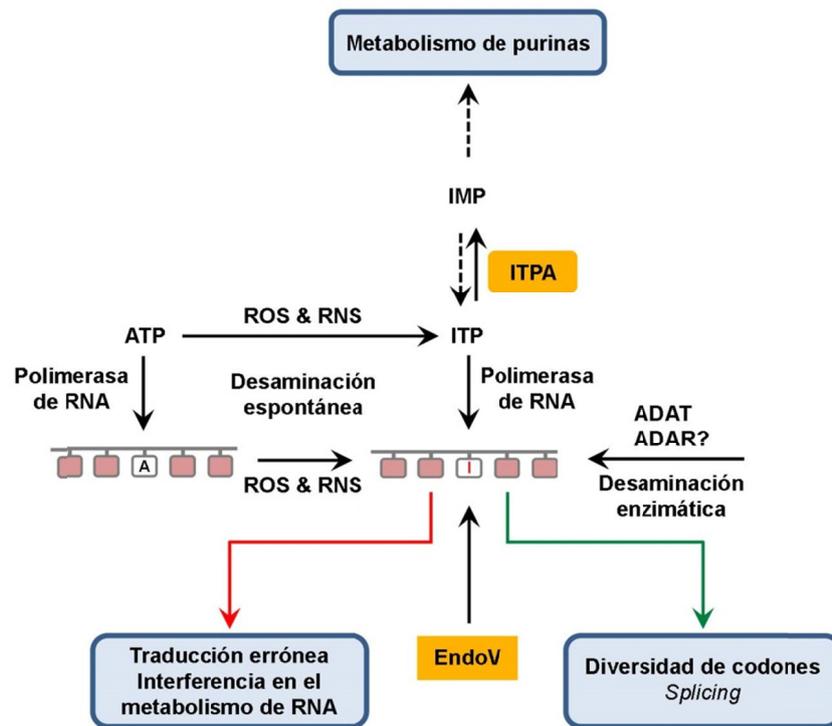


Figura E3. Vías de incorporación de la inosina a RNA y sus consecuencias. La desaminación de adenina puede ocurrir de forma espontánea o inducida por agentes exógenos como las especies reactivas de oxígeno y nitrógeno (ROS & NOS), y puede producirse directamente sobre el RNA o sobre los precursores que serán incorporados por las RNA polimerasas. Su presencia puede interferir en el metabolismo de RNA y provocar errores durante la traducción. La inosina trifosfato pirofosfatasa (ITPA) cataliza la hidrólisis de ITP a su forma monofosfato, manteniendo bajos niveles intracelulares de este nucleótido para evitar su incorporación a RNA. Otra vía de aparición de inosina en RNA es la desaminación catalizada por actividades enzimáticas (ADAR/ADAT) de posiciones específicas con el objetivo de aumentar la diversidad de codones, modificar funcionalmente proteínas o permitir un correcto *splicing*.

Más allá de un posible papel en la degradación de tRNAs editados, la actividad de *TbEndoV* sobre este tipo de sustratos recuerda a la de ribonucleasas como la angiogenina humana o la Rny1 de levaduras. Estas nucleasas llevan a cabo un corte en la zona del anticodón de tRNAs como parte de una respuesta a estrés (Thompson and Parker 2009a; Yamasaki et al. 2009).

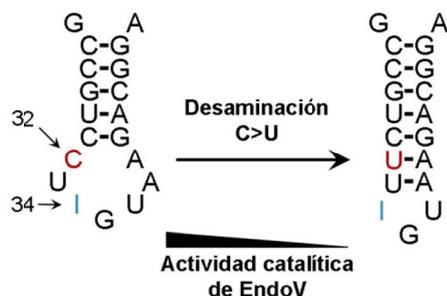


Figura E4. La desaminación de la citosina en posición 32 podría alterar la estructura secundaria del RNA disminuyendo la capacidad catalítica de *TbEndoV* sobre este sustrato.

Sin embargo, en este caso la incisión del sustrato no tiene por objetivo su degradación y retirada, ya que los niveles totales de tRNAs totales no cambian de forma sustancial. En cambio, los RNAs de pequeño tamaño generados pueden actuar inhibiendo la traducción de proteínas o promoviendo la degradación o represión de ciertos mRNAs bajo determinadas circunstancias fisiológicas (Thompson and Parker 2009b; Dhahbi 2015). Este tipo de moléculas se han encontrado en *Tetrahymena*, *Aspergillus* y *Trypanosoma cruzi* tras periodos de estrés nutricional (Lee and Collins 2005; Jochl et al. 2008; Garcia-Silva et al. 2010), mientras que en células humanas, *Saccharomyces* y *Arabidopsis* se acumulan cuando se producen situaciones de estrés oxidativo (Thompson et al. 2008). Concretamente, *T. cruzi* secreta vesículas conteniendo estos tRNAs procesados que son capaces de alcanzar las células del huésped e influir en la expresión de genes relacionados con la respuesta inmune, facilitando de esta forma el proceso de infección (Garcia-Silva et al. 2014). La forma en que estos tRNAs son generados difiere del procesamiento específico que lleva a cabo EndoV, dependiente de la presencia de inosina. Sin embargo, cabe preguntarse si el producto que resulta de la actividad de EndoV puede estar realizando una función semejante, participando en rutas no canónicas de regulación de la expresión.

E.4. ENDOV E INTEGRIDAD GENÓMICA

A diferencia de las EndoVs procarióticas donde esta enzima juega un papel importante en el mantenimiento de la integridad genómica (Schouten and Weiss 1999;

Weiss 2001; Lopez-Olmos et al. 2012), los ortólogos de mamíferos junto con el de *Trypanosoma* no parecen actuar sobre inosina en DNA *in vitro* o lo hacen con muy baja eficiencia (Mi 2012, Vik, 2013, este trabajo). A pesar de ello, se ha descrito que la expresión de las enzimas humana y de ratón revierte el aumento en la tasa de mutación espontánea que exhiben distintos mutantes de *E. coli* deficientes en EndoV (*nfi*) (Moe et al. 2003; Mi et al. 2012). Hay que considerar no obstante que estos resultados se basan en ensayos de complementación en cepas de *E. coli* que expresan niveles de proteína muy por encima de los que existen en condiciones fisiológicas. Así, la sobreexpresión de mEndoV es capaz de contrarrestar el fenotipo hipermutador que muestran cepas de *E. coli* deficientes en EndoV y AlkA (*nfi alkA*), encargadas de reparar inosina en DNA (Moe et al. 2003). De forma análoga, hEndoV reduce el fenotipo hipermutador de mutantes de *E. coli* deficientes en EndoV y las uracil-DNA glicosilasas MUG (*mispaired uracil glycosylase*) y UNG (genes *nfi mug ung*) (Mi et al. 2012).

En bacterias, EndoV actúa tras la ruta BER como una segunda línea de defensa frente a bases desaminadas. En *T. brucei*, una única enzima con actividad uracil-DNA glicosilasa (UNG) inicia la reparación de uracilo mediante el sistema BER (Castillo-Acosta et al. 2012), por el contrario no parece existir ninguna DNA glicosilasa que actúe sobre hipoxantina (Charret et al. 2012). Resultaría por tanto de gran interés determinar si la tasa de mutación de *T. brucei* experimenta un incremento significativo tras la depleción de EndoV y UNG para establecer de manera inequívoca su papel en reparación. La construcción de las correspondientes líneas celulares transgénicas que expresan el gen HSV-TK se está llevando a cabo actualmente en nuestro laboratorio. El análisis de la tasa de mutación en dichas líneas permitirá establecer si la endonucleasa V juega un papel en el mantenimiento de la integridad del genoma en *Trypanosoma*.

Tras proceder a evaluar la implicación de *TbEndoV* en la protección frente a agentes que comprometen la integridad genómica, una única observación parece apuntar a una posible función de EndoV en reparación de DNA; la sobreexpresión de *TbEndoV* revierte la sensibilidad de células deficientes en UNG a bisulfito sódico (SB), agente

desaminante que genera uracilo en DNA en forma de pares U:G. En cambio, no se observó el mismo efecto empleando metotrexato o un donador de óxido nítrico. Esto sugiere que EndoV podría participar en la reparación de uracilo sólo cuando forma un apareamiento erróneo (Yao and Kow 1994; Feng et al. 2005). La depleción de *TbEndoV*, sin embargo, no sensibiliza a las células frente a SB lo que sugiere que BER (UNG) es la principal vía de reparación de este tipo de daños y por tanto, el posible impacto de *TbEndoV* frente a SB sólo se manifestaría en ausencia de UNG. No obstante, tampoco podemos descartar que la sobreexpresión de *TbEndoV*, muy por encima del nivel normal, pueda estar compensando de forma no fisiológica la baja actividad de la enzima frente a desoxiuridina.

E.5. RELEVANCIA DE *TbEndoV* EN LA VIABILIDAD DE *T. brucei* IN VITRO Y EN MODELOS DE INFECCIÓN ANIMAL

Durante el desarrollo de esta tesis doctoral, se han empleado diferentes estrategias con el fin de suprimir la expresión de *TbEndoV*. En una primera aproximación se procedió al doble reemplazamiento alélico con el fin de generar parásitos *knock-out* (KO) para esta actividad enzimática. En este caso, como se refleja en la sección de resultados, sólo se obtuvieron líneas celulares KO en la forma sanguínea pero no en la forma procíclica del parásito. En esta forma celular se empleó como estrategia alternativa la supresión de la expresión de *TbEndoV* mediante RNA de interferencia.

Mientras que la inactivación de *TbEndoV* no provocó ningún efecto en la tasa de crecimiento de la forma sanguínea, la supresión parcial de su expresión en la forma procíclica indujo defectos significativos en proliferación acompañados de alteraciones en el ciclo celular del parásito. Esta diferencia de fenotipos se puede explicar en base a la existencia de importantes diferencias metabólicas entre las fases del ciclo vida del parásito. Mientras que alrededor de un 6 % de los genes se expresan de forma diferente en las formas procíclica y sanguínea de *T. brucei*, a nivel de mRNA *TbEndoV* presenta

niveles de expresión semejantes en ambos estadios del parásito (Jensen et al. 2009; Siegel et al. 2010), por lo que no parece probable que el fenotipo observado se deba a diferencias en la necesidad de esta enzima a lo largo de las distintas fases del ciclo de vida. Mientras que la detección de la proteína por western blot ha sido inviable, su presencia sí se ha puesto de manifiesto por estudios de inmunofluorescencia en formas procíclicas. Es posible que *TbEndoV* establezca interacciones funcionales con proteínas expresadas únicamente en esta forma del parásito, o bien actúe en el metabolismo de RNAs generados específicamente o esenciales en formas procíclicas. Otro factor potencial que explicaría el papel esencial de *TbEndoV* en procíclicos puede estar relacionado con una función específica asociada al metabolismo mitocondrial. La forma procíclica tiene una mitocondria altamente activa en la que el ATP es generado mediante fosforilación oxidativa, mientras que la forma sanguínea carece de los complejos respiratorios y genera ATP exclusivamente a través de la glicolisis. Por tanto, la forma procíclica genera niveles endógenos superiores de ROS, por lo que la pérdida de EndoV puede ser más perjudicial en esta fase del parásito. De forma análoga, la inactivación de genes implicados en reparación de daños oxidativos en DNA tales como MSH2 y BRCA2 provoca efectos diferentes en la estabilidad del genoma de las formas procíclicas o sanguíneas (Trenaman et al. 2013; Grazielle-Silva et al. 2015). La identificación de los sustratos fisiológicos de *TbEndoV* contribuirá sin duda a entender su papel específico en cada uno de las etapas del ciclo de vida de *T. brucei*.

Si bien la línea celular deficiente en *TbEndoV* derivada de tripanosomas sanguíneos no presenta un fenotipo destacable, esto no permite descartar que esta enzima tenga una función relevante durante el proceso de infección del huésped mamífero. Por este motivo, se llevaron a cabo ensayos de infectividad en un modelo de ratón que nos permitieran evaluar el impacto de esta endonucleasa en la capacidad infectiva y la virulencia. El experimento realizado en este estudio indica que la depleción de *TbEndoV* no interfiere en la capacidad infectiva de *T. brucei*. No obstante, pueden existir múltiples causas por las que un posible fenotipo quede enmascarado en el modelo utilizado. Por un lado, se emplea una línea monomórfica de *T. brucei*, con una

virulencia notablemente superior a la mostrada por las cepas salvajes. La rapidez con la que se desarrolla la infección y muerte del animal en este modelo puede estar ocultando un efecto a medio-largo plazo causado por la ausencia de EndoV. Es también posible que *TbEndoV* tenga mayor relevancia en otras etapas del ciclo de vida del parásito cuyo estudio no permite nuestro modelo, como durante la fase de diferenciación o en los estadios no proliferativos. La reducción del número de parásitos por inóculo con el fin de ampliar el periodo de la ventana de infección, así como la realización de ensayos específicos de diferenciación permitirían establecer el papel de EndoV en la supervivencia celular en un contexto biológico más cercano al que se da en la infección en el hospedador mamífero y en el insecto vector.

CONCLUSIONES

F. CONCLUSIONES

1. *Trypanosoma brucei* posee una endonucleasa V (*TbEndoV*) que exhibe un mayor nivel de homología con los ortólogos eucarióticos que con los procarióticos. La proteína presenta un alto grado de conservación de los residuos implicados en la interacción enzima-sustrato (Tyr133), en la interacción con el cofactor metálico durante la catálisis (Asp95-Glu142-Asp170) y en la interacción enzima-producto (Lys199).
2. *TbEndoV* es una endoribonucleasa con actividad catalítica eficiente sobre sustratos de RNA de cadena sencilla que contienen inosina. En cambio, *TbEndoV* no presenta actividad endonucleasa o ésta es extremadamente baja sobre sustratos de DNA con inosina de cadena sencilla o doble.
3. La eficiencia de la actividad catalítica de la endonucleasa V depende en gran medida de la presencia de un ribonucleótido en posición 3' respecto de la lesión inosina, lo que sugiere que el grupo 2'-hidroxilo de esta ribosa es esencial para la catálisis.
4. La sustitución mediante mutagénesis dirigida del aspartato en posición 95 de *TbEndoV* por un residuo de alanina suprime completamente la actividad endonucleasa de esta enzima en ensayos *in vitro*.
5. Los ensayos *in vitro* realizados sugieren que los tRNAs que presentan inosina en posición 34 del lazo del anticodón son eficazmente reconocidos y procesados por *TbEndoV* y podrían constituir sustratos fisiológicos potenciales para esta enzima. La sustitución de la citosina por uracilo en posición 32, cercana al anticodón, afecta de forma negativa a la capacidad de incisión de sustratos con inosina en posición 34 por *TbEndoV*. Esto sugiere que la edición de C a U en posición 32 podría constituir un mecanismo de control sobre la actividad de la endonucleasa V.

6. La inactivación de *TbEndoV* mediante doble reemplazamiento alélico en células sanguíneas de *T. brucei* revela que no es una proteína esencial para la supervivencia de esta forma *in vitro*. En cambio, la supresión parcial de su expresión en parásitos de la forma procíclica produce un defecto significativo en proliferación.
7. El análisis del contenido en DNA mediante citometría de flujo y la cuantificación de núcleos y kinetoplastos mediante microscopia de fluorescencia indican la existencia de importantes alteraciones en la progresión del ciclo celular de células procíclicas con bajos niveles de *TbEndoV*. Estas alteraciones son indicativas de defectos en la duplicación del DNA nuclear y la división mitótica.
8. Los experimentos de infectividad realizados en un modelo murino con células sanguíneas de *T. brucei* deficientes en endonucleasa V indican que esta enzima no es esencial para el desarrollo de la infección en el huésped mamífero.
9. En células sanguíneas de *T. brucei*, la endonucleasa V no ejerce un papel protector frente a los daños genotóxicos inducidos por exposición a metotrexato, bisulfito de sodio u óxido nítrico, lo que sugiere que esta proteína no tiene un papel relevante en el mantenimiento de la integridad genómica en estas células. No obstante, la sobreexpresión de *TbEndoV* revierte el fenotipo de sensibilidad a bisulfito de sodio de células sanguíneas deficientes en UNG, por lo que en ausencia de la ruta BER de reparación de uracilo, *TbEndoV* podría estar iniciando la reparación de los pares erróneos U:G inducidos por este agente genotóxico.
10. La endonucleasa V de *T. brucei* es una proteína con distribución predominantemente citosólica, sin embargo no se puede descartar su localización, aunque de forma minoritaria, en el núcleo celular. Esta distribución sugiere un papel preferente para *TbEndoV* en el metabolismo de RNA.

11. En células procíclicas de *T. brucei*, EndoV experimenta una redistribución citosólica durante periodos de estrés nutricional, durante los cuales muestra una acumulación granular muy definida y colocalización con la helicasa de RNA *TbDhh1*. Estas observaciones indican que, en respuesta a la privación de nutrientes, *TbEndoV* se relocaliza en estructuras transitorias conocidas como gránulos de estrés, y apoyan la idea de su vinculación con el metabolismo de RNA en *T. brucei*.

BIBLIOGRAFÍA

G. BIBLIOGRAFÍA

- Achcar F, Kerkhoven EJ, Barrett MP. 2014. Trypanosoma brucei: meet the system. *Current opinion in microbiology* **20**: 162-169.
- Acosta-Serrano A, Vassella E, Liniger M, Kunz Renggli C, Brun R, Roditi I, Englund PT. 2001. The surface coat of procyclic Trypanosoma brucei: programmed expression and proteolytic cleavage of procyclin in the tsetse fly. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98**: 1513-1518.
- Bellofatto V, Cross GA. 1989. Expression of a bacterial gene in a trypanosomatid protozoan. *Science* **244**: 1167-1169.
- Biebinger S, Wirtz LE, Lorenz P, Clayton C. 1997. Vectors for inducible expression of toxic gene products in bloodstream and procyclic Trypanosoma brucei. *Molecular and biochemical parasitology* **85**: 99-112.
- Bringaud F, Riviere L, Coustou V. 2006. Energy metabolism of trypanosomatids: adaptation to available carbon sources. *Molecular and biochemical parasitology* **149**: 1-9.
- Brooks SC, Adhikary S, Rubinson EH, Eichman BF. 2013. Recent advances in the structural mechanisms of DNA glycosylases. *Biochim Biophys Acta* **1834**: 247-271.
- Brun R, Blum J, Chappuis F, Burri C. 2010. Human African trypanosomiasis. *Lancet* **375**: 148-159.
- Buchan JR, Parker R. 2009. Eukaryotic stress granules: the ins and outs of translation. *Molecular cell* **36**: 932-941.
- Budke B, Kuzminov A. 2006. Hypoxanthine Incorporation Is Nonmutagenic in Escherichia coli. *Journal of Bacteriology* **188**: 6553-6560.
- Bullock WO, Fernandez, J.M. and Short J.M. 1987. XL1-Blue—a high-efficiency plasmid transforming recA Escherichia coli strain with β -galactosidase selection. *Biotechniques* **5**: 376-379.
- Burney S, Caulfield JL, Niles JC, Wishnok JS, Tannenbaum SR. 1999. The chemistry of DNA damage from nitric oxide and peroxynitrite. *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* **424**: 37-49.
- Cantara WA, Bilbille Y, Kim J, Kaiser R, Leszczynska G, Malkiewicz A, Agris PF. 2012. Modifications modulate anticodon loop dynamics and codon recognition of E. coli tRNA(Arg1,2). *Journal of molecular biology* **416**: 579-597.

- Carruthers VB, Cross GA. 1992. High-efficiency clonal growth of bloodstream- and insect-form *Trypanosoma brucei* on agarose plates. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **89**: 8818-8821.
- Cassola A. 2011. RNA Granules Living a Post-transcriptional Life: the Trypanosomes' Case. *Current chemical biology* **5**: 108-117.
- Castillo-Acosta VM, Aguilar-Pereyra F, Vidal AE, Navarro M, Ruiz-Perez LM, Gonzalez-Pacanowska D. 2012. Trypanosomes lacking uracil-DNA glycosylase are hypersensitive to antifolates and present a mutator phenotype. *The international journal of biochemistry & cell biology* **44**: 1555-1568.
- Castillo-Acosta VM, Estevez AM, Vidal AE, Ruiz-Perez LM, Gonzalez-Pacanowska D. 2008. Depletion of dimeric all-alpha dUTPase induces DNA strand breaks and impairs cell cycle progression in *Trypanosoma brucei*. *The international journal of biochemistry & cell biology* **40**: 2901-2913.
- Charret KS, Requena CE, Castillo-Acosta VM, Ruiz-Perez LM, Gonzalez-Pacanowska D, Vidal AE. 2012. *Trypanosoma brucei* AP endonuclease 1 has a major role in the repair of abasic sites and protection against DNA-damaging agents. *DNA repair* **11**: 53-64.
- Checchi F, Filipe JA, Haydon DT, Chandramohan D, Chappuis F. 2008. Estimates of the duration of the early and late stage of gambiense sleeping sickness. *BMC infectious diseases* **8**: 16.
- Clayton CE, Estevez AM, Hartmann C, Alibu VP, Field M, Horn D. 2005. Down-regulating gene expression by RNA interference in *Trypanosoma brucei*. *Methods Mol Biol* **309**: 39-60.
- Crick FH. 1966. Codon--anticodon pairing: the wobble hypothesis. *Journal of molecular biology* **19**: 548-555.
- Cristodero M, Schimanski B, Heller M, Roditi I. 2014. Functional characterization of the trypanosome translational repressor SCD6. *Biochem J* **457**: 57-67.
- Dalhus B, Arvai AS, Rosnes I, Olsen OE, Backe PH, Alseth I, Gao H, Cao W, Tainer JA, Bjoras M. 2009. Structures of endonuclease V with DNA reveal initiation of deaminated adenine repair. *Nature structural & molecular biology* **16**: 138-143.
- De Gaudenzi JG, Noe G, Campo VA, Frasch AC, Cassola A. 2011. Gene expression regulation in trypanosomatids. *Essays in biochemistry* **51**: 31-46.
- Dedon PC, Tannenbaum SR. 2004. Reactive nitrogen species in the chemical biology of inflammation. *Archives of biochemistry and biophysics* **423**: 12-22.

- Demple B, Linn S. 1982. On the recognition and cleavage mechanism of *Escherichia coli* endodeoxyribonuclease V, a possible DNA repair enzyme. *The Journal of biological chemistry* **257**: 2848-2855.
- Dhahbi JM. 2015. 5' tRNA Halves: The Next Generation of Immune Signaling Molecules. *Front Immunol* **6**: 74.
- Duleu S, Vincendeau P, Courtois P, Semballa S, Lagroye I, Daulouede S, Boucher JL, Wilson KT, Veyret B, Gobert AP. 2004. Mouse strain susceptibility to trypanosome infection: an arginase-dependent effect. *J Immunol* **172**: 6298-6303.
- Engelward BP, Weeda G, Wyatt MD, Broekhof JL, de Wit J, Donker I, Allan JM, Gold B, Hoeijmakers JH, Samson LD. 1997. Base excision repair deficient mice lacking the Aag alkyladenine DNA glycosylase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **94**: 13087-13092.
- Feng H, Klutz AM, Cao W. 2005. Active site plasticity of endonuclease V from *Salmonella typhimurium*. *Biochemistry* **44**: 675-683.
- Fenn K, Matthews KR. 2007. The cell biology of *Trypanosoma brucei* differentiation. *Current opinion in microbiology* **10**: 539-546.
- Fernandez-Moya SM, Garcia-Perez A, Kramer S, Carrington M, Estevez AM. 2012. Alterations in DRBD3 ribonucleoprotein complexes in response to stress in *Trypanosoma brucei*. *PloS one* **7**: e48870.
- Fladeby C, Vik ES, Laerdahl JK, Gran Neurauter C, Heggelund JE, Thorgaard E, Strom-Andersen P, Bjoras M, Dalhus B, Alseth I. 2012. The human homolog of *Escherichia coli* endonuclease V is a nucleolar protein with affinity for branched DNA structures. *PloS one* **7**: e47466.
- Franco JR, Simarro PP, Diarra A, Jannin JG. 2014. Epidemiology of human African trypanosomiasis. *Clinical epidemiology* **6**: 257-275.
- Fritz M, Vanselow J, Sauer N, Lamer S, Goos C, Siegel TN, Subota I, Schlosser A, Carrington M, Kramer S. 2015. Novel insights into RNP granules by employing the trypanosome's microtubule skeleton as a molecular sieve. *Nucleic acids research* **43**: 8013-8032.
- Garcia-Silva MR, das Neves RF, Cabrera-Cabrera F, Sanguinetti J, Medeiros LC, Robello C, Naya H, Fernandez-Calero T, Souto-Padron T, de Souza W et al. 2014. Extracellular vesicles shed by *Trypanosoma cruzi* are linked to small RNA pathways, life cycle regulation, and susceptibility to infection of mammalian cells. *Parasitol Res* **113**: 285-304.

- Garcia-Silva MR, Frugier M, Tosar JP, Correa-Dominguez A, Ronalte-Alves L, Parodi-Talice A, Rovira C, Robello C, Goldenberg S, Cayota A. 2010. A population of tRNA-derived small RNAs is actively produced in *Trypanosoma cruzi* and recruited to specific cytoplasmic granules. *Molecular and biochemical parasitology* **171**: 64-73.
- Gates FT, 3rd, Linn S. 1977. Endonuclease V of *Escherichia coli*. *The Journal of biological chemistry* **252**: 1647-1653.
- Gerber A, Grosjean H, Melcher T, Keller W. 1998. Tad1p, a yeast tRNA-specific adenosine deaminase, is related to the mammalian pre-mRNA editing enzymes ADAR1 and ADAR2. *The EMBO journal* **17**: 4780-4789.
- Gerber AP, Keller W. 1999. An adenosine deaminase that generates inosine at the wobble position of tRNAs. *Science* **286**: 1146-1149.
- Gorlach M, Burd CG, Dreyfuss G. 1994. The mRNA poly(A)-binding protein: localization, abundance, and RNA-binding specificity. *Experimental cell research* **211**: 400-407.
- Goujon M, McWilliam H, Li W, Valentin F, Squizzato S, Paern J, Lopez R. 2010. A new bioinformatics analysis tools framework at EMBL-EBI. *Nucleic acids research* **38**: W695-699.
- Grazielle-Silva V, Zeb TF, Bolderson J, Campos PC, Miranda JB, Alves CL, Machado CR, McCulloch R, Teixeira SM. 2015. Distinct Phenotypes Caused by Mutation of MSH2 in Trypanosome Insect and Mammalian Life Cycle Forms Are Associated with Parasite Adaptation to Oxidative Stress. *PLoS neglected tropical diseases* **9**: e0003870.
- Grosjean H, de Crecy-Lagard V, Marck C. 2010. Deciphering synonymous codons in the three domains of life: co-evolution with specific tRNA modification enzymes. *FEBS letters* **584**: 252-264.
- Grosjean H, Sprinzl M, Steinberg S. 1995. Posttranscriptionally modified nucleosides in transfer RNA: their locations and frequencies. *Biochimie* **77**: 139-141.
- Grunfelder CG, Engstler M, Weise F, Schwarz H, Stierhof YD, Morgan GW, Field MC, Overath P. 2003. Endocytosis of a glycosylphosphatidylinositol-anchored protein via clathrin-coated vesicles, sorting by default in endosomes, and exocytosis via RAB11-positive carriers. *Mol Biol Cell* **14**: 2029-2040.
- Guo G, Weiss B. 1998. Endonuclease V (nfi) mutant of *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol* **180**: 46-51.
- Hammarton TC. 2007. Cell cycle regulation in *Trypanosoma brucei*. *Molecular and biochemical parasitology* **153**: 1-8.

- Hanssen-Bauer A, Solvang-Garten K, Sundheim O, Pena-Diaz J, Andersen S, Slupphaug G, Krokan HE, Wilson DM, 3rd, Akbari M, Otterlei M. 2011. XRCC1 coordinates disparate responses and multiprotein repair complexes depending on the nature and context of the DNA damage. *Environmental and molecular mutagenesis* **52**: 623-635.
- Hao Z, Kasumba I, Aksoy S. 2003. Proventriculus (cardia) plays a crucial role in immunity in tsetse fly (Diptera: Glossinidae). *Insect Biochem Mol Biol* **33**: 1155-1164.
- Hardeland U, Bentele M, Jiricny J, Schar P. 2003. The versatile thymine DNA-glycosylase: a comparative characterization of the human, Drosophila and fission yeast orthologs. *Nucleic acids research* **31**: 2261-2271.
- Hide G. 1999. History of sleeping sickness in East Africa. *Clinical microbiology reviews* **12**: 112-125.
- Horn D. 2014. Antigenic variation in African trypanosomes. *Molecular and biochemical parasitology* **195**: 123-129.
- Horowitz RW, Zhang H, Schwartz EL, Ladner RD, Wadler S. 1997. Measurement of deoxyuridine triphosphate and thymidine triphosphate in the extracts of thymidylate synthase-inhibited cells using a modified DNA polymerase assay. *Biochem Pharmacol* **54**: 635-638.
- Huang J, Lu J, Barany F, Cao W. 2001. Multiple cleavage activities of endonuclease V from *Thermotoga maritima*: recognition and strand nicking mechanism. *Biochemistry* **40**: 8738-8748.
- Huang J, Lu J, Barany F, Cao W. 2002. Mutational analysis of endonuclease V from *Thermotoga maritima*. *Biochemistry* **41**: 8342-8350.
- Jensen BC, Sivam D, Kifer CT, Myler PJ, Parsons M. 2009. Widespread variation in transcript abundance within and across developmental stages of *Trypanosoma brucei*. *BMC Genomics* **10**: 482.
- Jensen RE, Englund PT. 2012. Network news: the replication of kinetoplast DNA. *Annual review of microbiology* **66**: 473-491.
- Jin Y, Zhang W, Li Q. 2009. Origins and evolution of ADAR-mediated RNA editing. *IUBMB life* **61**: 572-578.
- Jochl C, Rederstorff M, Hertel J, Stadler PF, Hofacker IL, Schrettl M, Haas H, Huttenhofer A. 2008. Small ncRNA transcriptome analysis from *Aspergillus fumigatus* suggests a novel mechanism for regulation of protein synthesis. *Nucleic acids research* **36**: 2677-2689.

- Kanugula S, Pauly GT, Moschel RC, Pegg AE. 2005. A bifunctional DNA repair protein from *Ferroplasma acidarmanus* exhibits O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase and endonuclease V activities. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**: 3617-3622.
- Karran P, Lindahl T. 1980. Hypoxanthine in deoxyribonucleic acid: generation by heat-induced hydrolysis of adenine residues and release in free form by a deoxyribonucleic acid glycosylase from calf thymus. *Biochemistry* **19**: 6005-6011.
- Kedersha NL, Gupta M, Li W, Miller I, Anderson P. 1999. RNA-binding proteins TIA-1 and TIAR link the phosphorylation of eIF-2 alpha to the assembly of mammalian stress granules. *J Cell Biol* **147**: 1431-1442.
- Keller W, Wolf J, Gerber A. 1999. Editing of messenger RNA precursors and of tRNAs by adenosine to inosine conversion. *FEBS letters* **452**: 71-76.
- Kiyonari S, Egashira Y, Ishino S, Ishino Y. 2014. Biochemical characterization of endonuclease V from the hyperthermophilic archaeon, *Pyrococcus furiosus*. *Journal of biochemistry* **155**: 325-333.
- Kramer S. 2014. RNA in development: how ribonucleoprotein granules regulate the life cycles of pathogenic protozoa. *Wiley interdisciplinary reviews RNA* **5**: 263-284.
- Kramer S, Bannerman-Chukualim B, Ellis L, Boulden EA, Kelly S, Field MC, Carrington M. 2013. Differential localization of the two *T. brucei* poly(A) binding proteins to the nucleus and RNP granules suggests binding to distinct mRNA pools. *PloS one* **8**: e54004.
- Krokan HE, Bjoras M. 2013. Base excision repair. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* **5**: a012583.
- Kuraoka I. 2015. Diversity of Endonuclease V: From DNA Repair to RNA Editing. *Biomolecules* **5**: 2194-2206.
- Lee CC, Yang YC, Goodman SD, Yu YH, Lin SB, Kao JT, Tsai KS, Fang WH. 2010. Endonuclease V-mediated deoxyinosine excision repair in vitro. *DNA repair* **9**: 1073-1079.
- Lee SR, Collins K. 2005. Starvation-induced cleavage of the tRNA anticodon loop in *Tetrahymena thermophila*. *The Journal of biological chemistry* **280**: 42744-42749.
- Leonard GA, Booth ED, Hunter WN, Brown T. 1992. The conformational variability of an adenosine.inosine base-pair in a synthetic DNA dodecamer. *Nucleic acids research* **20**: 4753-4759.

- Limbach PA, Crain PF, McCloskey JA. 1994. Summary: the modified nucleosides of RNA. *Nucleic acids research* **22**: 2183-2196.
- Lindahl T. 1993. Instability and decay of the primary structure of DNA. *Nature* **362**: 709-715.
- Liu J, He B, Qing H, Kow YW. 2000. A deoxyinosine specific endonuclease from hyperthermophile, *Archaeoglobus fulgidus*: a homolog of *Escherichia coli* endonuclease V. *Mutation research* **461**: 169-177.
- Lopez-Olmos K, Hernandez MP, Contreras-Garduno JA, Robleto EA, Setlow P, Yasbin RE, Pedraza-Reyes M. 2012. Roles of endonuclease V, uracil-DNA glycosylase, and mismatch repair in *Bacillus subtilis* DNA base-deamination-induced mutagenesis. *J Bacteriol* **194**: 243-252.
- Luria SE, Delbruck M. 1943. Mutations of Bacteria from Virus Sensitivity to Virus Resistance. *Genetics* **28**: 491-511.
- Mabbott NA, Coulson PS, Smythies LE, Wilson RA, Sternberg JM. 1998. African trypanosome infections in mice that lack the interferon-gamma receptor gene: nitric oxide-dependent and -independent suppression of T-cell proliferative responses and the development of anaemia. *Immunology* **94**: 476-480.
- Majorek KA, Dunin-Horkawicz S, Steczkiewicz K, Muszewska A, Nowotny M, Ginalski K, Bujnicki JM. 2014. The RNase H-like superfamily: new members, comparative structural analysis and evolutionary classification. *Nucleic acids research* **42**: 4160-4179.
- Matthews KR. 2005. The developmental cell biology of *Trypanosoma brucei*. *Journal of cell science* **118**: 283-290.
- Matthews KR, Gull K. 1994. Cycles within cycles: the interplay between differentiation and cell division in *Trypanosoma brucei*. *Parasitol Today* **10**: 473-476.
- McWilliam H, Li W, Uludag M, Squizzato S, Park YM, Buso N, Cowley AP, Lopez R. 2013. Analysis Tool Web Services from the EMBL-EBI. *Nucleic acids research* **41**: W597-600.
- Mi R, Abole AK, Cao W. 2011. Dissecting endonuclease and exonuclease activities in endonuclease V from *Thermotoga maritima*. *Nucleic acids research* **39**: 536-544.
- Mi R, Alford-Zappala M, Kow YW, Cunningham RP, Cao W. 2012. Human endonuclease V as a repair enzyme for DNA deamination. *Mutation research* **735**: 12-18.
- Moe A, Ringvoll J, Nordstrand LM, Eide L, Bjoras M, Seeberg E, Rognes T, Klungland A. 2003. Incision at hypoxanthine residues in DNA by a mammalian homologue

- of the *Escherichia coli* antimutator enzyme endonuclease V. *Nucleic acids research* **31**: 3893-3900.
- Morita Y, Shibutani T, Nakanishi N, Nishikura K, Iwai S, Kuraoka I. 2013. Human endonuclease V is a ribonuclease specific for inosine-containing RNA. *Nature communications* **4**: 2273.
- Namangala B. 2011. How the African trypanosomes evade host immune killing. *Parasite Immunol* **33**: 430-437.
- Nawaz MS, Vik ES, Berges N, Fladeby C, Bjoras M, Dalhus B, Alseth I. 2016a. Regulation of Human Endonuclease V Activity and Relocalization to Cytoplasmic Stress Granules. *The Journal of biological chemistry* **291**: 21786-21801.
- Nawaz MS, Vik ES, Ronander ME, Solvoll AM, Blicher P, Bjoras M, Alseth I, Dalhus B. 2016b. Crystal structure and MD simulation of mouse EndoV reveal wedge motif plasticity in this inosine-specific endonuclease. *Scientific reports* **6**: 24979.
- Nguyen T, Brunson D, Crespi CL, Penman BW, Wishnok JS, Tannenbaum SR. 1992. DNA damage and mutation in human cells exposed to nitric oxide in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**: 3030-3034.
- Nishikura K. 2006. Editor meets silencer: crosstalk between RNA editing and RNA interference. *Nature reviews Molecular cell biology* **7**: 919-931.
- Nishikura K. 2010. Functions and regulation of RNA editing by ADAR deaminases. *Annual review of biochemistry* **79**: 321-349.
- Novoa EM, Pavon-Eternod M, Pan T, Ribas de Pouplana L. 2012. A role for tRNA modifications in genome structure and codon usage. *Cell* **149**: 202-213.
- O'Brien PJ. 2006. Catalytic promiscuity and the divergent evolution of DNA repair enzymes. *Chemical reviews* **106**: 720-752.
- Ogbadoyi E, Ersfeld K, Robinson D, Sherwin T, Gull K. 2000. Architecture of the *Trypanosoma brucei* nucleus during interphase and mitosis. *Chromosoma* **108**: 501-513.
- Ono T, Nakabayashi T. 1980. Studies on the effect of bleomycin on *Trypanosoma gambiense*. *Biken journal* **23**: 143-155.
- Pang B, McFaline JL, Burgis NE, Dong M, Taghizadeh K, Sullivan MR, Elmquist CE, Cunningham RP, Dedon PC. 2012. Defects in purine nucleotide metabolism lead to substantial incorporation of xanthine and hypoxanthine into DNA and RNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **109**: 2319-2324.
- Phillips TA, VanBogelen RA, Neidhardt FC. 1984. lon gene product of *Escherichia coli* is a heat-shock protein. *J Bacteriol* **159**: 283-287.

- Ploubidou A, Robinson DR, Docherty RC, Ogbadoyi EO, Gull K. 1999. Evidence for novel cell cycle checkpoints in trypanosomes: kinetoplast segregation and cytokinesis in the absence of mitosis. *Journal of cell science* **112 (Pt 24)**: 4641-4650.
- Presnyak V, Collier J. 2013. The DHH1/RCKp54 family of helicases: an ancient family of proteins that promote translational silencing. *Biochim Biophys Acta* **1829**: 817-823.
- Read LK, Lukes J, Hashimi H. 2016. Trypanosome RNA editing: the complexity of getting U in and taking U out. *Wiley interdisciplinary reviews RNA* **7**: 33-51.
- Rico E, Rojas F, Mony BM, Szoor B, Macgregor P, Matthews KR. 2013. Bloodstream form pre-adaptation to the tsetse fly in *Trypanosoma brucei*. *Frontiers in cellular and infection microbiology* **3**: 78.
- Rosnes I, Rowe AD, Vik ES, Forstrom RJ, Alseth I, Bjoras M, Dalhus B. 2013. Structural basis of DNA loop recognition by endonuclease V. *Structure* **21**: 257-265.
- Rubio MA, Gaston KW, McKenney KM, Fleming IM, Paris Z, Limbach PA, Alfonzo JD. 2017. Editing and methylation at a single site by functionally interdependent activities. *Nature* **542**: 494-497.
- Rubio MA, Pastar I, Gaston KW, Ragone FL, Janzen CJ, Cross GA, Papavasiliou FN, Alfonzo JD. 2007. An adenosine-to-inosine tRNA-editing enzyme that can perform C-to-U deamination of DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104**: 7821-7826.
- Rubio MA, Ragone FL, Gaston KW, Ibba M, Alfonzo JD. 2006. C to U editing stimulates A to I editing in the anticodon loop of a cytoplasmic threonyl tRNA in *Trypanosoma brucei*. *The Journal of biological chemistry* **281**: 115-120.
- Sakumi K, Abolhassani N, Behmanesh M, Iyama T, Tsuchimoto D, Nakabeppu Y. 2010. ITPA protein, an enzyme that eliminates deaminated purine nucleoside triphosphates in cells. *Mutation research* **703**: 43-50.
- Saparbaev M, Laval J. 1994. Excision of hypoxanthine from DNA containing dIMP residues by the Escherichia coli, yeast, rat, and human alkylpurine DNA glycosylases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **91**: 5873-5877.
- Sawa T, Ohshima H. 2006. Nitritative DNA damage in inflammation and its possible role in carcinogenesis. *Nitric Oxide* **14**: 91-100.
- Schouten KA, Weiss B. 1999. Endonuclease V protects Escherichia coli against specific mutations caused by nitrous acid. *Mutation research* **435**: 245-254.

- Shlomai J. 2004. The structure and replication of kinetoplast DNA. *Current molecular medicine* **4**: 623-647.
- Siegel TN, Hekstra DR, Wang X, Dewell S, Cross GA. 2010. Genome-wide analysis of mRNA abundance in two life-cycle stages of *Trypanosoma brucei* and identification of splicing and polyadenylation sites. *Nucleic acids research* **38**: 4946-4957.
- Sievers F, Wilm A, Dineen D, Gibson TJ, Karplus K, Li W, Lopez R, McWilliam H, Remmert M, Soding J et al. 2011. Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. *Molecular systems biology* **7**: 539.
- Simarro PP, Cecchi G, Franco JR, Paone M, Diarra A, Ruiz-Postigo JA, Fevre EM, Mattioli RC, Jannin JG. 2012. Estimating and mapping the population at risk of sleeping sickness. *PLoS neglected tropical diseases* **6**: e1859.
- Simons AL, Mattson DM, Dornfeld K, Spitz DR. 2009. Glucose deprivation-induced metabolic oxidative stress and cancer therapy. *J Cancer Res Ther* **5 Suppl 1**: S2-6.
- Splettstoesser WD, Schuff-Werner P. 2002. Oxidative stress in phagocytes--"the enemy within". *Microsc Res Tech* **57**: 441-455.
- Stoecklin G, Kedersha N. 2013. Relationship of GW/P-bodies with stress granules. *Adv Exp Med Biol* **768**: 197-211.
- Svilar D, Goellner EM, Almeida KH, Sobol RW. 2011. Base excision repair and lesion-dependent subpathways for repair of oxidative DNA damage. *Antioxidants & redox signaling* **14**: 2491-2507.
- Tabel H, Kaushik RS, Uzonna J. 1999. Experimental African trypanosomiasis: differences in cytokine and nitric oxide production by macrophages from resistant and susceptible mice. *Pathobiology* **67**: 273-276.
- Thompson DM, Lu C, Green PJ, Parker R. 2008. tRNA cleavage is a conserved response to oxidative stress in eukaryotes. *RNA* **14**: 2095-2103.
- Thompson DM, Parker R. 2009a. The RNase Rny1p cleaves tRNAs and promotes cell death during oxidative stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol* **185**: 43-50.
- Thompson DM, Parker R. 2009b. Stressing out over tRNA cleavage. *Cell* **138**: 215-219.
- Trenaman A, Hartley C, Prorocic M, Passos-Silva DG, van den Hoek M, Nechyporuk-Zloy V, Machado CR, McCulloch R. 2013. *Trypanosoma brucei* BRCA2 acts in a life cycle-specific genome stability process and dictates BRC repeat number-dependent RAD51 subnuclear dynamics. *Nucleic acids research* **41**: 943-960.

- Tuerto F, Lyko F. 2016. Genome recoding by tRNA modifications. *Open Biol* **6**.
- Valdes J, Taylor MC, Cross MA, Ligtenberg MJ, Rudenko G, Borst P. 1996. The viral thymidine kinase gene as a tool for the study of mutagenesis in *Trypanosoma brucei*. *Nucleic acids research* **24**: 1809-1815.
- Van Den Abbeele J, Claes Y, van Bockstaele D, Le Ray D, Coosemans M. 1999. *Trypanosoma brucei* spp. development in the tsetse fly: characterization of the post-mesocyclic stages in the foregut and proboscis. *Parasitology* **118 (Pt 5)**: 469-478.
- van den Hoff MJ, Moorman AF, Lamers WH. 1992. Electroporation in 'intracellular' buffer increases cell survival. *Nucleic acids research* **20**: 2902.
- Vassella E, Reuner B, Yutzy B, Boshart M. 1997. Differentiation of African trypanosomes is controlled by a density sensing mechanism which signals cell cycle arrest via the cAMP pathway. *Journal of cell science* **110 (Pt 21)**: 2661-2671.
- Vik ES, Nawaz MS, Strom Andersen P, Fladeby C, Bjoras M, Dalhus B, Alseth I. 2013. Endonuclease V cleaves at inosines in RNA. *Nature communications* **4**: 2271.
- Vonlaufen N, Kanzok SM, Wek RC, Sullivan WJ, Jr. 2008. Stress response pathways in protozoan parasites. *Cell Microbiol* **10**: 2387-2399.
- Weiss B. 2001. Endonuclease V of *Escherichia coli* prevents mutations from nitrosative deamination during nitrate/nitrite respiration. *Mutation research* **461**: 301-309.
- Weiss B. 2008. Removal of deoxyinosine from the *Escherichia coli* chromosome as studied by oligonucleotide transformation. *DNA repair* **7**: 205-212.
- Wirtz E, Leal S, Ochatt C, Cross GA. 1999. A tightly regulated inducible expression system for conditional gene knock-outs and dominant-negative genetics in *Trypanosoma brucei*. *Molecular and biochemical parasitology* **99**: 89-101.
- Woodward R, Gull K. 1990. Timing of nuclear and kinetoplast DNA replication and early morphological events in the cell cycle of *Trypanosoma brucei*. *Journal of cell science* **95 (Pt 1)**: 49-57.
- Yamasaki S, Ivanov P, Hu GF, Anderson P. 2009. Angiogenin cleaves tRNA and promotes stress-induced translational repression. *J Cell Biol* **185**: 35-42.
- Yao M, Hatahet Z, Melamede RJ, Kow YW. 1994. Purification and characterization of a novel deoxyinosine-specific enzyme, deoxyinosine 3' endonuclease, from *Escherichia coli*. *The Journal of biological chemistry* **269**: 16260-16268.
- Yao M, Kow YW. 1994. Strand-specific cleavage of mismatch-containing DNA by deoxyinosine 3'-endonuclease from *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry* **269**: 31390-31396.

- Yao M, Kow YW. 1996. Cleavage of insertion/deletion mismatches, flap and pseudo-Y DNA structures by deoxyinosine 3'-endonuclease from *Escherichia coli*. *The Journal of biological chemistry* **271**: 30672-30676.
- Yao M, Kow YW. 1997. Further characterization of *Escherichia coli* endonuclease V. Mechanism of recognition for deoxyinosine, deoxyuridine, and base mismatches in DNA. *The Journal of biological chemistry* **272**: 30774-30779.
- Yasui M, Suenaga E, Koyama N, Masutani C, Hanaoka F, Gruz P, Shibutani S, Nohmi T, Hayashi M, Honma M. 2008. Miscoding properties of 2'-deoxyinosine, a nitric oxide-derived DNA Adduct, during translesion synthesis catalyzed by human DNA polymerases. *Journal of molecular biology* **377**: 1015-1023.
- Yeo J, Goodman RA, Schirle NT, David SS, Beal PA. 2010. RNA editing changes the lesion specificity for the DNA repair enzyme NEIL1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **107**: 20715-20719.
- Zhang Z, Hao Z, Wang Z, Li Q, Xie W. 2014. Structure of human endonuclease V as an inosine-specific ribonuclease. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **70**: 2286-2294.
- Zhang Z, Jia Q, Zhou C, Xie W. 2015. Crystal structure of *E. coli* endonuclease V, an essential enzyme for deamination repair. *Scientific reports* **5**: 12754.
- Zhou Q, Hu H, Li Z. 2014. New insights into the molecular mechanisms of mitosis and cytokinesis in trypanosomes. *International review of cell and molecular biology* **308**: 127-166.